

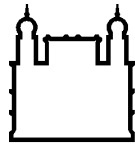
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

*DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO
MONOCLONAL ANTI-QUITOOLIGÔMEROS COMO
POTENCIAL FERRAMENTA NO TRATAMENTO DE
INFECÇÕES FÚNGICAS*

ALEXANDRE BEZERRA CONDE FIGUEIREDO

Rio de Janeiro
20 de Fevereiro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Alexandre Bezerra Conde Figueiredo

Desenvolvimento e caracterização de anticorpo monoclonal anti-quitooligômeros como potencial ferramenta no tratamento de infecções fúngicas

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Marcio Lourenço Rodrigues

RIO DE JANEIRO

20 de Fevereiro de 2020

Bezerra Conde Figueiredo, Alexandre.

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-QUITOOLIGÔMEROS COMO POTENCIAL FERRAMENTA NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES FÚNGICAS / Alexandre Bezerra Conde Figueiredo. - Rio de Janeiro, 2020.

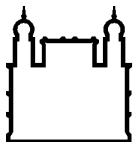
104 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientador: Marcio Lourenço Rodrigues.

Bibliografia: f. 67-85

1. Anticorpo Monoclonal. 2. Infecções Fúngicas. 3. Terapia. 4. Cryptococcus neoformans. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: ALEXANDRE BEZERRA CONDE FIGUEIREDO

**Desenvolvimento e caracterização de anticorpo monoclonal anti-
quitooligômeros como potencial ferramenta no tratamento de infecções
fúngicas**

ORIENTADOR: Dr. Marcio Lourenço Rodrigues

Aprovada em: 20/02/2020

EXAMINADORES:

Prof^ª. Dr^ª. Lucimar Ferreira Kneipp - Presidente
(Laboratório de Micologia / IOC / FIOCRUZ -RJ)

Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho
(Inst. Nacional de Infectologia Evandro Chagas / FIOCRUZ -RJ)

Prof^ª. Dr^ª. Daniela Sales Alviano Moreno
(Departamento de Microbiologia Geral / IMPG - UFRJ)

Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva
(Bio-Manguinhos / FIOCRUZ - RJ)

Prof. Dr. Leonardo Nimrichter
(Departamento de Microbiologia Geral / IMPG - UFRJ)

Rio de Janeiro, 20 de Fevereiro de 2020



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Alexandre Bezerra Conde Figueiredo**, sob orientação do Dr. Márcio Lourenço Rodrigues. Ao vigésimo dia do mês de fevereiro de dois mil e vinte, realizou-se às nove horas, na Sala 1 - Módulo de Expansão do Pavilhão Arthur Neiva /FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: "**Desenvolvimento e caracterização de anticorpo monoclonal anti-quitooligômeros como potencial ferramenta no tratamento de infecções fúngicas**", no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Desenvolvimento de Métodos de Diagnóstico e Controle das Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Lucimar Ferreira Kneipp - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Daniela Sales Alviano Moreno - UFRJ/RJ, Dr^a. Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho - INI/FIOCRUZ e como suplentes: Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva - BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ e Dr. Leonardo Nimrichter - UFRJ/RJ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 20 de fevereiro de 2020.

Dr^a. Lucimar Ferreira Kneipp (Presidente da Banca):

Dr^a. Daniela Sales Alviano Moreno (Membro da Banca):

Dr^a. Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimentoeac@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/iocensino

**Dedico essa Tese de Doutorado a
minha amada esposa, Carolina
Figueiredo e amados filhos, Pedro e
Antônio.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Senhor de tudo e Aquele que guia todos os nossos caminhos. Obrigado por todas as horas difíceis que consegui enfrentar e vencer, obrigado por me enviar luz quando me perdia para as forças trevasas, obrigado por sempre enviar nossos amigos espirituais para me ajudar em todos os momentos e em especial por colocar no meu caminho os mentores que me auxiliam na minha jornada.

Aos meus Pais que me deram a base, abdicando de muita coisa para que eu pudesse ter uma educação da melhor forma possível. Obrigado pelo maior legado e maior herança que poderiam me dar. Obrigado pelo sacrifício, pelo amor e pelo estímulo para que eu continue uma trajetória árdua de conhecimento. Darei o mesmo legado aos meus filhos.

Agradeço, imensamente, a minha esposa, Carolina, por suportar toda essa caminhada com o mesmo sorriso, com as palavras de incentivo, com o ombro nas horas de turbulência, com a paciência e por todo amor que me dá todos os dias. Essa jornada do Doutorado iniciamos com a gravidez do nosso Pedro, símbolo marcante de uma nova vida e terminamos essa trajetória com uma nova gravidez, do nosso filho Antônio, mostrando que se inicia uma nova jornada. Sua luz e sua força sempre iluminam o meu caminho e não tenho palavras para descrever a importância que tem em minha vida! Obrigado minha eterna namorada. Te amo mais que ontem e menos que amanhã.

Ao meu grande amigo Fernando que me auxiliou muito nessa trajetória. Suas ideias e suas palavras me ajudaram a crescer durante o caminho da tese. Obrigado meu amigo! Hoje dou razão a muitas das suas palavras que antes achava que não eram para mim; pobre de mim que não acreditou de imediato. Obrigado por colaborar na realização dessa tese e obrigado por estar junto comigo no trabalho e fora dele. Com todas as letras sei que posso te chamar de Irmão!

Obrigado ao meu Orientador, Dr. Marcio Lourenço Rodrigues, pela amizade que criamos e por toda orientação em um tema que era desconhecido para mim, mas que passou a fazer parte da minha vida e que hoje não largo mais. Obrigado por sempre ir direto ao ponto, sem rodeios ou delongas, conseguindo mostrar qual era o melhor caminho e me fazendo ter um pensamento crítico. Apesar da distância

física no final da tese nunca deixou de estar presente me auxiliando com seus ensinamentos. Obrigado meu amigo!

Agradeço a Diretoria de Bio-Manguinhos, que me autorizou a realização da tese e a Dr^a Márcia Arissawa que sempre buscou um caminho para que eu chegasse ao Doutorado. Espero que tenha correspondido às expectativas com os resultados obtidos.

A todos do LATAM pelo suporte e amizade que me dão todos os dias. Em especial à Patrícia Neves que me deu condições e tranquilidade para que pudesse finalizar da melhor forma possível a tese de Doutorado. Obrigado pela paciência e pela oportunidade! Essa tese tem um pedaço de cada um de vocês.

Ao NITBio por toda a dedicação que deram para a realização da patente dos anticorpos monoclonais, em especial a Katia Reis por toda a força, reuniões e empenho nesse depósito.

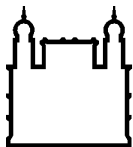
A todos do Laboratório de Biologia Celular de Leveduras Patogênicas (UFRJ) pelos ensinamentos e ajuda nos experimentos. Agradecimento especial a Fernanda e Luna por toda amizade e carinho que tiveram comigo em todos os momentos e a ajuda imprescindível nos experimentos.

A todos da Família Jiu Jitsu, Isaías, Fernando, Lazaro, Kidão, Sandrão, Mestre João, Mestre Gustavo e todos que ajudaram a aliviar o estresse dando rola, suando, tomando pancada e aumentando ainda mais a amizade que se construiu ao longo de vários anos. Oss!!

A todos do LAEAN e LAMAM que de alguma forma contribuíram e deram suporte técnico-científico nessa longa jornada.

A todos que de alguma forma contribuíram emocionalmente e intelectualmente nesse caminho.

À FIOCRUZ e Bio-Manguinhos pelo suporte técnico-científico e financiamento e a Pós-Graduação em Biologia Parasitária por manter a excelência de ensino e pesquisa.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

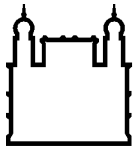
Desenvolvimento e caracterização de anticorpo monoclonal anti- quitoligômeros como potencial ferramenta no tratamento de infecções fúngicas

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Alexandre Bezerra Conde Figueiredo

A busca pelo diagnóstico rápido e o tratamento de infecções fúngicas invasivas são de grande importância, visto que mais de um milhão de indivíduos morrem por ano em decorrência dessas infecções. *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis jirovecii* e *Cryptococcus neoformans* são os patógenos fúngicos com maior incidência e responsáveis por altas taxas de morbi-mortalidade. Um dos principais componentes da parede celular é a quitina, um polímero formado por unidades de *N*-acetilglucosamina com ligações β -1,4. A quitina é um componente essencial para a rigidez e integridade da parede celular de fungos, um alvo terapêutico e uma ferramenta diagnóstica, pois não é sintetizada por humanos ou animais. Nesse estudo, foram desenvolvidos anticorpos monoclonais (AcM) contra oligômero de quitina através da técnica de hibridomas. Ensaio funcionais caracterizaram os AcMs como potenciais ferramentas para o diagnóstico e tratamento de infecções fúngicas invasivas. Testes de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) demonstraram que os AcM possuem afinidade e especificidade pela quitina e seus derivados, visto que não se ligaram a nenhum outro tipo celular como: às linhagens de células pulmonares humanas e aos microorganismos testados (*G. lamblia*, *E. coli* e *S. Aureus*). Análises de imunofluorescência demonstraram que os AcMs se ligam à parede fúngica de *C. albicans*. Ensaio *in vitro* revelaram que os AcMs aumentaram a capacidade fungicida da Anfotericina B (AmB) e Fluconazol (FLC), fármacos usados na clínica médica para o tratamento de infecções fúngicas invasivas. Os AcMs HC6/DD11 e AF1/CC5 foram capazes de interferir com dois dos maiores fatores de resistência a antifúngicos, a formação de biofilme e a produção do pigmento melanina. Em modelo murino de infecção por *C. neoformans*, a administração conjunta do AcM anti-quitoligômeros HC6/DD11 e doses subinibitórias de AmB promoveram a sobrevivência dos animais em torno de 100%. Os dados obtidos nesse estudo corroboram a hipótese de que anticorpos desenvolvidos contra quitoligômeros são potenciais ferramentas auxiliares para o diagnóstico e o tratamento de infecções causadas por *C. neoformans*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Development and characterization of anti-chitooligomers monoclonal antibody as a potential tool for fungal infection treatment

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Alexandre Bezerra Conde Figueiredo

The search for a fast and accurate diagnosis of fungal infections is fundamental, since over one million individuals die each year due to systemic mycoses. *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis jirovecii* and *Cryptococcus neoformans* are the most prevalent fungal pathogens and they are responsible for high rates of morbi-mortality. One of the main components of the cell wall is chitin, a polymer formed by *N*-acetylglucosamine units linked through β -1,4 bonds. Chitin is essential for the cell wall rigidity and integrity, a promising target for therapy and diagnosis, since it is not synthesized by humans or animals. In this study, monoclonal antibodies (mAb) were developed against chitin oligomers using the hybridoma technique. Functional assays characterized mAbs against chitin oligomers as potential tools for diagnosis and treatment of fungal infections. ELISA assays have shown that the mAbs have affinity and specificity with chitin oligomers and its derivatives, since they did not bind to any other cell type such as protozoa, bacteria and animal cells. Immunofluorescence analyzes have shown that the mAbs bind to *C. albicans*. In vitro tests have shown that the mAbs increased the fungicidal capacity of amphotericin B (AmB) and fluconazole, drugs regularly used for the treatment of fungal infections. HC6/DD11 and AF1/CC5 mAbs were able to interfere with two of the major antifungal resistance factors, the biofilm formation and melanin production. In a murine model of *C. neoformans* infection, the combined administration of anti-chitin mAb HC6/DD11 and subinhibitory doses of AmB promoted animal survival around 100%. The data obtained in this work corroborate the hypothesis that chitin antibodies developed against chitooligomers are an auxiliary tool for the diagnosis and treatment of fungal infections caused by *C. neoformans*.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Infecções fúngicas	1
1.1.1. <i>Cryptococcus</i> sp e a Criptococose	3
1.1.2. Diagnóstico de IFI	6
1.1.3. Tratamento de IFI	10
1.2. Anticorpos Monoclonais	13
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo Geral	18
3.2. Objetivos Específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Desenho experimental	19
4.2. Tipos celulares e condições de crescimento	19
4.3. Imunização dos animais	20
4.4. Fusão	20
4.5. ELISA indireto	21
4.5.1. ELISA para definição de títulos séricos.	21
4.5.2. ELISA para determinação de reatividade de anticorpos policlonal e monoclonal.....	22
4.6. Clonagem dos hibridomas policlonais	22
4.7. Isotipagem dos clones selecionados	22
4.8. Purificação dos Anticorpos Monoclonais	22
4.9. Extração de RNA dos clones selecionados	23
4.10. Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa (RT-PCR)	23
4.11. Sequenciamento dos clones/monoclonais selecionados	25
4.12. Determinação de constante de afinidade e dissociação por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)	25
4.13. Ensaio funcionais	26

4.13.1. ELISA indireto com células íntegras	26
4.13.2. ELISA indireto de quitosana.	26
4.13.3. <i>Dot Blot</i> de células íntegras	27
4.13.4. Ensaio para determinação do sítio de ligação	27
4.13.5. Ensaio de imunofluorescência dos AcMs anti- quitooligômero em células fúngicas	28
4.13.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	28
4.13.7. Formação de biofilme.	29
4.13.8. Ensaio de melanização	29
4.13.9. Curva de sobrevivência.	29
4.14. Modelagem Molecular	30
4.15. Análise Estatística	31
5. CONSIDERAÇÕES SOBRE ASPECTOS ÉTICOS	32
6. RESULTADOS	33
6.1. Desenvolvimento de anticorpo monoclonal murino para quitooligômero através da tecnologia de hibridoma	33
6.1.1. Titulação dos animais imunizados contra <i>C. gattii</i> e quitotriose	33
6.1.2. Seleção de hibridomas produtores de AcM por ELISA.....	34
6.1.3. Isotipagem dos AcMs selecionados.....	35
6.1.4. Purificação dos AcMs	35
6.1.5. RT-PCR dos AcM, sequenciamento e determinação de CDR.....	36
6.1.6. Determinação de constante de associação e dissociação	37
6.2. Ensaios Funcionais dos AcMs	40
6.2.1. ELISA indireto com células íntegras	40
6.2.2. Determinação do sítio de ligação.....	43
6.2.3. <i>Dot Blot</i> com células íntegras	44
6.2.4. Reconhecimento fúngico por AcM anti-quitooligômero por Imunofluorescência.....	45
6.2.5. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	47
6.2.6. Atividade dos AcMs na viabilidade do biofilme	50
6.2.7. Avaliação do efeito dos AcMs na melanização de <i>C.</i> <i>neoformans</i>	53
6.3. Teste de sobrevivência após tratamento com os AcMs	55

6.3.1. Infecção com <i>C. neoformans</i> e tratamento com AcM HC6/DD11	55
6.3.2. Infecção com <i>C. neoformans</i> e tratamento com AcM HC6/DD11 associado ao antifúngico AmB	56
6.4. Modelagem Molecular	57
7. DISCUSSÃO	59
8. CONCLUSÕES	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
10. ANEXO	86
ANEXO A – Depósito de Patente dos Anticorpos Monoclonais Anti- Quitooligômeros.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de Infecção de <i>Cryptococcus</i> spp.....	5
Figura 2: Representação esquemática de estruturas da parede celular dos fungos	8
Figura 3: Exemplos de mecanismos de ação dos principais antifúngicos.....	11
Figura 4: Desenvolvimento de AcM através da técnica de hibridoma	14
Figura 5: Os mecanismos propostos de ação do anticorpo contra fungos.....	16
Figura 6: Organograma de experimentação para desenvolvimento, caracterização e validação biológica dos AcMs anti-quitooligômero.	19
Figura 7: Curva de titulação de anticorpos séricos de camundongos obtida por ELISA.....	33
Figura 8: Clonagem dos hibridomas.	34
Figura 9: Isotipagem dos AcMs selecionados.....	35
Figura 10: Análise da purificação dos AcMs.	36
Figura 11: Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose do produto de PCR dos AcMs selecionados.....	37
Figura 12: Sensograma de SPR representativo das interações de AcM e quitotriose.....	38
Figura 13: Sensograma de SPR representativo das interações de AcM, BSA e Cisteína	39
Figura 14: ELISA indireto com <i>C. albicans</i>	40
Figura 15: ELISA com fungos integros em diferentes densidades celulares....	41
Figura 16: Teste de reatividade de <i>C. neoformans</i> e outros tipos celulares com os AcMs.....	42
Figura 17: Teste de reatividade com o derivado deacetilado da quitina, a quitosana	43
Figura 18: Determinação do sitio de ligação dos AcMs.....	44
Figura 19: Dot Blot de células integras	45
Figura 20: Marcação por imunofluorescência dos AcMs anti-quitooligômeros em <i>C. albicans</i>	46
Figura 21: Análise do potencial sinérgico dos AcMs com AmB	48
Figura 22: Análise do potencial sinérgico dos AcMs com Fluconazol.....	49
Figura 23: Atividade dos AcMs na formação de biofilme	51
Figura 24: Atividade dos AcMs contra a formação de biofilme em comparação com a ação do AcM 18B7	52

Figura 25: Efeito dos AcMs na melanização de <i>C. neoformans</i>.....	54
Figura 26: Curva de sobrevivência após tratamento com AcM H6/DD11.....	55
Figura 27: Curva de sobrevivência após tratamento com o AcM H6/DD11 e AmB isolados ou em associação	56
Figura 28: Modelagem molecular.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas globais e mortes relacionadas de infecções por fungos por ano.	3
Tabela 2: Oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de RT-PCR para amplificação dos cDNAs codificadores para VH e VL murinas a partir da extremidade 5'.	24
Tabela 3: Parâmetros cinéticos dos dois AcMs para quitooligômeros. DP – desvio padrão	39
Tabela 4: Impacto da associação dos AcMs à AmB ou FLC na atividade antifúngica.	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FC	5-Flucitosina
AcM	Anticorpo Monoclonal
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
AmB	Anfotericina B
ATB	Antibiótico
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
BAL	Lavado Bronco Alveolar
BDG	β -D-glucana
BSA	Albumina Bovina Sérica (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD4	Grupamento de diferenciação 4 (do inglês <i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar (do inglês <i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i>)
CDR	Região Determinante de Complementaridade (do inglês <i>Complementarity-determining regions</i>)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CrAg	antígeno de <i>Cryptococcus</i>
D.O.	Densidade Óptica
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
ELISA	do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERG11	do inglês <i>Ergosterol biosynthesis gene 11</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
GM	Galactomanana
GXM	Glucuronoxilomanana
HAT	Hipoxantina Aminopterina Timidina
HEPES	Ácido sulfônico zwitteriônico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenoso
IFI	Infecções Fúngicas Invasivas
Ig	Imunoglobulina

INF γ	Interferon gamma
ITS1	do inglês <i>Internal transcribed spacer 1</i>
ITS2	do inglês <i>Internal transcribed spacer 2</i>
KA	Constante de Associação
KD	Constante de Dissociação
L-DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MOPS	do inglês <i>3-Morpholinopropane-1-sulfonic acid</i>
PBS	Tampão Fosfato Salina (do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	do inglês <i>Protein Data Banking</i>
PEG	Polietilenoglicol
PFA	Paraformaldeído
RMSD	do inglês <i>root-mean-square deviation</i>
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
RPMI 1640	do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute 1640 medium</i>
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa (do inglês <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície (do inglês <i>Surface plasmon resonance</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
TMB	Tetrametilbenzidina
VH	cadeia variável pesada
VL	cadeia variável leve
WGA	lectina do germe de trigo (do inglês <i>Wheat germ agglutinin</i>)
XTT	do inglês <i>2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide</i>
β -1,4-GlcNAc	β -1,4-N-acetilglucosamina

1. INTRODUÇÃO

Fungos são organismos eucarióticos e saprófitos, que apresentam parede celular constituída por quitina ao contrário de células de plantas, que são formadas por celulose. A estimativa é que existem aproximadamente 5 milhões de espécies fúngicas no planeta (Kö Hler et al. 2015). As células fúngicas apresentam grande diversidade morfológica, incluindo dois morfotipos principais: as leveduras, formas unicelulares arredondadas, ovais ou esféricas, e os filamentos, que se apresentam na forma de hifa e são multicelulares. Os fungos filamentosos apresentam como morfologia básica a hifa, que pode ser septada ou não septada. Vale ressaltar a existência de fungos dimórficos, que podem viver tanto na forma de levedura quanto na forma de hifa dependendo de variações ambientais que guiam a transição entre os estados morfológicos.

Os fungos de importância médica podem ser classificados em diferentes filos. Os filos Ascomycota e Basidiomycota abrigam vários patógenos de animais e plantas, incluindo os patógenos humanos *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides immitis* (Heitman 2011), responsáveis por causar micoses profundas.

1.1. Infecções fúngicas

As infecções fúngicas invasivas (IFI), representam uma das principais causas de morbi e mortalidade no mundo (Armstrong-James et al. 2014). De acordo com dados apresentados pelo Fundo Global de Ações contra Infecções Fúngicas (GAFFI, da denominação em inglês *Global Action Fund for Fungal Infections*), mais de 300 milhões de pessoas sofrem de alguma infecção fúngica grave a cada ano no globo (GAFFI). É estimado que, nesse grupo, mais de 1,6 milhões de pessoas morrerão, sendo essas estatísticas comparáveis às observadas para tuberculose e 3 vezes maior que a malária (Bongomin et al. 2017).

O aumento da incidência atual de IFI é em grande parte resultado de uma escalada substancial nas últimas décadas de condições imunossupressoras, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o uso de fármacos indutores de imunossupressão (Bongomin et al. 2017). Além disso, o uso de antineoplásicos e antibióticos de amplo espectro, e de intervenções médicas invasivas (Brown et al. 2012), também contribui diretamente com o aumento das IFI.

As micoses sistêmicas podem afetar qualquer órgão do hospedeiro. A classificação de doenças fúngicas nessa categoria é dinâmica e altamente variável, espécies anteriormente consideradas não patogênicas são agora reconhecidas como patógenos responsáveis por micoses invasivas (Vallabhaneni et al. 2016). Essas infecções são muito comuns em pacientes imunocomprometidos e frequentemente estão associadas a uma elevada taxa de mortalidade (Bongomin et al. 2017). Os gêneros mais frequentes envolvidos nas infecções fúngicas invasivas em pacientes HIV são *Candida*, *Pneumocystis*, *Aspergillus* (infecções fúngicas oportunistas), *Histoplasma*, *Cryptococcus*, *Talaromyces marneffe* infecções fúngicas de pele e mucosa caudadas pelas espécies *Mucor*, *Rhizopus* e *Coccidioides*. Estimativas globais registram mais de 11 milhões de infecções fúngicas por ano, que resultam em mais de 500 mil mortes (Denning 2015, Bongomin et al. 2017) (Tabela 1).

Os fungos patogênicos para os seres humanos existem em muitos habitats naturais, mas as IFIs são geralmente observadas em climas tropicais e subtropicais (Nucci & Marr 2005, Benedict et al. 2017). Especula-se que o aumento das mudanças climáticas pode ter alterado a distribuição das doenças e, conseqüentemente, levado ao aparecimento de fungos patogênicos em novas áreas geográficas (Benedict et al. 2017). Por exemplo, o nordeste dos Estados Unidos registrou 100 casos de doença por *C. gattii* pertencente ao tipo molecular VGII, normalmente encontrado na América do Sul (Harris et al. 2013). Entretanto, esse surto foi registrado em uma região temperada dos EUA (Harris et al. 2011). Cabe ressaltar que os fungos são armados com um arsenal de características que facilitam a adaptação e colonização de novos nichos e, conseqüentemente, a capacidade de sobreviver às condições fisiológicas do hospedeiro e de alternar entre diferentes estados morfológicos (Polvi et al. 2015). Dentre as adaptações mais comuns em fungos patogênicos está a capacidade de crescer a 37°C (Leach & Cowen 2013), mudar de forma, escapar do sistema imune (ou células fagocíticas) (Moraes Nicola et al. 2011, Bain et al. 2012), melanizar e formar biofilme (Coelho et al. 2014).

Segundo o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC, EUA), os fungos são os agentes mais frequentemente associados à mortalidade por meningite microbiana. Estima-se que cerca de um milhão de casos de meningite causadas pelo fungo *C. neoformans* ocorrem anualmente, resultando em mais de duzentas mil mortes 3 meses após a infecção (Rajasingham et al. 2017).

Tabela 1: Estimativas globais e mortes relacionadas de infecções por fungos por ano.

Infecção Fúngica	Incidência Anual	Taxa de letalidade após tratamento	Estimativa anual de morte
Meningite Criptocócica	~ 1 milhão	>50%	~100.000 - 600.000
Pneumonia Pneumocística	>400.000	15% com o melhor tratamento	>200.000
Histoplasmose disseminada	>100.000	15-30%, se diagnosticada e tratada	>80.000
Aspergilose pulmonar crônica	>185.000	15-40% em hospitais	>100.000
Aspergilose invasiva	>45.000	30% tratadas em hospitais	>30.000
Talaromicose	>8.000	33%	>2.000
Infecção fúngica na pele e mucosa	>10 milhões	<1%	<1.000
Total	>11 milhões		>500.000

Adaptada de Bongomin et al. 2017

1.1.1. *Cryptococcus* sp e a Criptococose

O gênero *Cryptococcus* é caracterizado por células leveduriformes ovais ou esféricas circundadas por uma cápsula. Os membros do gênero são pertencentes ao filo Basidiomycota (Lin 2009). *C. neoformans* e *C. gattii*, os principais membros patogênicos, por décadas foram subdivididos em três variedades e cinco sorotipos baseados nos determinantes antigênicos do polissacarídeo capsular: *C. neoformans* var *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var *neoformans* (sorotipo D), *C. neoformans* (híbrido AD) e *C. gattii* (sorotipos B e C) (Kwon-Chung et al. 2017). Há em curso uma proposta de reclassificação de *C. neoformans* e *C. gattii* em sete espécies, com

base em evidências moleculares (Hagen et al. 2015). Esta proposta nomeou 7 espécies excluindo híbridos diploides / aneuploides formados entre diferentes clados, desta forma os principais clados monofiléticos para as duas espécies foram designados como: VNI (AFLP1), VNII (AFLP1A/IB), VNIII (AFLP3) e VNIV (AFLP2) para *C. neoformans* e VGI (AFLP4), VGII (AFLP6), VGIII (AFLP5) e VGIV (AFLP6) para *C. gattii* (Kwon-Chung et al. 2017).

C. neoformans é um fungo saprófito, cosmopolita, globalmente distribuído e encontrado em excrementos de pássaros (comumente pombos), no solo e em árvores. Trata-se do causador da criptococose predominantemente em indivíduos imunossuprimidos. *C. gattii* é encontrado em troncos de árvores de regiões tropicais e subtropicais causando a infecção, principalmente, em imunocompetentes (Kwon-Chung et al. 2014).

O balanço entre sistema imune do hospedeiro e a virulência do fungo está diretamente relacionado com o desenvolvimento ou não da doença. Cabe destacar, que o estabelecimento da infecção se dá pela exposição do homem aos ambientes contaminados pelo fungo, visto que há similaridade entre os isolados clínicos e ambientais em indivíduos acometidos pela criptococose (Chayakulkeeree 2006).

A criptococose humana ocorre primariamente por inalação de leveduras dessecadas, ou possivelmente basidiósporos, que são depositadas no espaço alveolar, como mostra a Figura 1. A virulência da cepa infecciosa, o tamanho do inóculo e o estado imunológico do indivíduo são fatores preponderantes para o progresso da doença (Colombo & Rodrigues 2015).

A infecção pode ser assintomática ou assumir uma forma latente, dependendo do sistema imune do hospedeiro. Em contraste, em indivíduos imunocomprometidos, as células criptocócicas proliferam e se disseminam para diversos órgãos, com predileção pelo cérebro. Nessas condições, são comuns os quadros de meningoencefalite (Lin & Heitman 2006).

Cabe ressaltar que a interação entre *C. neoformans* e predadores ambientais é vista como um fator importante para a evolução do fungo como um patógeno intracelular facultativo bem-sucedido. *C. neoformans* pode sobreviver em amebas e pode utilizar a mesma estratégia patogênica em macrófagos humanos, que em vários aspectos fornecem um ambiente similar. Desta forma, foi proposto que tal predação no nicho ambiental tenha selecionado as características de virulência criptocócica que contribuem para a patogênese em hospedeiros humanos (Casadevall & Pirofski 2007a).

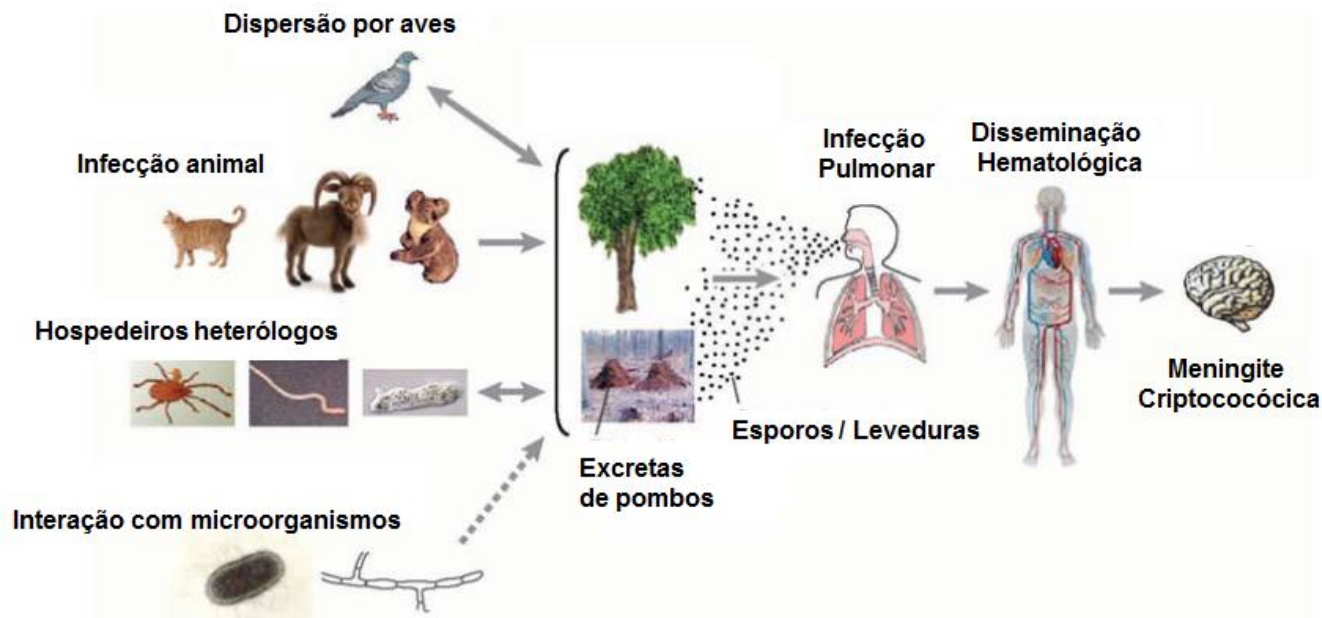


Figura 1 Ciclo de Infecção de *Cryptococcus* spp. O fungo pode sobreviver em solos e árvores, além de infectar diversos animais, dentre eles os pombos que são veículos de dispersão das células fúngicas. Em humanos, através da inalação de esporos ou leveduras dessecadas presentes no ambiente, é estabelecida uma infecção pulmonar, que pode evoluir para meningite criptocócica (Modificado de Lin & Heitman 2006).

As células fagocíticas são a primeira linha de defesa do organismo contra fungos patogênicos. As interações entre *Cryptococcus* e fagócitos podem resultar no controle da infecção, dependendo de vários fatores estimulatórios como estimulação de Th1 e Th17, produção de interferon gamma (INF γ) e Il-17 e maturação de células B (Templeton et al. 2018). Entretanto, fagócitos podem promover um maior risco para infecção fúngica disseminada, uma vez que podem carrear fungos vivos entre tecidos distintos. O estado imunológico do indivíduo está diretamente ligado ao destino dessa interação. Indivíduos imunocompetentes em geral bloqueiam a disseminação fúngica através de mecanismos celulares locais. Pacientes imunocomprometidos produzem uma resposta inflamatória favorável a replicação do patógeno, com consequente disseminação (Dutra et al. 2018, Templeton et al. 2018).

A progressão da doença é diretamente relacionada aos perfis Th1 e Th2 e consequente polarização de macrófagos M1/M2. (Olszewski et al. 2015). Células do tipo Th1 produzem grandes quantidades de TNF- α e INF γ , que induzem a ativação de macrófagos do tipo M1 e consequente eliminação do *Cryptococcus* (Campuzano

& Wormley 2018). Células do tipo Th2 produzem citocinas envolvidas em reações inflamatórias induzindo a proliferação de macrófagos do tipo M2, que não apresentam atividade antifúngica e permitem a proliferação do fungo (Dutra et al. 2018).

Ademais, existem diversas moléculas produzidas por *Cryptococcus* que estimulam a resposta de macrófagos do tipo M2 (Olszewski et al. 2014, Leopold Wager et al. 2016). Dentre essas, destacam-se arginase, urease e lacase (Dutra et al. 2018). Esses macrófagos representam papel central na disseminação da criptococose, já que o *Cryptococcus* pode usar essas células como nicho de replicação e sair dos macrófagos através de exocitose não lítica, dentre outros mecanismos (Moraes Nicola et al. 2011). Devido a essa característica, foi proposta uma hipótese de que os macrófagos poderiam atuar como “Cavalos de Tróia”, levando células internalizadas de *C. neoformans* a atravessar a barreira hematoencefálica e atingir o sistema nervoso central (SNC) (Liu et al. 2012).

A predileção do *C. neoformans* pelo SNC é correlacionada a diversos fatores. O SNC pode representar para o fungo um abrigo mais seguro, visto que a o cérebro consiste de ambiente imunologicamente privilegiado. Além disso, a disponibilidade de L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA), um substrato difenólico utilizado pelo fungo para síntese de melanina, pode facilitar sua permanência no SNC. De fato, a melanização de *C. neoformans* e *C. gattii* pode modular o sistema imune, protegendo os fungos da fagocitose e do estresse oxidativo, como também diminuir a ação de antifúngicos (Colombo & Rodrigues 2015).

Desta forma, compreender a interação do hospedeiro com *Cryptococcus*, bem como a modulação do sistema imune, é de grande importância para o desenho de ferramentas que possam ser utilizadas no diagnóstico e tratamento das doenças fúngicas.

1.1.2. Diagnóstico de IFI

O diagnóstico clínico de IFIs é difícil devido à falta de sinais e sintomas específicos no início da doença. Testes laboratoriais são, portanto, fundamentais para um desfecho que resulte na redução de morbi-mortalidade.

As características ideais para o desenvolvimento de plataformas de diagnóstico incluem detecção precoce do patógeno, boa sensibilidade, capacidade de obter discriminação em nível de espécie, detecção de uma ampla gama de

patógenos (capacidade múltipla), confiabilidade e precisão quantitativa (capacidade de distinguir entre doença e colonização).

A identificação de patógenos fúngicos tem como base a visualização direta do organismo por microscopia óptica, histopatologia de tecidos infectados e o cultivo do fungo (Kozel & Wickes 2014, Giacomazzi et al. 2016). Apesar da cultura fúngica clássica e técnicas de sorologia tradicionais serem relevantes e necessárias, é importante também a identificação de fungos por técnicas imunológicas e moleculares (anticorpos e antígenos, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento) que possibilitem com rapidez e eficácia o diagnóstico.

Uma das maiores limitações do uso do cultivo fúngico no diagnóstico de IFI está ligada ao tempo de obtenção de resultados, visto que vários patógenos, em especial os fungos filamentosos, têm crescimento lento. Dependendo das características do inóculo e do crescimento fúngico, a cultura requer pelo menos 2 a 3 dias de incubação e, para algumas espécies, semanas. Culturas positivas de fontes não estéreis, incluindo espécimes de lavado bronco alveolar (BAL), também requerem interpretação cautelosa para diferenciar entre colonização fúngica e isolamento do verdadeiro agente invasivo. Finalmente, as hemoculturas fúngicas, embora não invasivas e altamente específicas, requerem incubação prolongada e podem ser igualmente insensíveis, apresentando resultados confiáveis somente em torno de 50% de infecções por *Candida* spp. e 10% por *Aspergillus* spp. (Theel & Doern 2013).

No caso de meningites fúngicas o problema pode ser ainda mais grave, pois um diagnóstico impreciso ou tardio pode decretar a morte do paciente. Cabe ressaltar que em alguns casos se faz necessária a biópsia para estabelecer um diagnóstico preciso, já que as culturas de líquido céfalo raquidiano são frequentemente não diagnosticadas, especialmente em casos com abscesso cerebral fúngico (Schwartz et al. 2018). Na criptococose, esses problemas podem ser facilmente contornados com o uso do teste CrAg (do inglês *Serum Cryptococcal Antigen*), que detecta antígeno fúngico no soro do paciente. Esse teste consiste em um método eficiente e de baixo custo utilizado em pacientes infectados com HIV com contagens de linfócitos T CD4 $\leq 100/\mu\text{L}$, em regiões com restrições sócio-econômicas (Meza et al. 2010).

A biópsia, geralmente, não é uma opção viável para pacientes gravemente doentes e com suspeita de IFIs como a aspergilose, visto que apresentam uma maior probabilidade de exibirem hemorragia devido a trombocitopenia (Schwartz et al. 2018). Esse teste apresenta sensibilidade e especificidade limitadas e requer

profissionais bem treinados para identificação do microrganismo (Barnes & Marr 2006). Apesar disso, a observação microscópica ainda se mantém como padrão ouro de diagnóstico presuntivo para muitas IFIs (Ramanan et al. 2017).

A identificação de antígenos fúngicos em amostras de pacientes evoluiu, substancialmente, na área de diagnóstico de IFIs. Essas moléculas, em grande parte, incluem componentes da parede celular (Figura 2). A detecção dessas estruturas pode sugerir ocorrência de IFIs e, frequentemente, são detectáveis antes que sinais clínicos ou sintomas da doença estejam presentes (Powers-Fletcher & Hanson 2016). Dentre esses biomarcadores destacam-se (1, 3)- β -D-glucana (BDG), galactomanana de *Aspergillus* (GM), glucuronoxilomanana de *Cryptococcus* (GXM) e antígeno histoplasmínico.

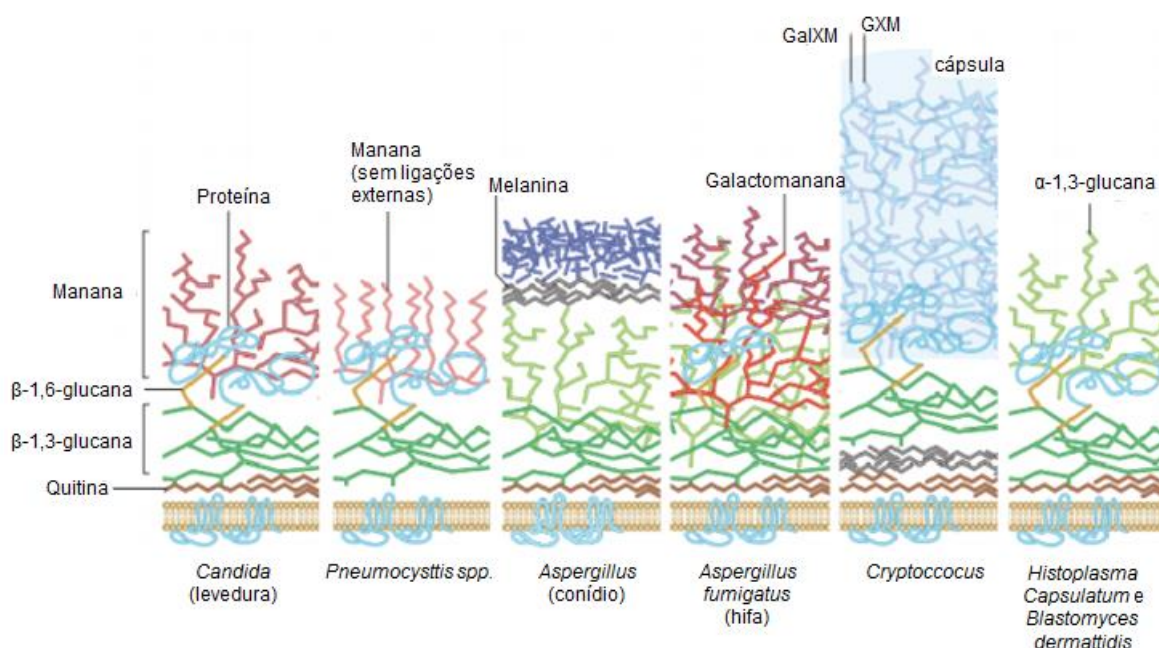


Figura 2: Representação esquemática de estruturas da parede celular dos fungos (Modificado de Erwig & Gow 2016).

Conforme mencionado acima, a detecção de antígenos permite identificar de forma precoce as IFIs, além de direcionar estratégias terapêuticas e avaliar o prognóstico da doença em resposta à terapia (Jaijakul et al. 2012, Theel & Doern 2013, Lamoth 2016). BDG é um biomarcador para a maioria dos fungos, no entanto alguns não apresentam este polissacarídeo, ou possuem baixas quantidades como, por exemplo: os Zigomicetos da ordem mucorales, *Blastomyces dermatitidis*, e alguns *Basidiomycota* (e.g., *Cryptococcus* spp e *Malassezia* spp.) (Lamoth 2016).

Embora a BDG possuir especificidade limitada para determinados patógenos fúngicos e variar de acordo com o organismo, há vantagens claras quando comparadas com outras técnicas (Jaijakul et al. 2012). No caso da candidíase

invasiva, há aumento da sensibilidade em aproximadamente 70% em comparação com a hemocultura (Nguyen et al. 2012). Em caso de pneumonia por *Pneumocystis* são observadas maior sensibilidade (96%) e especificidade (84%) para BDG no soro, quando comparadas a mesma análise em candidíase e argegilose, as quais não ultrapassam 80% (Onishi et al. 2011). Cabe destacar, que esses kits para diagnóstico já estão disponíveis no mercado e usados por exemplo para avaliar casos de pneumonia por *Pneumocystis* (Empresa *Era Biology - Goldstream Fungus (1-3)-β-D-Glucan Test (GCT-110T* – Empresa *MiraVista Diagnostics – Beta-D Glucan Assay*)

Resultados falso-positivos em pacientes com bacteremia Gram positiva e negativa (37%) e aqueles que utilizaram antibióticos β-lactâmicos (33%) mostrou que esse teste diagnóstico pode ser limitado, apesar de ser útil quando em combinação com outros métodos diagnósticos complementares (Sulahian et al. 2014).

O biomarcador GM é um polissacarídeo característico de *Aspergillus* spp liberado durante o crescimento, sendo detectado por testes comercialmente disponíveis na circulação sanguínea, no soro, urina e BAL durante o crescimento do fungo no tecido (Azab et al. 2015). Por ser liberado pelo fungo constitutivamente, a GM pode ser um marcador de prognóstico e evolução da doença e/ou resposta ao tratamento. Diversos métodos imunoenzimáticos são utilizados para identificação de GM, porém o mais promissor é o ELISA sanduíche, por ser o mais sensível, capaz de detectar baixas concentrações deste polissacarídeo em amostras clínicas (Singh & Paterson 2005).

O teste de GM apresenta um resultado melhor de acordo com a população de pacientes, por exemplo, em pacientes transplantados ou com doenças hematológicas, a especificidade é em torno de 90%, quando detectado no líquido bronco-alveolar (Fisher et al. 2014, Powers-Fletcher & Hanson 2016). Em pacientes pediátricos, o teste pode produzir falso-positivos em torno de 80% dos casos, fato associado ao aleitamento materno, bacteremia ou uso de antibióticos (Powers-Fletcher & Hanson 2016). Além disso, a GM apresenta reações cruzadas com antígenos de vários fungos, já que o polissacarídeo manana é encontrado na parede de diversos fungos.

Nas últimas décadas, ensaios de PCR emergiram como abordagens experimentais promissoras para detectar patógenos fúngicos. O uso de PCR pode ser de grande valia na prática clínica, visto que pode orientar a terapia preventiva (Azab et al. 2015, Powers-Fletcher & Hanson 2016, Rampini et al. 2016).

Em fungos, a amplificação gênica por PCR comumente envolve regiões 18S, 5.8S e 28S, que codificam para RNA ribossômico (rRNA) e áreas variáveis da sequência de DNA de regiões intervenientes internas de espaçadores transcritos, denominadas ITS1 e ITS2 (Zeller et al. 2017).

Além de PCR, uma variedade de métodos moleculares incluindo sequenciamento de DNA, microarranjos e espectrometria de massa por ionização e desorção a laser assistida por matriz (MALDI) vêm sendo usadas para desenvolver ensaios de detecção molecular de ampla faixa (Powers-Fletcher & Hanson 2016). Entretanto, a abordagem mais comum para a detecção molecular é a PCR, seguida do sequenciamento de Sanger e a PCR em tempo real, visto que pode ser particularmente útil, quando a cultura fúngica é negativa, ou não é solicitada no momento em que a biópsia tecidual foi realizada (Buitrago et al. 2013).

No entanto, existem desafios associados a esses métodos, incluindo o risco de resultados falso-positivos, devido à contaminação ou reatividade cruzada, bem como falso-negativos, devido à baixa sensibilidade do ensaio. Como regra geral, nenhum teste de diagnóstico laboratorial deve ser usado como um teste independente para o diagnóstico de IFI. Para o diagnóstico fúngico além dos testes laboratoriais vários fatores devem ser considerados, como por exemplo, dados epidemiológicos, exames de imagem, história clínica e exame físico do paciente visando otimizar a identificação do patógeno e minimizar as condições de risco (Powers-Fletcher & Hanson 2016).

1.1.3. Tratamento de IFI

Nos últimos 30 anos, as doenças causadas por fungos aumentaram dramaticamente (Roemer & Krysan 2014). Por outro lado, a maioria das opções terapêuticas disponíveis é inacessível, tóxica ou ineficientes, o que torna inquestionável a importância da busca por novos antifúngicos (Rodrigues et al. 2018).

Atualmente, existem quatro classes principais de fármacos antifúngicos que incluem: os azóis, os polienos, análogos de pirimidinas e as equinocandinas (Figura 3). Várias outras classes, como, morfolinas e alilaminas, são usadas apenas como agentes tópicos devido à baixa eficácia ou efeitos adversos graves, quando administradas sistemicamente.

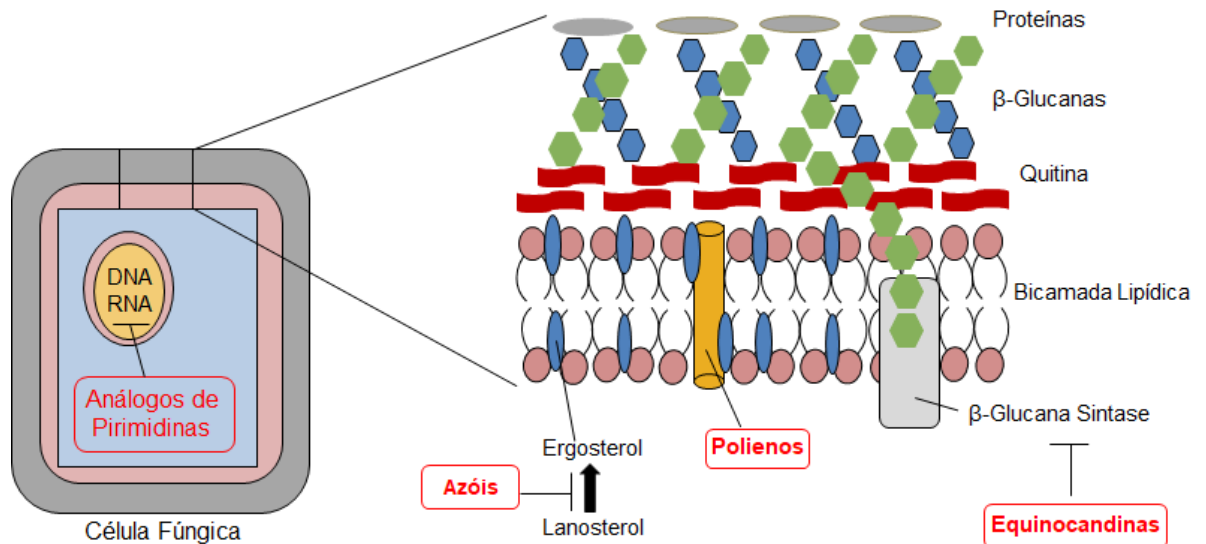


Figura 3: Exemplos de mecanismos de ação dos principais antifúngicos.

Fluoropirimidinas agem na síntese de ácidos nucleicos, enquanto os azóis e polienos, têm como sitio de ação o ergosterol da membrana plasmática. As equinocandinas agem na síntese de β-glucana sintase (modificado de York et al 2015).

Os azóis são os antifúngicos mais utilizados na prática clínica. Esses fármacos apresentam como alvo a via biosintética do ergosterol, atuando principalmente através da inibição de uma enzima chave, a lanosterol 14 α demetilase, codificada pelo gene *ERG11* (Pelleschi Taborda et al. 2017).

O Fluconazol (FLC) e o itraconazol, azóis administrados na clínica, desde a década de 90, vêm sendo usados no tratamento de diversas IFI, devido ao seu alto poder de absorção e uma baixa toxicidade quando comparada aos polienos (Vandeputte et al. 2012). Entretanto, esses antifúngicos apresentam interações com outros fármacos utilizados na quimioterapia ou no tratamento da AIDS (Edith Albengres, Hervé Le Louët & Tillement 1998, Vandeputte et al. 2012). Além disso, itraconazol e fluconazol são ineficazes contra alguns patógenos emergentes do gênero *Scedosporium*, *Fusarium* e *Mucorales* (Denning et al. 1997). É, ainda, crescente a percepção de que o fenômeno de resistência fúngica aos azóis está em expansão (Vandeputte et al. 2012). Outros fármacos dessa classe estão em desenvolvimento, como os triazóis de nova geração e alguns já aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (Pelleschi Taborda et al. 2017).

A classe dos polienos compreende mais de 200 moléculas, a maioria delas sendo produzidos pela bactéria *Streptomyces*, contudo, apenas três possuem aplicação clínica, a saber: anfotericina B (AmB), nistatina e natamicina (Vandeputte

et al. 2012). Esses compostos se complexam com o ergosterol na membrana plasmática (Pelleschi Taborda et al. 2017), pois apresentam caráter anfífilica que permite a inserção na bicamada lipídica, seguida da formação de poros e desintegração da permeabilidade da membrana. Tal ação promove a desestabilização da membrana plasmática com consequente vazamento de componentes intracelulares, resultando em lise celular (Lemke F Kiderlen O Kayser Amphotericin B 2005). Os polienos se ligam com menor afinidade ao colesterol, análogo do ergosterol em células humanas. A ligação ao colesterol explica sua alta toxicidade e consequentes efeitos colaterais (Spitzer et al. 2017). Nesse sentido, a AmB é amplamente usada em infecções sistêmicas, ao contrário de nistatina e natamicina que, extremamente tóxicas, são usadas apenas topicamente em infecções do trato vaginal e cutâneo (Zotchev 2012).

A AmB tem má absorção através do trato gastrointestinal, acarretando a necessidade de administração por via intravenosa associada a efeitos adversos severos, principalmente, nos rins e no fígado (Alvarez et al. 2017). Além disso, efeitos colaterais como náusea, vômitos e febre são comuns, mas o efeito mais grave é a nefrotoxicidade (Steimbach et al. 2017). Formulações de AmB, como os complexos lipossômicos de AmB, minimizaram esses efeitos colaterais, porém elevaram o custo do fármaco (Hamill 2013, Borba et al. 2018).

As fluoropirimidinas inibem a síntese de ácidos nucleicos e são utilizados em geral em associação com outros antifúngicos visando minimizar casos de resistência (Mukherjee et al. 2005, Thorn et al. 2011). O padrão ouro atual para o tratamento da meningoencefalite por *Cryptococcus* é a combinação da AmB com a 5-flucitosina (5-FC). A associação desses fármacos minimiza a nefrotoxicidade da AmB e permite a sua administração em doses mais baixas e por um menor período de tempo, além de reduzir o desenvolvimento de resistência a 5-FC (Alvarez et al. 2017). Cabe ressaltar que a 5-FC não está disponível no Brasil, o que limita o acesso de pacientes brasileiros a este tratamento.

As equinocandinas são inibidores não competitivos da β (1,3) - glucana sintase, uma enzima que catalisa a polimerização da uridina difosfato-glicose em β (1-3) glucana, um dos componentes estruturais responsáveis pela manutenção da integridade da parede celular dos fungos (Fesel & Zuccaro 2016). A inibição da β (1-3) - glucana sintase leva à desestabilização da parede celular e, ao extravasamento de componentes intracelulares, resultando em lise celular (Kurtz & Douglas 1997, Odds et al. 2003). Porém, vários patógenos fúngicos são parcialmente ou totalmente resistentes à ação das equinocandinas, incluindo *C. neoformans* e *C. gattii* ou

espécies pertencentes aos gêneros *Trichophyton* e *Fusarium*, além de *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium prolificans* e *Cladophialophora bantiana* (Vandeputte et al. 2012). No entanto, as equinocandinas constituem uma boa alternativa para combater as demais infecções fúngicas. A maioria dos tratamentos com falha na terapia clássica com azólicos ou polienos se utiliza, com sucesso, das equinocandinas.

Na busca de alternativas que diminuam os efeitos adversos dos tratamentos antifúngicos, o uso de anticorpos monoclonais em modelos de infecções fúngicas é considerado altamente promissor, visto que pode se ligar com alta especificidade a antígenos expressos em fungos nos fluidos corporais do paciente, sendo ainda ferramentas-chave no campo do diagnóstico clínico.

1.2. Anticorpos Monoclonais

Anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas secretadas por células B que apresentam a capacidade de identificar e/ou neutralizar organismos, ou antígenos estranhos ao sistema imune do hospedeiro (Abbas et al. 2015). As Igs são formadas por duas cadeias proteicas pesadas e duas cadeias leves, as quais possuem regiões variáveis, que participam do reconhecimento de antígenos e, as regiões constantes, que exercem a função efetora da molécula (Abbas et al. 2015).

A diversidade dos anticorpos se dá pela variabilidade nas sequências de aminoácidos da região variável das cadeias leve e pesada. As regiões determinantes de complementaridade (CDR) consistem de sequências hipervariáveis que entram em contato direto com o antígeno a ser reconhecido (Abbas et al. 2015).

Os anticorpos podem ser divididos em classes e subclasses distintas, os denominados isotipos (Abbas et al. 2015). As classes de Igs são IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, com subdivisão em humanos dos isotipos IgA e IgG em IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, cada um exercendo funções efetoras diferentes (Abbas et al. 2015).

Os anticorpos monoclonais (AcM) foram desenvolvidos pela primeira vez em 1975 por Georges Köhler e César Milstein através da produção de célula híbrida, denominada hibridoma, resultante da fusão de duas células diferentes (Köhler & Milstein 2005). O hibridoma decorre da fusão de um linfócito B (previamente

imunizado com o antígeno de interesse) com células de mieloma, gerando uma célula imortal e produtora de AcM (Figura 4).

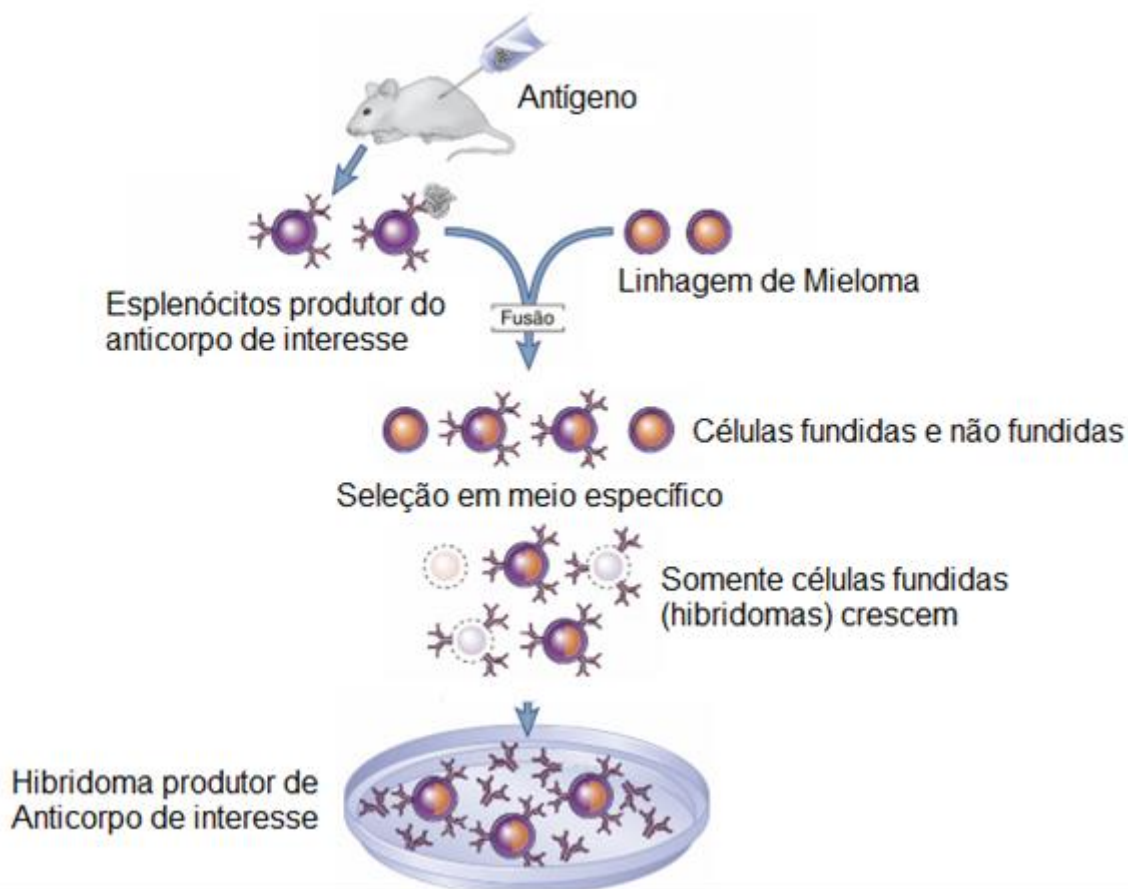


Figura 4: Desenvolvimento de AcM através da técnica de hibridoma. Linfócitos B fusionados com células de mieloma murino geram hibridomas, que são células imortais produtoras de anticorpos, que, posteriormente, são selecionados por técnicas de imunoensaio, para eleger o melhor clone produtor do AcM em estudo. Figura adaptada de Abbas et al 2015.

Os AcMs apresentam diversas aplicações nos campos de diagnóstico e terapia, podendo ser usados não apenas para doenças infecciosas causadas por fungos, bactérias, vírus e protozoários, mas também para doenças autoimunes e tumores, considerando suas altas sensibilidade e especificidade (Dos Santos et al. 2018). Nos últimos 30 anos, cerca de 80 AcMs foram aprovados pelo FDA para tratamento de diversas doenças, incluindo câncer, doenças inflamatórias crônicas, doenças neurodegenerativas e doenças infecciosas (Kaplon & Reichert 2019).

O imunodiagnóstico de doenças infecciosas melhorou significativamente após o advento da tecnologia de hibridomas, já que os AcMs superam as limitações dos anticorpos policlonais e permitem a identificação de apenas um antígeno gerando resultados reprodutíveis e consistentes (Casadevall & Pirofski 2012a)

A utilização de AcM contra fungos patogênicos vem sendo cada vez mais frequente. Anticorpos com potencial terapêutico foram desenvolvidos contra antígenos como histona 2B de *H. capsulatum* (Nosanchuk et al. 2003), β -glucanas de *C. albicans* e *A. fumigatus* (Guerriero et al. 2019), glicosilceramida de *C. neoformans* (Rodrigues et al. 2007), melanina de *C. neoformans* e *H. capsulatum* (Ngel et al. 2001, Guimarães et al. 2011), e proteínas de choque térmico de *H. capsulatum* (Guimarães et al. 2009a). Anticorpos com uso diagnóstico incluem aqueles reativos contra os antígenos M e H de *H. capsulatum* e contra o antígeno de *Cryptococcus* (CrAg) (Kauffman 2007, Huang et al. 2015).

A administração de AcM no tratamento de IFI depende de diversos fatores, que incluem, necessariamente, o isotipo do AcM, seu título, apresentação via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e, especialmente, a ativação de células imunes (Rivera et al. 2005).

Os AcMs podem mediar três efeitos diferentes sobre os fungos: protetor, inibindo o crescimento celular; neutralizador de virulência, inibindo a liberação de proteínas ou polissacarídeos fúngicos e imunomodulador, que no caso de *C. neoformans* atua como um amplificador da infecção fúngica, uma vez que dentro de fagócitos o fungo pode disseminar e alcançar outros órgãos (Casadevall & Pirofski 2012a). Esses efeitos estão ilustrados na Figura 5.

Os AcMs podem agir de forma indireta na proteção contra IFI, através de promoção de fagocitose, ativação do sistema complemento, regulação de citotoxicidade, e maturação do fagossomo (Posch et al. 2017). Podem ainda afetar de forma direta a formação de biofilme (Martinez & Casadevall 2005a), liberação de polissacarídeos (Martinez et al. 2004), dimorfismo (Moragues et al. 2003), expressão gênica (Casadevall & Pirofski 2012b) e transdução de sinal (Posch et al. 2017).

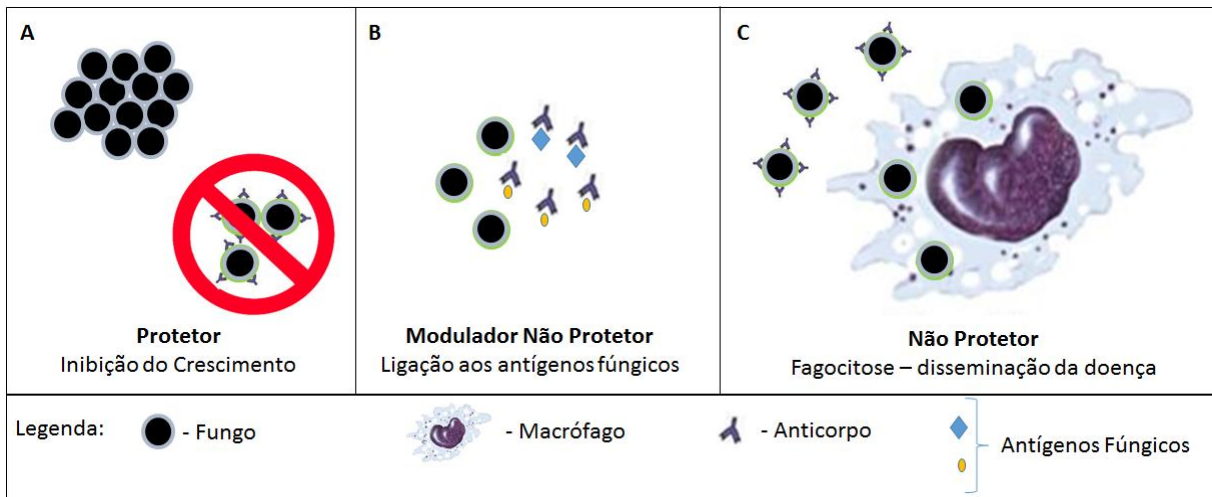


Figura 5: Os mecanismos propostos de ação do anticorpo contra fungos. A) inibição direta do crescimento, B) neutralização dos efeitos indesejáveis dos produtos fúngicos nos tecidos do hospedeiro e C) imunomodulação e potenciação dos mecanismos imunes inatos, que no caso de *C. neoformans* não são protetores.

Estudos imunoterapêuticos caracterizaram AcMs protetores contra diversos alvos e diferentes espécies fúngicas como: β -1,3 glucana - *A. fumigatus* (Torosantucci et al. 2009), proteína da parede celular de seqüência semelhante à aglutinina (Als3, do inglês agglutinin-like sequence) - *C. albicans* (Brena et al. 2007), proteína de choque térmico (Hsp 60, do inglês, *heat-shock protein*) - *H. capsulatum* (Guimarães et al. 2009b), GXM - *C. neoformans* (Beenhouwer et al. 2007), glicoproteína de 43kDa (gp43) - *P. brasiliensis* (Buissa-Filho et al. 2008) e o antígeno de 55 kDa (p55) - *Pneumocystis* spp (Smulian et al. 2000). Esses estudos demonstraram que alguns antígenos fúngicos induzem a proteção mediada por anticorpos durante infecções fúngicas.

Alguns desses antígenos por serem conservados são alvos de AcMs para diferentes fungos. Diante desse cenário, a quitina, um polímero de N-acetilglucosamina, um dos principais constituintes da parede celular fúngica, também é um potencial alvo para os AcMs como uma nova estratégia terapêutica.

2. JUSTIFICATIVA

Nas últimas três décadas, os fungos tem sido um dos principais agentes causadores de doenças, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos, constituindo um sério e subestimado problema de saúde pública (Rajasingham et al. 2017). Aliado a isso, o fenômeno da resistência a drogas é responsável por um aumento significativo na morbi e mortalidade de indivíduos infectados ao redor do mundo.

Existe uma demanda médica crescente e urgente para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos que sejam eficazes, seguros, de amplo espectro e que apresentem baixa toxicidade ao hospedeiro. Porém, as principais linhas de pesquisa visam novas classes de substâncias farmacêuticas que atuem diretamente no microrganismo ou que apresentem resultados sinérgicos com os fármacos antifúngicos comumente utilizados na rotina.

Este projeto visou produzir e analisar o uso de AcM contra oligômeros de quitina para diagnóstico de infecções fúngicas, bem como seu potencial terapêutico. O possível sinergismo terapêutico dos AcM com AmB em modelos experimentais de criptococose foi avaliado, uma vez que dados prévios do grupo demonstraram em modelo murino de infecção por *C. neoformans* que o bloqueio de quito oligômeros foi capaz de promover um aumento na sobrevivência de camundongos letalmente infectados (Fonseca et al. 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Desenvolver e caracterizar AcM contra quitooligômeros fúngicos

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver anticorpo monoclonal murino contra quitooligômeros utilizando a tecnologia de hibridoma;
- Caracterizar o AcM quanto ao isotipo, a sequência das regiões variáveis da cadeia leve e pesada e a constante de afinidade de ligação ao antígeno;
- Validar a atividade direta (in vitro) dos AcMs anti -quitooligômero;
- Avaliar in vitro a ação dos AcMs no crescimento, na formação de biofilme e melanização;
- Avaliar a atividade terapêutica in vivo dos AcMs em combinação com a AmB em modelo murino de infecção por *Cryptococcus neoformans*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Desenho experimental

O desenho experimental proposto para essa tese está sumarizado na figura 6.

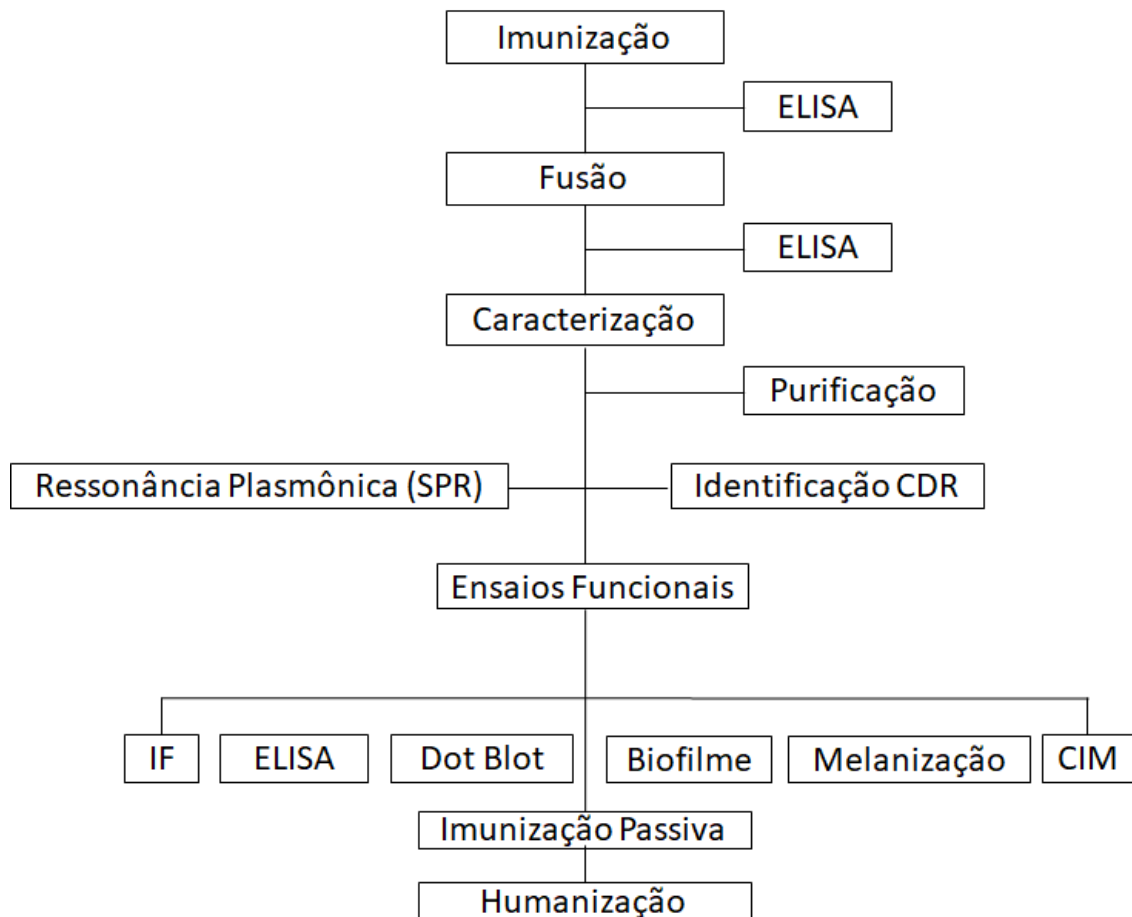


Figura 6: Organograma de experimentação para desenvolvimento, caracterização e validação biológica dos AcMs anti-quitooligômero.

4.2. Tipos celulares e condições de crescimento

As espécies de fungos utilizadas foram *C. neoformans* (sorotipo A, isolado clínico H99 (American Type Culture Collection - ATCC 208821), *C. gatti* (sorotipo B, cepa R265 ATCC MYA-4093), *C. albicans* (ATCC 90028), *C. neoformans* acapsular (mutante *Cap67* ATCC 52817), *Giardia lamblia* (ATCC 30957), célula de linhagem pulmonar humana A549 (ATCC CCL-185), *Escherichia coli* (ATCC 9637) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os microrganismos foram mantidos em agar Sabouraud. Para os ensaios *in vitro* e *in vivo*, as células foram cultivadas em meio

mínimo (glicose 15 mM, MgSO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 29,4 mM, glicina 13 mM, tiamina-HCl 3 µM, pH 5,5) e mantidas sob agitação por 2 dias a 30°C. As células foram obtidas por centrifugação, lavadas em PBS e contadas em câmara de Neubauer.

Para a formação de células híbridas foi utilizada a linhagem de mieloma SP2/0 (Sp2/0-Ag14 (ATCC® CRL-1581™)). As células foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (LONZA®)/Glutamina 6,4 mM/SFB 10%. Todo o conteúdo foi transferido para garrafa do tipo T 25cm² (Corning®) e incubado aa 37°C/5% CO₂ até atingir viabilidade necessária (Köhler & Milstein 2005).

4.3. Imunização dos animais

Camundongos da linhagem Balb/C foram imunizados com o antígeno alvo intraperitonealmente (i.p.) a cada 14 dias seguindo modelo de histoplasma com algumas adaptações (Guimarães et al. 2009c). Para tal foram utilizadas duas estratégias diferentes: primeiramente, os animais foram imunizados via i.p. com *C. gattii* (1x10⁶ céls/mL) previamente fixado em paraformaldeído (PFA) 4% e lavado em tampão fosfato salina (PBS) a 10 mM e pH 7,4 , seguido de duas imunizações via i.p. com intervalo de 14 dias com 200 µg de quitotriose (trímero de moléculas compostas por unidades de β-1,4-*N*-acetilglucosamina - β-1,4-GlcNAc – quitotriose – SIGMA – T2144) livre, utilizando como adjuvante hidróxido de alumínio (AlOH₃ – 1,5 mg), na proporção de 1:1 (v/v). Finalmente, os animais foram imunizados por via intravenosa (i.v.) com 50 µg de quitotriose livre, utilizando PBS como veículo. A segunda estratégia foi idêntica, exceto pela introdução de uma imunização adicional com quitotriose livre antes da injeção final i.v. Em ambas as estratégias foram realizadas a sangria ao final das imunizações para verificar o título sérico dos anticorpos através de ELISA indireto. O soro pré-imune de todos os animais foram utilizados como controle e *cut-off* para a triagem.

4.4. Fusão

Após quatro imunizações foi realizada a esplenectomia dos animais e o processamento dos esplenócitos para a execução da fusão celular com células mielômicas murinas SP2/0 (ATCC) (Köhler & Milstein 2005)

Os esplenócitos e as SP2/0 foram fusionados com o auxílio da solução de polietilenoglicol (PEG) 3000-3700 a 50%, pré-aquecido a 37 °C. Posteriormente, o homogenato de células foi avolumado em meio DMEM / Glutamina 6,4 mM / solução de antibiótico e antimicótico 1x – 100 unidades/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (ATB) / 1x soro fetal bovino (SFB) 20% em uma proporção de 1×10^8 células/100 mL. Todo o volume da suspensão foi transferido para placas de 96 poços no volume de 100 µL/poço. Três poços foram reservados como controle do meio de seleção (DMEM com hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT)), aos quais foram adicionadas 6×10^4 células SP2/0. As placas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂ por 24 horas. Após a incubação inicial, 100 µL de meio de seleção (DMEM/Glutamina 6,4 mM/ATB 1x/SFB 20%/HAT 2x) foram adicionados aos poços para o início do processo de seleção das células híbridas viáveis. Após 14 dias, os sobrenadantes de cultivo foram utilizados para o ensaio de ELISA indireto específico contra quitotriose.

4.5. ELISA indireto

Ensaio de ELISA indireto foram realizados com dois objetivos. Primeiramente para definição do título sérico dos anticorpos ao final do processo de imunização e também para determinação de anticorpos policlonal e monoclonal para quitotriose produzidos pelo hibridoma (Saeed et al. 2017).

4.5.1. ELISA para definição de títulos séricos. A placa de 96 poços foi revestida com quitotriose complexada com albumina bovina sérica (quitotriose-BSA) na concentração de 0,5 µg/mL em PBS e incubada durante a noite a 4 °C. Posteriormente, a placa foi incubada com PBS/BSA 1% por 1 h a 37 °C seguida de lavagem com PBS/Tween 0,05%. Os soros dos animais foram adicionados em diferentes diluições e incubados por 2 h a 37 °C. A placa foi lavada três vezes com PBS/Tween 0,05% com posterior adição de anticorpos anti-IgG e anti-IgM murinas conjugado a peroxidase por 2 h a 37 °C. As placas foram então lavadas como anteriormente descrito e incubadas com tetrametilbenzidina (TMB) por 30 min a 37 °C. A reação foi interrompida com HCl 1 N e as leituras espectrofotométricas foram obtidas em comprimento a 450 nm. As reações consideradas positivas foram aquelas com valores de absorvância correspondentes a 3 vezes o cut-off, sem adição de anticorpos primários.

4.5.2. ELISA para determinação de reatividade de anticorpos policlonal e monoclonal. Para este ensaio foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, com a diferença que o anticorpo primário da reação foi oriundo do sobrenadante de cultivo do hibridomas.

4.6. Clonagem dos hibridomas policlonais

A clonagem dos hibridomas policlonais positivos no ensaio de ELISA foi realizada através de diluição limitante ao qual se tem por objetivo gerar uma densidade de 1 célula/poço, em um volume final de 200 µL (Lopes et al. 2010). As células foram incubadas a 37 °C, em atmosfera de CO₂ 5% por 14 dias e foram observadas a clonalidade (monoclonal ou policlonal) a partir do 5º dia. Os cultivos que se mantiverem viáveis e monoclonais foram novamente submetidos ao ensaio de ELISA para verificar a especificidade frente ao antígeno em estudo. As reações consideradas positivas foram aquelas com valores de absorbância correspondentes a 3 vezes o *cut-off*, sem adição de anticorpos primários.

4.7. Isotipagem dos clones selecionados

A isotipagem dos clones previamente selecionados por ELISA foi feita através do *kit* comercial - *Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping* – ThermoFisher. O kit determina a presença dos isotipos murinos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM na amostra de forma rápida e eficiente.

4.8. Purificação dos Anticorpos Monoclonais

A purificação dos AcMs se deu em três fases: precipitação por PEG, cromatografia de exclusão molecular e cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular e de troca iônica (AKTA Purifier 10; GE Healthcare).

A precipitação por PEG foi realizada submetendo o sobrenadante do cultivo a precipitação com PEG 6000 na concentração de 4% (p/v). A suspensão foi mantida sob agitação por 3 h à temperatura ambiente e, em seguida submetida a centrifugação do material (1600 × *g*; 30 min a 4°C).

O sobrenadante obtido após a centrifugação foi submetido a uma segunda etapa de precipitação com PEG 6000 na concentração de 6% (p/v), seguida de

centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. O precipitado obtido foi dissolvido no volume de 15 mL de solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

O material obtido após a segunda precipitação foi fracionado através da cromatografia de exclusão molecular (SEC) utilizando a coluna Superdex 200 High Load 26 x 600 mm (320 mL) com fluxo de 3,0 mL/min, sendo utilizado como eluente a solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, com volume de coleta igual a 10 mL/tubo.

Após a seleção e *pool* das amostras provenientes da SEC foi realizada a cromatografia de troca aniônica em coluna Poros HQ 10 x 100 mm. A eluição das frações foi realizada em fluxo de 5,0 mL/min com solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 em gradiente com salina 20 e 50 %. As frações foram coletadas com volume de 4,0 mL/tubo.

A homogeneidade das amostras obtidas em cada etapa do processo de purificação foi avaliada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) em uma voltagem constante de 200 volts por 45 min (Preserve & Flora Sherman 2011). Para a estimativa do peso molecular (PM), foi utilizado o padrão comercial Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad). As proteínas foram reveladas com solução corante Coomassie Blue R350 e o resultado analisado através do software Image Lab™, após o processamento da imagem no sistema Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad).

4.9. Extração de RNA dos clones selecionados

As células de cada clone positivo foram recolhidas por meio de centrifugação ($400 \times g$ por 10 min a temperatura ambiente) e o RNA extraído com o kit comercial *RNeasy Mini* (Qiagen), seguindo protocolo estabelecido pelo fabricante.

4.10. Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa (RT-PCR)

Inicialmente, foi realizada a síntese de cDNA dos clones/monoclonais a partir do RNA através do kit comercial *Super Script III First-Strand Synthesis System* (INVITROGEN). Posteriormente, foi realizada a PCR com os oligonucleotídeos iniciadores universais para a VH e VL murino (Zhou et al. 1994) (Tabela 2).

A RT-PCR foi feita sob as seguintes condições (Wang et al. 2000): desnaturação inicial 94 °C/5 min, desnaturação 94 °C/2 min, anelamento 48 °C/1 min, extensão 72 °C/1 min e 30 seg. Os ciclos foram repetidos por 30 vezes e

extensão final 72 °C/1 min para cadeia VH e as mesmas condições para VL, porém com a temperatura de anelamento de 55 °C/1 min. A visualização das bandas foi feita em gel de agarose 1,5% no tamanho de aproximadamente 570 pb para VH e 370 pb para VL e revelado por GelRed (BIOTIUM).

Tabela 2: Oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de RT-PCR para amplificação dos cDNAs codificadores para VH e VL murinas a partir da extremidade 5'.

VH-Fw	Sequência
307	5'ATG(GA)A(GC)TT(GC)(TG)GG(TC)T(AC)A(AG)CT(GT)G(GA)TT3'
308	5'ATG(GA)AATG(GC)A(GC)CTGGGT(CT)(TA)T(TC)CTCT3'
309	5'GATGTGAAGCTTCAGGAGTC3'
310	5'CAGGTGCAGCTGAAGGAGTC3'
311	5'CAGGTGCAGCTGAAGCAGTC3'
312	5'CAGGTTACTCTGAAAGAGTC3'
319	5'GAGGTCCAGCTGCAACAATCT3'
320	5'GAGGTCCAGCTGCAGCAGTC3'
321	5'CAGGTCCAAGTGCAGCAGCT3'
322	5'GAGGTGAAGCTGGTGGAGTC3'
324	5'GATGTGAACTTGGAAAGTGTC3'
VH-Rev	
Y 1	5'TGGACAGGGATCCAGAGTTCCAGGTCCT3'
VL-Fw	
353	5'GACATTGTGATGACCCAGTCT3'
362	5'GATGTTTTGATGACCCAAACT3'
364	5'GATATTGTGATAACCCAG3'
365	5'GACATTGTGCTGACCCAATCT3'
390	5'GATATTGTGCTAACTCAGTCT3'
391	5'GATATCCAGATGACACAGACT3'
392	5'GACATCCAGCTGACTCAGTCT3'
393	5'CAAATTGTTCTCACCCAGTCT3'
394	5'CAGGCTGTTGTGACTCAGGAA3'
VL-Rev	
K-18	5'TACAGTTGGTGCAGCATC3'

Fw- Forward; Rev – Reverse

4.11. Sequenciamento dos clones/monoclonais selecionados

O sequenciamento dos monoclonais selecionados foi feito de acordo com o protocolo descrito no kit comercial *BigDye Terminator v3.1* (Life Technologies) e para tal foram utilizados os mesmos primers descritos para PCR. As sequências foram analisadas usando o programa SeqMan (DNASStar) e para identificação dos CDR1, 2 e 3, as sequências gênicas foram submetidas a análise pela ferramenta IgBlast (IgBlast Tool – NCBI – NIH; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) através do banco de dados de Kabat (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

4.12. Determinação de constante de afinidade e dissociação por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

Os experimentos de SPR foram realizados usando o sistema BIACORE X (GE Healthcare) equipado com um *chip sensor* CM5. Os ligantes testados foram os AcMs AF1/CC5 e HC6/DD11, aos quais foram imobilizados usando química de acoplamento por amina (*Biacore X 202AD*). As superfícies das duas células de fluxo foram ativadas por 7 min com uma mistura 1: 1 de 0,1 M N-hidroxissuccinimida (NHS) e 0,1 M 3- (N, N-dimetilamino) propil-N-etilcarbodiimida (EDC) em uma taxa de fluxo de 10 µL/min. Os ligantes foram imobilizados na concentração de 100 µg/mL em acetato de sódio a 10 mM, pH 5,0. Os resíduos de ésteres foram desativados com uma injeção de 7 min de etanolamina 1 M, pH 8,0.

Para coletar dados de ligação cinética, o analito BSA-GlcNAc foi injetado sobre as duas células de fluxo em concentrações de 0,1 e 0,6 nM em uma taxa de fluxo de 5 µL/min a 25 °C utilizando tampão HBS-EP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA e 0,005% P20) pH 7,4.

Os dados foram ajustados mediante concentração em um modelo simples de interação (1:1) do ligante e do analito usando a opção de análise global de dados, que possibilita ajustar todos os gráficos obtidos simultaneamente. Todos os resultados foram analisados no software BiaEvaluation 4.1.

4.13. Ensaios funcionais

4.13.1. ELISA indireto com células íntegras. Para este teste foram utilizados *C. neoformans* (H99), *C. albicans*, *Giardia lamblia*, célula de linhagem pulmonar humana A549, *E. coli* e *Staphylococcus aureus*. As células fúngicas foram lavadas em PBS três vezes e suspensas na densidade de 10^7 células/mL em solução de poli-L-Lisina (5 $\mu\text{g/mL}$ em PBS) e colocadas em microplacas de poliestireno de 96 poços para adesão durante a noite a 4°C . No dia seguinte as placas foram bloqueadas com PBS/BSA 5% e incubadas por 1 h a 37°C para então serem incubadas por 2 h a 37°C com o AcM anti-quitooligômeros em faixas de concentração de 5 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, foi realizada a lavagem com PBS/Tween 0,05% por 3 vezes e a revelação realizada após adição de anti-IgM murino conjugado a peroxidase diluído 1:5000 e incubado por 2 h a 37°C . Após as lavagens foi adicionado TMB e as placas incubadas por 30 min a 37°C . A reação foi interrompida com HCl 1 N as leituras obtidas a 450nm (Stearns et al. 2016).

Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas (1:10) com densidades celulares variando entre 10^2 até 10^7 células/mL para os fungos e 10^4 até 10^7 células/mL para os outros tipos celulares. O AcM anti-quitooligômeros foi testado na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, conforme descrito anteriormente.

4.13.2. ELISA indireto de quitosana. O ensaio foi realizado conforme descrito anteriormente, no entanto, nas placas foram adicionadas diferentes concentrações (0,4 a 50 $\mu\text{g/mL}$ – diluições seriadas 1:2 – diluído em ácido acético) de quitosana (Merck – C3646), um derivado deacetilado de quitina. Para este teste a concentração de AcM utilizada foi de 25 $\mu\text{g/mL}$.

4.13.3. *Dot Blot* de células íntegras. Suspensões de *C. neoformans* (H99) e *C. albicans* com densidades variando entre 10^2 células/mL até 10^7 células/mL em solução de poli-L-Lisina 5 µg/mL em PBS. Dessas suspensões, 10 µL foram aplicados em membranas de nitrocelulose e realizado como no ensaio de ELISA com concentrações de 25 µg/mL dos AcM anti-quitooligômeros. A membrana foi cortada e depositada em placas de 96 poços, aos quais foram adicionados 50 µL de TMB. Os sistemas foram incubados por 30 min a 37 °C. Foi retirado 50 µL, transferido para uma nova placa e a reação foi interrompida com HCl 1 N. As leituras foram obtidas a 450nm (Nimrichter et al. 2007).

4.13.4. Ensaio para determinação do sítio de ligação. As placas de 96 poços foram revestidas com quitotriose-BSA na concentração de 0,5 µg/mL em PBS e incubadas durante a noite a 4 °C, seguido de incubação com PBS/BSA 1% por 1 h a 37°C. Posteriormente, foi realizada lavagem (PBS/Tween 0,05%) e adicionada uma solução de lectina de germe de trigo (WGA) conjugada a peroxidase na concentração de 25 µg/mL, utilizado como controle. Os anticorpos HC6/DD11 e AF1/CC5 foram testados na concentração de 25 µg/mL sem o bloqueio pela WGA, servindo como controle de reação. A WGA não conjugada (25 µg/mL) foi incubada por 1 h a 37 °C e, os sistemas posteriormente lavados três vezes com PBS/Tween 0,05%. Em seguida, os AcMs (25 µg/mL) foram adicionados e as placas incubadas por 2 h a 37 °C. Os sistemas foram lavados três vezes com PBS/Tween 0,05% e incubados por mais 2 h a 37 °C com anti-IgM murino conjugado a peroxidase (1:10000). A revelação das reações sorológicas foi realizada conforme detalhado anteriormente.

4.13.5. Ensaio de imunofluorescência dos AcMs anti-quitooligômero em células fúngicas. *C. albicans* (10^6 células) foram fixadas com PFA 4% durante 30 min e posteriormente bloqueadas com PBS/BSA 1% por 1h. Em seguida, foram incubadas com o AcM anti-quitooligômeros 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 1 h a 37 °C. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com anticorpo anti-IgM conjugado a Alexa 568 (SIGMA; 1:1000) (Rodrigues et al. 2008). Em seguida, as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com calcofluor 25 μM por 30 min a temperatura ambiente. As suspensões celulares foram transferidas para lâminas de vidro e analisadas em microscópio Olympus AX70, acoplado ao sistema de câmera (QImaging Retiga 1300). As imagens foram processadas com o software QCapture suíte V2.46.

4.13.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os valores da concentração inibitória mínima foram determinados usando os métodos propostos pelo Comitê Europeu de Ensaio de Suscetibilidade Antimicrobiana (do inglês, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST) com pequenas modificações. Células de *C. neoformans* foram cultivadas em RPMI 1640 tamponado com 3(n-morfolino) propanosulfônico (MOPS) em pH 7 na densidade de 10^5 células/poço em placas de 96 poços no volume final de 200 μL . Os sistemas foram suplementados com AcM na concentração (12,5; 6,25; 3,2; 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), AmB (0,1 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou FLC (8, 4 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), isolados ou AcM associado ao fármaco. Após 48 h de incubação a 37°C sob agitação e submetidas a leitura a 592 nm (Joffe et al. 2017). Foram consideradas para análise o CIM₁₀₀ de acordo com o controle dos antifúngicos utilizados na máxima concentração. A atividade sinérgica entre os AcMs e os antifúngicos padrões foi determinada com base no cálculo do índice inibitório fracionário (IIF) (Mor, V. et al, 2015).

4.13.7. Formação de biofilme. *C. neoformans* (H99 e Cap67) e *Candida albicans* foram cultivados em meio Sabouraud por 24 h a 30 °C. As suspensões celulares foram submetidas a centrifugação a $3000 \times g$ por 5 min, lavadas três vezes em PBS e suspensas em meio mínimo (tiamina 20 mg/mL, glucose 30 mm, glicina 26 mM, MgSO₄ 20 mM, e KH₂PO₄ 8,8 mM). Posteriormente, os fungos (1×10^6 /mL) foram adicionados em placas de 96 poços por 48 h a 37 °C na presença dos AcMs (HC6/DD11 e AF1/CC5) e do AcM anti-GXM 18B7 (apenas para H99) na concentração de 25 µg/mL, sob agitação por 30 min. Como controle, foi utilizado o fármaco AmB na concentração de 1 µg/mL (Joffe et al. 2017).

Dois sistemas foram preparados, um deles foi lavado para remoção de células não aderentes, enquanto o outro não foi submetido a lavagens, sendo desta forma quantificadas as células aderentes e não aderentes ao substrato poliestireno.

A atividade metabólica das células viáveis nos dois ensaios foi avaliada pelo método baseado na redução do 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT) em espectrofotômetro a 492nm.

4.13.8. Ensaio de melanização. O cultivo do *C. neoformans* foi realizado conforme descrito no item 4.13.7 e a suspensão celular (1×10^6 células/mL) foi cultivada por 72 h em meio mínimo suplementado com L-DOPA 1mM em placa de 96 poços (fundo em "U"). Ao meio mínimo foram adicionados os anticorpos HC6/DD11 e AF1/CC5 em faixa de concentração de 25 a 0,2 µg/mL diluídos 1:2. Os sistemas foram submetidos a centrifugação e a avaliação da produção de melanina em *C. neoformans* foi determinada por densitometria após a digitalização das imagens pelo equipamento iBright FL1000 Invitrogen (Walker et al. 2010).

4.13.9. Curva de sobrevivência. A capacidade de anticorpos anti-quitooligômeros de prorrogar a sobrevivência de animais infectados com doses letais de *C. neoformans* foi avaliada utilizando dois protocolos distintos.

Ensaio 1: Camundongos da linhagem Balb/C (n=7) foram desafiados letalmente via i.p. com 10^5 células em PBS de *C. neoformans* (amostra H99). Após 2 h, os animais foram tratados via i.p. com 100 µL de uma solução de AcM HC6/DD11 nas concentrações de 100, 250 ou 500 µg/mL. Como controle,

os animais foram tratados apenas com PBS. A curva de sobrevivência foi obtida até 90 dias após a infecção.

Ensaio 2: Camundongos da linhagem Balb/C (n=7) foram desafiados letalmente via i.p. com 10^5 células em PBS de *C. neoformans* (amostra H99). Após 2 h, os animais foram tratados com 100 μ L de uma solução de AmB (2,5 mg/kg e 0,25 mg/kg), 100 μ L de uma solução de AcM (85 μ g/mL) e 100 μ L de uma solução de combinada de AcM (85 μ g/ml) e AmB (0,25 mg/kg). Além disso, os tratamentos foram repetidos por mais 2 vezes em intervalos de 10 dias entre eles. Para os sistemas controles, os animais foram desafiados com 100 μ L de PBS, AmB (2,5 mg/kg) ou AcM (85 μ g/ml) (Liedke et al. 2017). Para a obtenção da curva de sobrevivência, a análise se estendeu até 90 dias após a infecção.

4.14. Modelagem Molecular

As sequências das regiões variáveis dos anticorpos HC6/DD11 e AF1/CC5 foram obtidas por sequenciamento e traduzidas para a obtenção das sequências de aminoácidos correspondentes utilizando a ferramenta de bioinformática ExPASy Translate tool (<https://web.expasy.org/translate/>).

A humanização das sequências foi realizada utilizando o banco de dados IMGT (<http://imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>) para se obter o repertório germinativo humano mais próximo (identidade percentual) das cadeias VH e VL.

As sequências humanizadas obtidas a partir do repertório humano mais próximo foram alinhadas separadamente utilizando a ferramenta blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) contra o banco de dados do PDB (Protein Data Bank - <https://www.rcsb.org>) para a seleção da proteína molde. A construção do modelo tridimensional foi feita utilizando o programa Modeller 9.19.

O refinamento das estruturas dos modelos de VH e VL murino e humanizados foram submetidos a análises estruturais nos servidores Molprobity e Verify 3D. As estruturas foram refinadas através da correção de rotâmeros incorretos e conformações dos ângulos phi e psi desfavoráveis, segundo o gráfico de Ramachandran utilizando o programa Coot. O posicionamento espacial de VH/VL GB2 foi determinado através do alinhamento de VH e VL com o modelo de anticorpo

neutralizante 5JHL (Código PDB) anti E-ZIKV utilizando o programa PyMol (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC).

4.15. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o *GraphPad Prism* versão 5.00. Utilizou-se *Two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni para comparação individual entre os grupos, com intervalo de confiança de 95% foram utilizados para todos os experimentos. Para os ensaios e sobrevivência, as diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

5. CONSIDERAÇÕES SOBRE ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto possui protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação da Fiocruz sob a licença LW-13/16. Os animais utilizados são provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL/FIOCRUZ) e os ensaios foram realizados no Laboratório de Experimentação Animal de Bio-Manguinhos, seguindo todas as normas éticas previstas pela legislação vigente.

6. RESULTADOS

6.1. Desenvolvimento de anticorpo monoclonal murino para quitooligômero através da tecnologia de hibridoma

6.1.1. Titulação dos animais imunizados contra *C. gattii* e quitotriose

Duas estratégias de imunização foram desenvolvidas e, em ambas, foi realizada sangria ao final da última imunização para verificar o título sérico dos anticorpos (Figura 7). Independente da estratégia adotada, foi obtido o título de 1:3200, tanto para IgG quanto para IgM dosados no soro, sendo utilizado para triagem a quitotriose-BSA. Para estabelecimento de linha de corte, foram utilizados os valores de absorbância obtidos em reações com o soro pré-imune. Para o ensaio de fusão foram selecionados três animais.

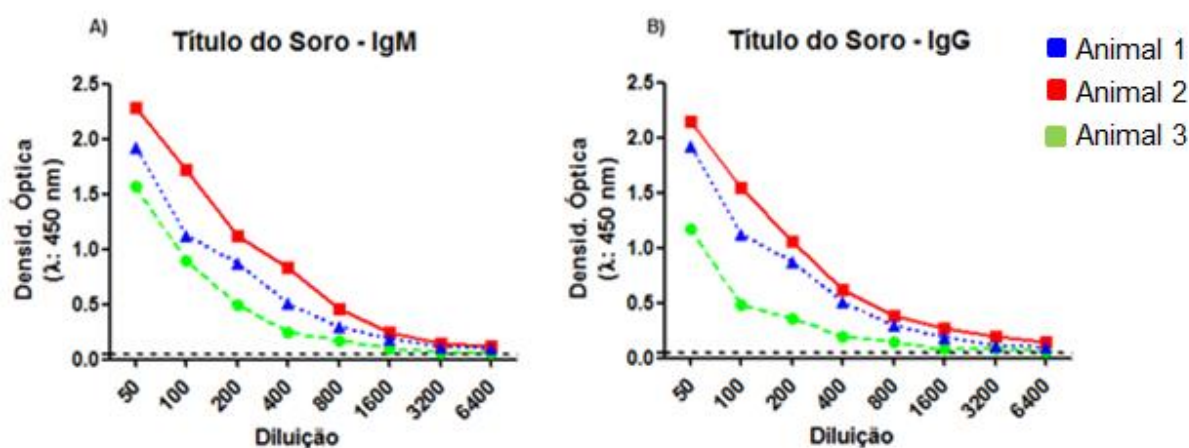


Figura 7: Curva de titulação de anticorpos séricos de camundongos obtida por ELISA. Camundongos Balb/C foram imunizados com *C. gattii* via i.p. e quitotriose via i.p. e i.v.. O título sérico dos anticorpos dos animais imunizados foi dosado ao final das imunizações. (A) Título do soro para Imunoglobulina M (IgM); (B) Título do Soro para IgG. As curvas em vermelho, azul e verde representam animais distintos. Linha tracejada representa a linha de corte do soro pré-imune.

6.1.2. Seleção de hibridomas produtores de AcM por ELISA

A partir da esplenectomia dos 3 animais foram realizadas 3 fusões. Os esplenócitos foram fusionados com Sp2/0 e foram obtidos 172 hibridomas, 4 dos quais produzindo anticorpos reativos contra quitotriose. Os 4 hibridomas produtores de anticorpos policlonais foram submetidos a clonagem, gerando 541 hibridomas produtores de AcMs. Nesse grupo, foram selecionados 58 hibridomas reativos contra quitotriose, sendo, finalmente, selecionados para estudos posteriores os 10 hibridomas que apresentaram maior resposta (densidade óptica - D.O. $\geq 3x$ *cut-off*) em testes de ELISA usando quitotriose-BSA como antígeno primário.

Dos 10 hibridomas (banco mestre) congelados, 9 mantiveram a capacidade produtora de AcM quando foram descongelados, sendo esses selecionados para análises posteriores (Figura 8).

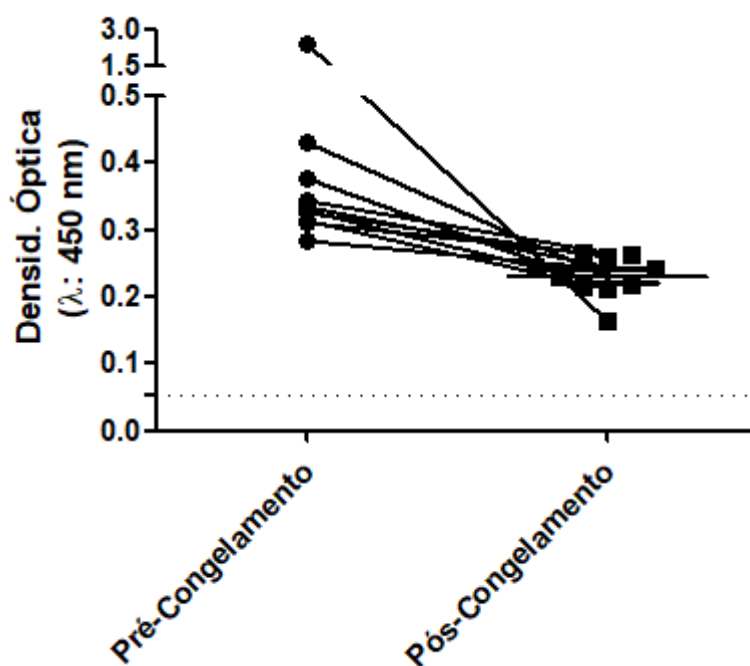


Figura 8: Clonagem dos hibridomas. Os esplenócitos foram incubados a 37°C, em CO₂ por 14 dias e a clonagem por diluição limitante monitorada a partir do 5º dia. Os cultivos viáveis e monoclonais foram submetidos ao ensaio de ELISA conforme detalhado em Materiais e Métodos. O gráfico representa os valores de densidade óptica dos 10 hibridomas gerados pré- e pós- congelamento.

6.1.3. Isotipagem dos AcMs selecionados

Os 9 AcMs selecionados pela técnica de ELISA indireto foram isotipados através de kit comercial. Todos os AcMs foram identificados como IgMs com cadeia leve kappa, visto que apresentaram um sinal 3 vezes maior que o controle positivo para cada subtipo de anticorpo (Figura 9).

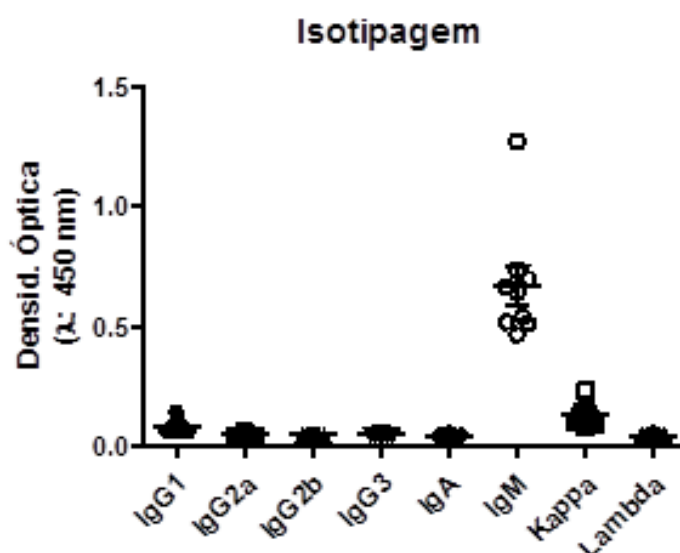


Figura 9: Isotipagem dos AcMs selecionados. O ensaio foi realizado utilizando o kit de ELISA indireto que determinou a presença dos diferentes isotipos de imunoglobulinas (Igs) dos 9 AcMs selecionados.

6.1.4. Purificação dos AcMs

Após purificação por PEG, cromatografia líquida de alta eficiência e troca iônica os 9 AcMs foram analisados em SDS-PAGE (Figura 10).

Todas as alíquotas apresentaram duas bandas principais da IgM, correspondentes às cadeias pesadas (~70 kDa) e leves (~23-24 kDa). As demais bandas observadas foram sugestivas de redução parcial da IgM e micro heterogeneidade proteica e glicídica.

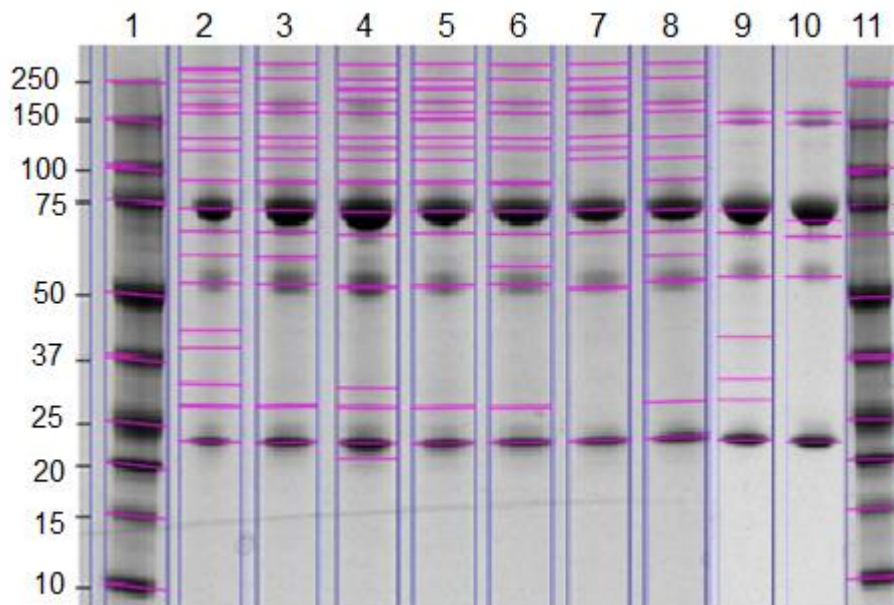


Figura 10: Análise da purificação dos AcMs. Após precipitação com PEG e cromatografia líquida de alta eficiência, a homogeneidade dos 9 AcMs foi avaliada pela técnica de SDS-PAGE. O gel foi corado com Coomassie Blue e as bandas relativas aos AcMs (2-10) comparadas com padrão de peso molecular (1 e 11). As bandas predominantes correspondem a cadeia pesada (~70 kDa) e leve (~23-24 kDa) do anticorpo IgM.

6.1.5. RT-PCR dos AcM, sequenciamento e determinação de CDR.

A RT-PCR dos 9 AcMs produziu amplicons no tamanho de 570 pb para VH e 370 pb para VL para os *primers* VH-Fw 308, 310 e 322 e VL-Fw 353 e 365, conforme visualização em gel de agarose 1,5% (Figura 11). Os outros *primers* testados (Tabela 2) tanto para VH quanto para VL não apresentaram amplificação.

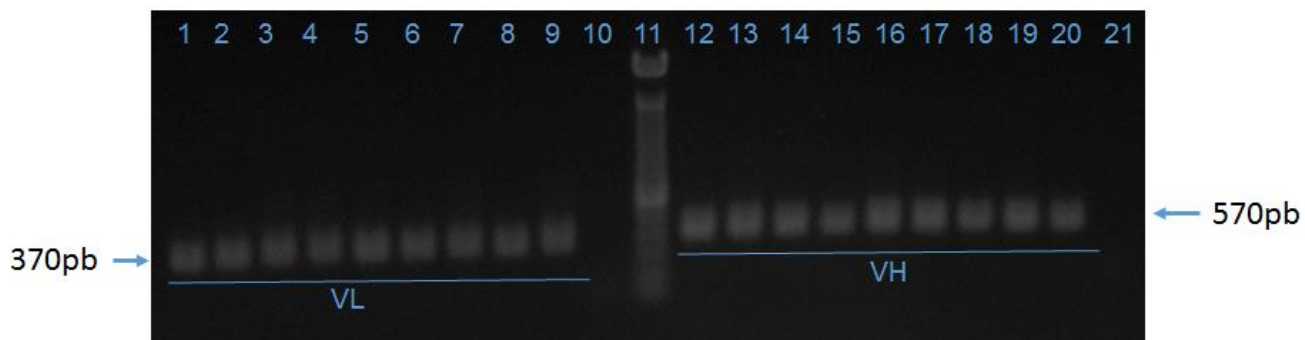


Figura 11: Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose do produto de PCR dos AcMs selecionados com os primers VH 310 e VL 365. O RNA de cada clone positivo foi extraído, realizada a síntese de cDNA e a PCR dos 9 AcMs com os oligonucleotídeos iniciadores universais para a VL e VH conforme descrito no item 4.9. A visualização das bandas foi feita em gel de agarose 1,5% após revelação com GelRed. Representação da amplificação da VL (1-9) e VH (12-20). Marcador molecular 1 kb DNA (11) e controles negativos sem cDNA (10 e 21).

A tradução do sequenciamento dos 9 hibridomas revelou que a sequência proteica dos CDR caracterizaram apenas 2 AcMs, sendo assim foi realizado ELISA para determinação dos AcMs com maior reatividade contra o antígeno (Figura 8). Desta forma, foram escolhidos anticorpos oriundos de dois policlonais diferentes e que mantiveram a reatividade (HC6/DD11 e AF1/CC5).

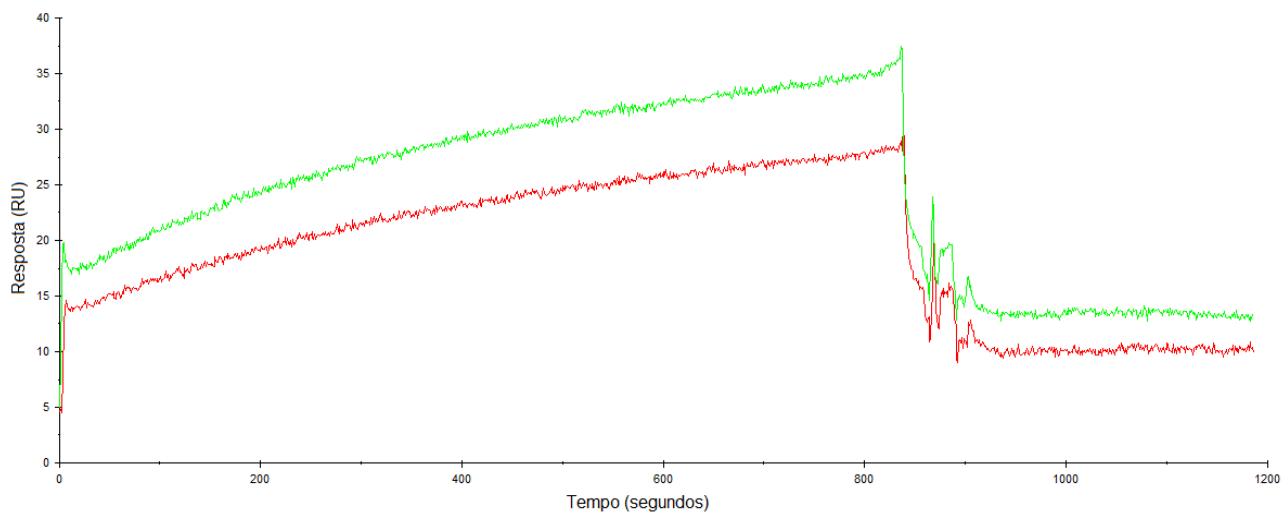
6.1.6. Determinação de constante de associação e dissociação

A interação antígeno-anticorpo foi avaliada por SPR para aferir a constante de dissociação (KD) e associação (KA). Os AcMs foram imobilizados na superfície do *chip sensor* CM5 e foi obtido o sensograma típico da interação com diferentes concentrações do antígeno (Figura 12).

A SPR foi ajustada em um modelo de interação 1:1 e, finalmente, o KA e o KD foram determinados para cada anticorpo (Tabela 3). O gráfico representa que, independente da concentração dos antígenos, KA e KD apresentam cinéticas constantes.

Os AcMs foram testados contra outras moléculas, como BSA e cisteína, e não foi observado nenhum registro cinético, demonstrando que não há interação de outras moléculas com os AcMs e que existe alta especificidade contra os oligômeros de quitina (Figura 13).

A)



B)

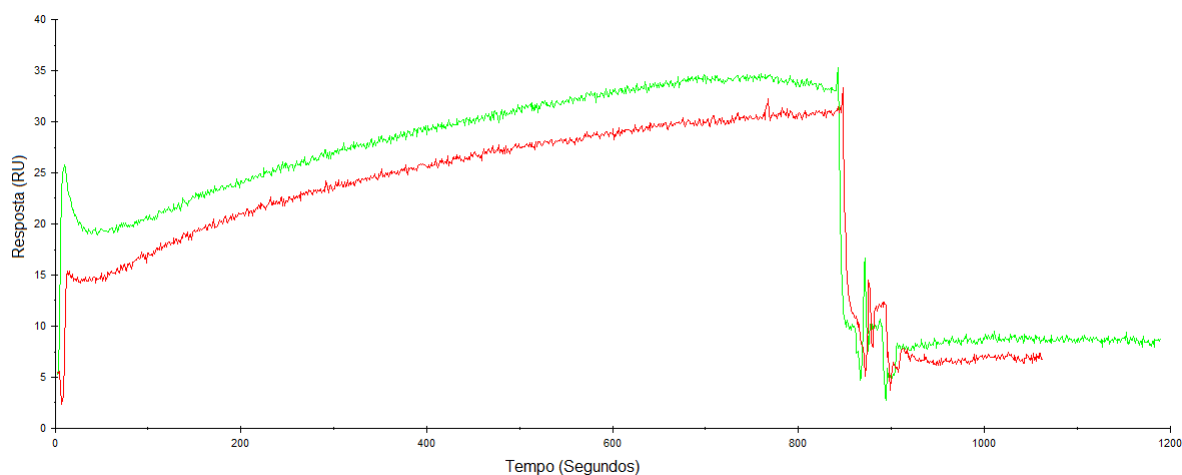


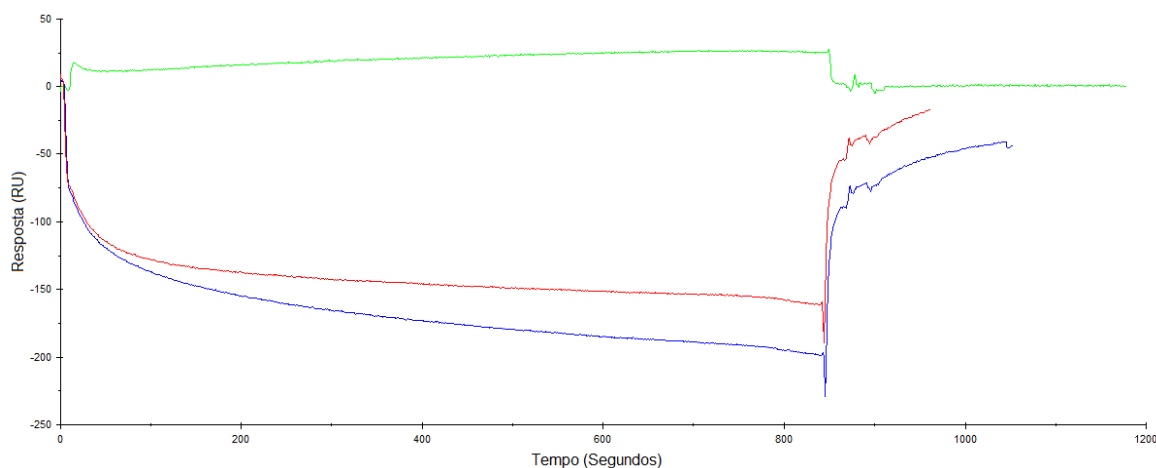
Figura 12: Sensograma de SPR representativo das interações de AcM e quitotriose. Os experimentos foram realizados usando o sistema BIACORE X (GE Healthcare) equipado com um chip sensor CM5. Os ligantes testados foram os AcM HC6/DD11 (A) e AF1/CC5 (B). As superfícies das duas células de fluxo foram ativadas e os ligantes imobilizados na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em acetato de sódio 10 mM, pH 5,0. Linha verde e vermelha correspondem a interação do AcM com concentrações de 0,06 M e 0,1M de quitotriose, respectivamente. RU representa unidades de resposta (*Response units*) gerada pelo software do equipamento.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos dos dois AcMs para quitooligômeros. DP – desvio padrão

AcM	Analito	Concentração Analito (M)	KA (1/M)	KA Média (DP)	KD (M)	KD Média (DP)
HC6/DD11	(GlcNAc) ₃	6,80E-05	4,50E+04	4,16E+04 (± 0,47)	2,24E-05	2,78E-05
		1,00E-04	3,83E+04		3,32E-05	(± 0,76)
AF1/CC5		6,80E-05	1,61E+03	1,69E+03 (± 0,11)	6,21E-04	5,94E-04
		1,00E-04	1,77E+03		5,67E-04	(± 0,38)

DP – desvio padrão; M – Molaridade; KA – Constante de associação; KD – Constante de dissociação

A)



B)

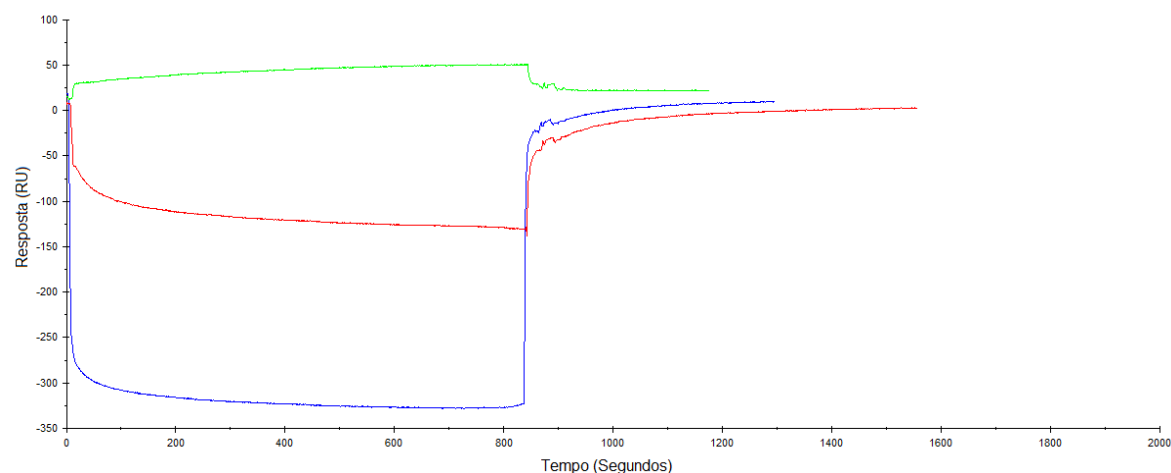


Figura 13: Sensograma de SPR representativo das interações de AcM, BSA e Cisteína. Os experimentos foram realizados conforme detalhado na figura 12 e os mesmos ligantes AcM HC6/DD11 (A) e AF1/CC5 (B) foram testados. Linha verde corresponde a interação com a quitotriose 0,6M, enquanto as linhas vermelha e azul são referentes as interações com BSA e cisteína, respectivamente.

6.2. Ensaios Funcionais dos AcMs

6.2.1. ELISA indireto com células íntegras

Com o intuito de demonstrar a especificidade dos anticorpos frente ao alvo, foi realizado o ensaio de ELISA indireto com *C. albicans*. Diferentes concentrações foram testadas, no entanto a selecionada para os ensaios foi a de 25 µg/mL apesar da obtenção de leituras positivas abaixo dessa concentração (Figura 14). A partir desses ensaios, foi dado prosseguimento nos estudos funcionais utilizando os AcMs AF1/CC5 e HC6/DD11.

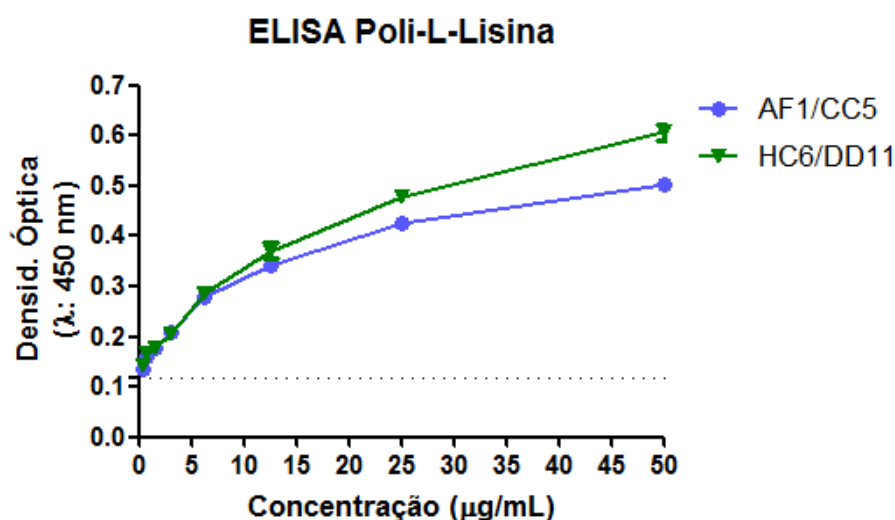


Figura 14: ELISA indireto com *C. albicans*. As leveduras (10^7 /mL) foram incubadas em placas de poliestireno de 96 poços revestidos com 5 µg/mL de poli-L-Lisina em PBS. Após adesão das células fúngicas, os sistemas foram bloqueados por 1 h com PBS/BSA 5% e depois incubados durante 2 h a 37°C com 5 a 50 µg/mL dos AcMs. Após lavagem foi adicionado o anti-IgM murino conjugado a peroxidase diluído 1:5000 e a placa incubada por mais 2 h a 37 °C. Os sistemas foram novamente lavados e incubados 30 min com TBM. Após acidificação, as leituras foram realizadas a 450nm. Linhas verde e azul correspondem aos AcMs HC6/DD11 e AF1/CC5, respectivamente. A linha tracejada representa o branco da reação.

Sendo assim, foi realizado outro ELISA, no qual foi variada a densidade celular de *C. neoformans* e *C. albicans*, com o intuito de verificar a sensibilidade do anticorpo (Figura 15).

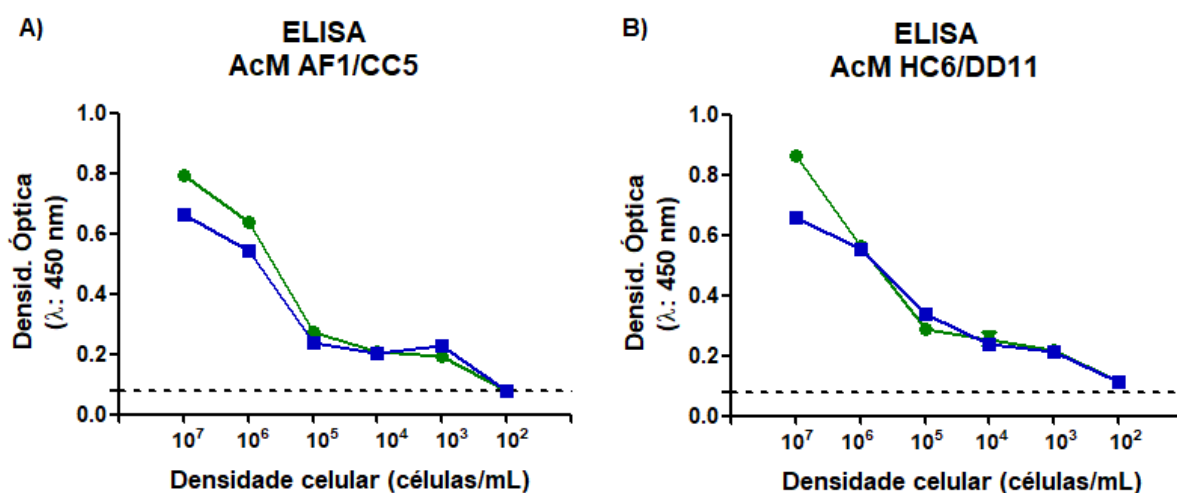


Figura 15: ELISA com fungos integros em diferentes densidades celulares.

Células de *C. albicans* (Azul) e *C. neoformans* (Verde) variando de 10² a 10⁷ foram aderidas em placas de poliestireno de 96 poços revestidos com poli-L-Lisina. Após bloqueio com PBS/BSA, os sistemas foram incubados por 2 h a 37 °C com 25 µg/mL dos AcMs AF1/CC5 (A) e HC6/DD11 (B). A revelação foi realizada conforme descrito na Figura 14 seguido da leitura a 450nm. A linha tracejada representa o branco da reação.

A sensibilidade para ambos os AcMs foi detectada a partir de 10³ células/mL para ambos os fungos analisados. Essa conclusão foi obtida em função da detecção de um sinal de reação considerado positivo 3 vezes maior que o *cut-off* (branco da reação). Entretanto, o sinal obtido pelo anticorpo HC6/DD11 foi ligeiramente mais sensível nas concentrações de 10⁴ e 10⁵ células/mL de ambos os fungos, enquanto para o AF1/CC5 a sensibilidade foi praticamente inalterada nessas densidades celulares principalmente para *C. albicans*.

Além da sensibilidade, foi avaliada a especificidade dos anticorpos contra outros tipos celulares, incluindo células de linhagem pulmonar humana A549, *S. aureus*, *E. coli* e *G. lamblia*. Os AcMs se mostraram específicos para o fungo e não produziram sinais de reação com *G. lamblia*, linhagem A549 de células humanas de pulmão, *E. coli* e *S. aureus* (Figura 16). Cabe ressaltar que este teste foi realizado até a diluição de 10⁴ células/mL, visto que para ambas as células fúngicas representou a sensibilidade limite de detecção.

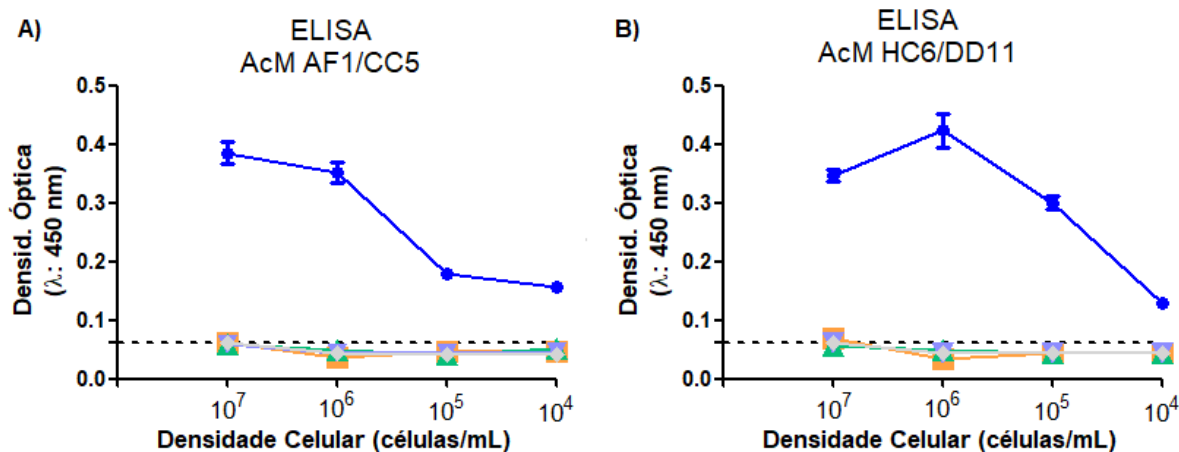


Figura 16: Teste de reatividade de *C. neoformans* e outros tipos celulares com os AcMs. Células de *C. neoformans* (azul), *G. lamblia* (quadrado laranja); A549 (triângulo verde); *E. coli* (triângulo invertido lilás) e *S. aureus* (losango cinza) variando de 10^4 a 10^7 foram aderidas em placas de poliestireno de 96 poços revestidos com poli-L-Lisina. Após bloqueio os sistemas foram incubados por 2 h a 37 °C com 25 µg/mL dos AcMs AF1/CC5 (A) e HC6/DD11 (B). Depois da revelação conforme detalhado na Figura 14, o resultado foi determinado após leitura a 450 nm. A linha tracejada representa o branco da reação.

A reatividade dos AcMs foi também testada para quitosana, o derivado deacetilado da quitina, que também é um dos componentes da parede celular de fungos (Baker et al. 2007). Ambos os anticorpos reconheceram a quitosana, sugerindo que o grupamento *N*-acetil da quitina não é necessário para a reação antígeno-anticorpo (Figura 17).

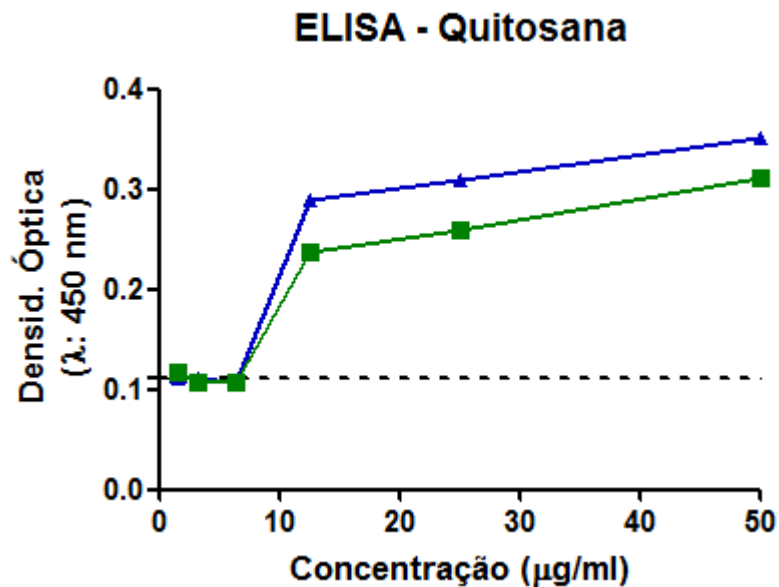


Figura 17: Teste de reatividade com o derivado deacetilado da quitina, a quitosana. A quitosana foi incubada em concentrações variando de 0,4 a 50 µg/mL em placas de poliestireno de 96 poços revestidos com poli-L-Lisina. Após adesão e bloqueio, os sistemas foram incubados durante 2 h a 37 °C com os AcMs HC6/DD11 (azul) e AF1/CC5 (verde), ambos na concentração de 25 µg/mL. Os sistemas foram novamente lavados e incubados 30 min com TBM. Após acidificação, as leituras foram realizadas a 450 nm. A linha tracejada representa o branco da reação.

6.2.2. Determinação do sítio de ligação

A fim de determinar o possível sítio de ligação dos AcMs, a WGA, uma lectina que reconhece oligômeros de β -1,4-GlcNAc, foi testada (PRIVAT & MONSIGNY 1975). Após a adição dos AcMs em placas de 96 poços imobilizadas com quitotriose-BSA contendo WGA conjugada a peroxidase, foi observada a inibição da reação antígeno-anticorpo, o que sugere que os AcMs e a lectina WGA se ligam ao mesmo sítio, ou seja, reconhecem o mesmo antígeno β -1,4-GlcNAc (Figura 18).

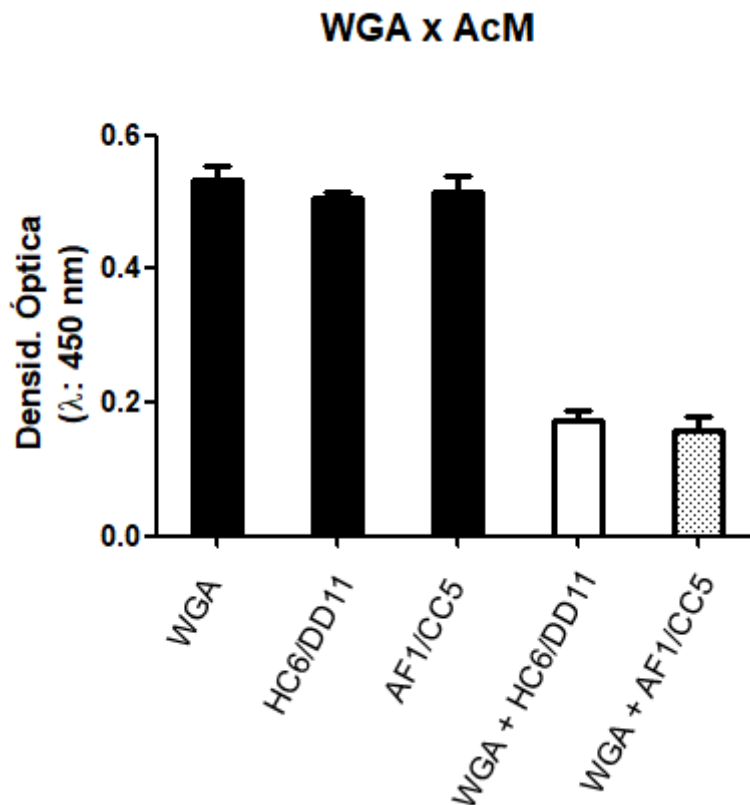


Figura 18: Determinação do sítio de ligação dos AcMs. Placas de 96 poços foram revestidas com quitotriose-BSA na concentração de 0,5 µg/mL em PBS e incubadas durante a noite a 4 °C. Após bloqueio com PBS/BSA e lavagens foi adicionada 25 µg/mL da lectina de germe de trigo (WGA) conjugada a peroxidase, HC6/DD11 e AF1/CC5 (barra preta - controle da reação). Para o teste, WGA não conjugada foi incubada por 1 h a 37 °C e depois tratada por 2 h com os AcMs HC6/DD11 ou AF1/CC5 (25µg/mL). A reação foi revelada após incubação dos sistemas por mais 2 h com o anti-IgM murino conjugado a peroxidase ($p < 0.0001$).

6.2.3. *Dot Blot* com células íntegras

A sensibilidade dos AcMs foi avaliada em ensaio de *Dot Blot*. Os AcMs se mostraram sensíveis para *C. neoformans* até a densidade celular de 10^6 células/mL. Entretanto, o AcM HC6/DD11 se mostrou mais sensível que o AF1/CC5 para *C. albicans*, visto que reatividade se mostrou eficaz até a densidade de 10^4 células/mL. O critério para o corte foi o sinal de reatividade três vezes maior que o *cut-off* (branco) (Figura 19).

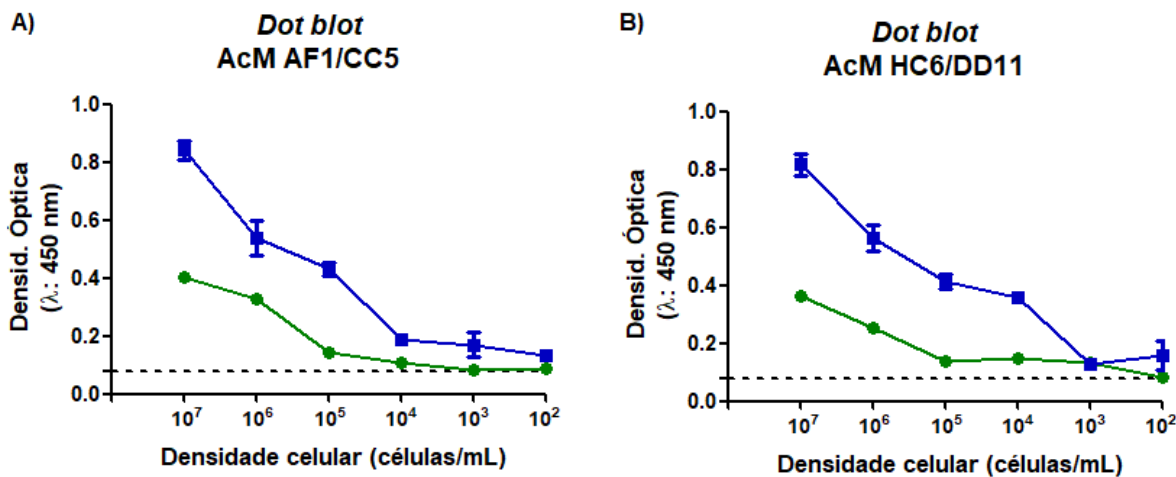


Figura 19: Dot Blot de células integras. Diferentes densidades de *C. neoformans* (H99, linha verde) e *C. albicans* (linha azul) foram aplicadas em membranas de nitrocelulose e realizado o ensaio de ELISA, conforme detalhado nos materiais e métodos, com adição de 25 µg/mL dos AcMs AF1/CC5 (A) e HC6/DD11 (B). A linha tracejada representa o branco da reação.

6.2.4. Reconhecimento fúngico por AcM anti-quitooligômero por Imunofluorescência

A especificidade dos AcMs foi avaliada por imunofluorescência utilizando além dos anticorpos, o reagente calcofluor branco. A marcação dos AcMs se mostrou polarizada, porém não foi observada qualquer tipo de alteração na morfologia da célula (Figura 20).

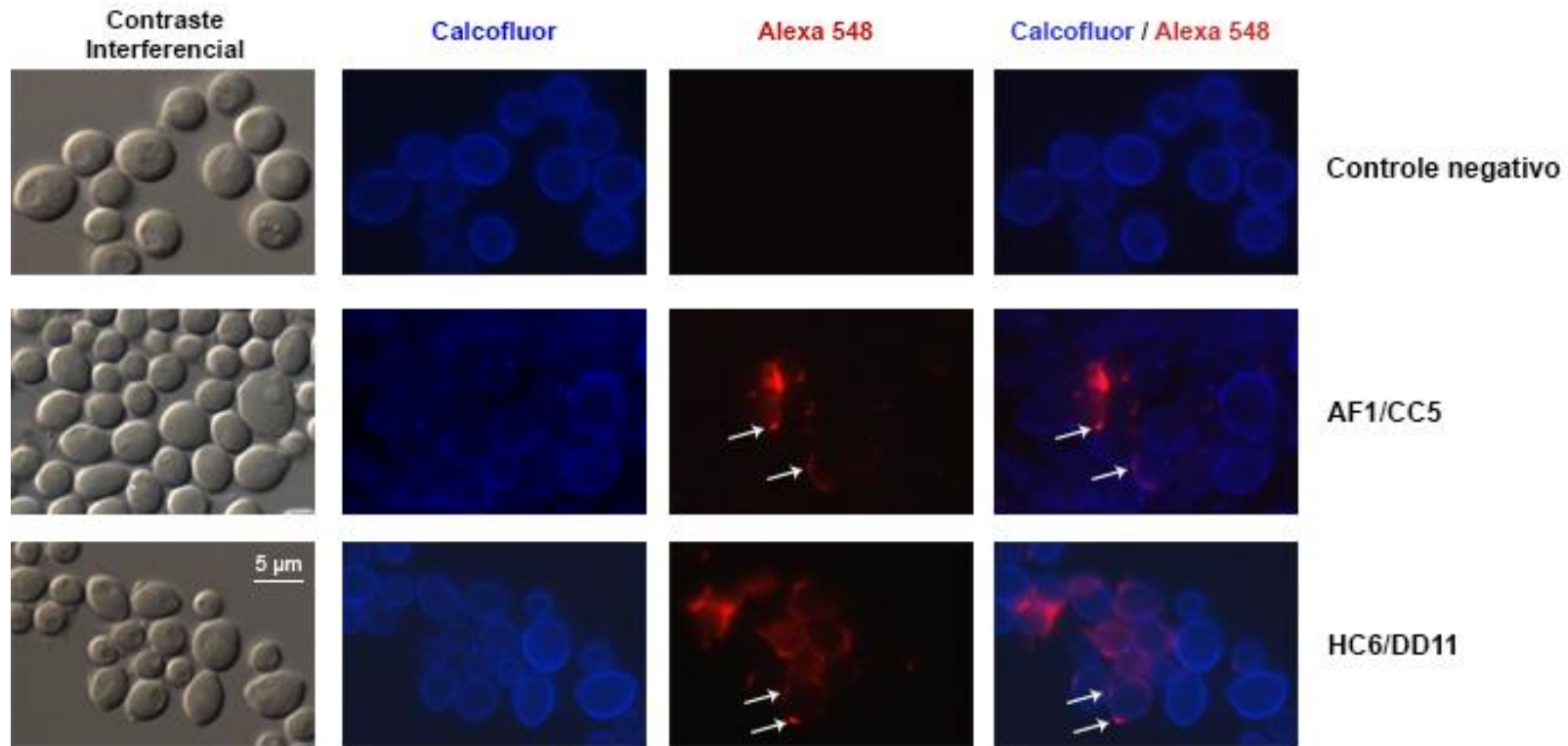


Figura 20: Marcação por imunofluorescência dos AcMs anti-quitooligômeros em *C. albicans*. Leveduras foram fixadas e incubadas com os AcMs AF1/CC5 ou HC6/DD11 25 $\mu\text{g/mL}$ por 1h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Após lavagem as células foram incubadas com anticorpo anti-IgM conjugado a Alexa 568 ou com calcofluor branco a 25 μM . Os painéis a esquerda mostram as células fúngicas observadas por microscopia em contraste interferencial, enquanto os outros painéis mostram as células em modo de fluorescência. As setas indicam a marcação polar característica desse tipo de alvo fúngico, aos quais foram demonstradas para ambos os AcMs, sendo identificada inclusive na imagem em sobreposição (Calcofluor/Alexa 548).

6.2.5. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antifúngica dos AcMs foi testada através do teste de CIM. Os AcMs não apresentaram ação fungicida quando comparados aos controles com 1 µg/ml de AmB e 8 µg/ml de FLC (Figura 21 e 22). A associação dos AcMs com AmB e FLC foi avaliada com concentrações sub-inibitórias, desta forma foram utilizadas as concentrações 0,1 µg/mL de AmB e 4 e 2 µg/mL para o FLC em combinação com diferentes concentrações dos AcMs. Para avaliar se houve efeito combinatório dos AcMs com o fármaco, foi utilizado como base a ação do fármaco de forma isolada.

Ao avaliar a ação fungicida dos AcMs em combinação com a concentração sub-inibitória de AmB, foi observado que as concentrações de 12,5 e 6,2 µg/mL de ambos os anticorpos apresentou efeito sinérgico com a AmB e potencializou sua ação na sua concentração sub-inibitória quando comparada a ação isolada do fármaco em sua CIM ($p < 0.001$). Entretanto, houve efeito aditivo da ação fungicida da AmB 0,1 µg/mL quando em combinação com anticorpo HC6/DD11 na concentração de 3,2 µg/mL ($p < 0,01$) e potencialização do fármaco na concentração do AcM de 1,6 µg/mL ($p < 0,01$). Com relação ao anticorpo AF1/CC5 na concentração de 3,2 µg/mL o efeito combinatório apresentou potencialização da AmB ($p < 0,01$), quando comparado a concentração sub-inibitória do fármaco isolado (Figura 21).

Com relação ao efeito combinatório dos AcMs com o FLC, foi observado o efeito antifúngico parcial dos anticorpos (3,2 µg/mL para ambos os AcMs) em combinação com o FLC (4 µg/mL ($p < 0.01$)). Desta forma, houve potencialização da ação do fármaco quando comparada com a forma isolada na concentração de 4 µg/mL. Além disso, foi observada aumento da ação fungicida combinatória dos AcMs com o FLC na concentração de 2 µg/mL, visto que potencializou a ação do fármaco alcançando níveis da forma isolada na concentração de 4 µg/mL (Figura 22). Entretanto não foi observado efeito sinérgico de ação dos AcMs quando testados em associação com o FLC em diferentes concentrações.

O índice inibitório fracionário (IIF) foi calculado e o impacto da associação dos AcMs com os fármacos padrão está demonstrado na tabela 4.

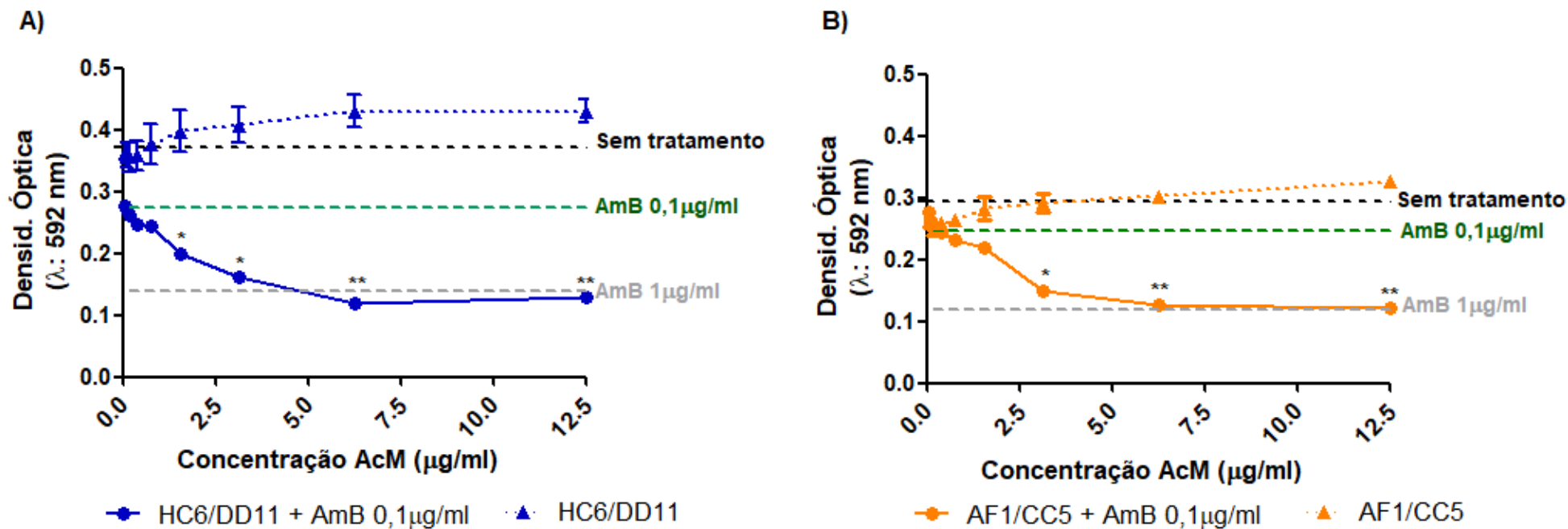


Figura 21: Análise do potencial sinérgico dos AcMs com AmB. Células de *C. neoformans* (10^5 células) foram cultivadas em 200 µL de meio RPMI 1640 tamponado com MOPS, pH 7. As células foram incubadas na ausência (Sem tratamento) ou presença dos AcMs (A) HC6/DD11 e (B) AF1/CC5 (12,5 a 0,05 µg/mL) e do antifúngico anfotericina B (AmB, 1 a 0,1µg/mL) sozinhos ou em associação. Após 48 h de incubação a 37 °C os sistemas foram submetidos a leitura em espectrofotômetro a 592 nm (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$).

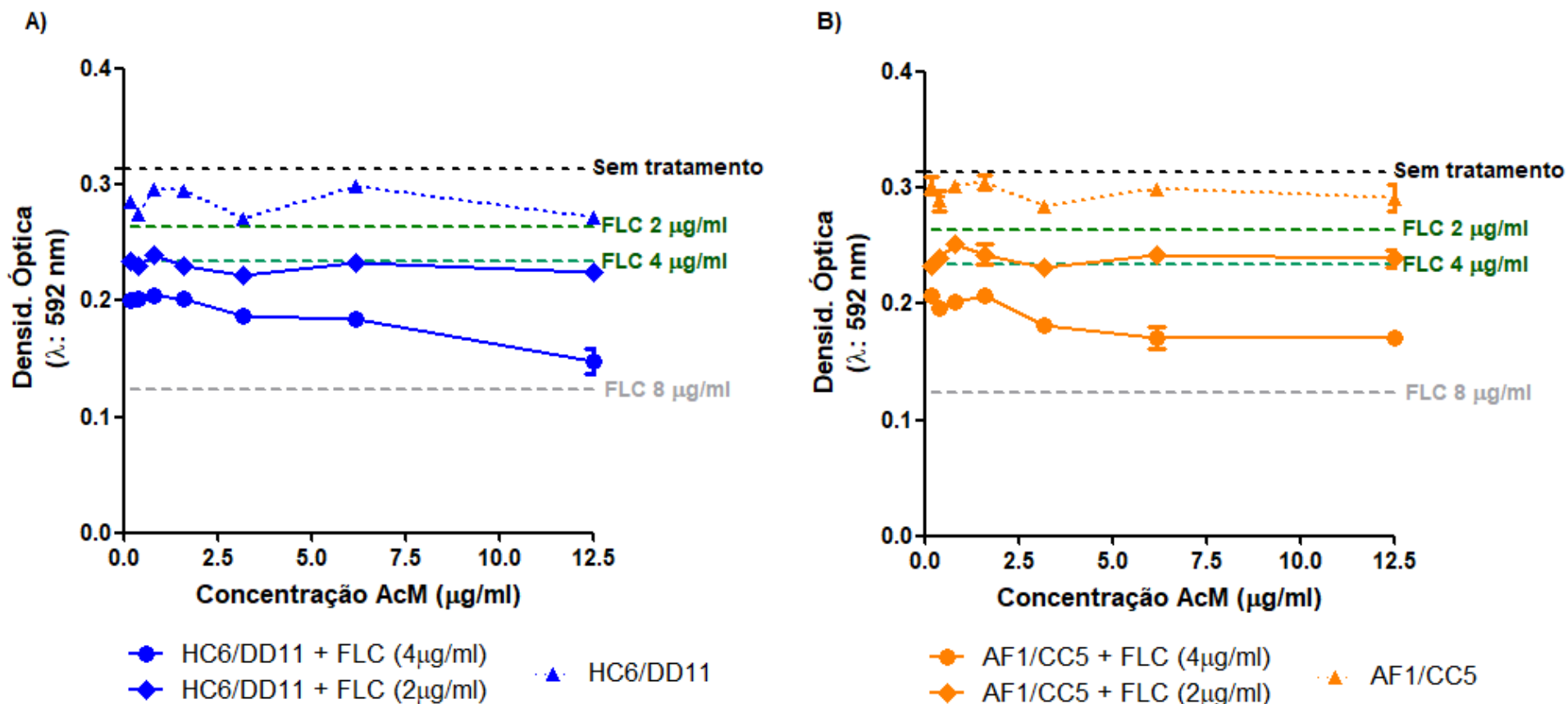


Figura 22: Análise do potencial sinérgico dos AcMs com Fluconazol. Células de *C. neoformans* (10^5 células) foram cultivadas em 200 µL de meio RPMI 1640 tamponado com MOPS, pH 7. As células foram incubadas na ausência (Sem tratamento) ou presença dos AcMs (A) HC6/DD11 e (B) AF1/CC5 (12,5 a 0,05 µg/mL) e do antifúngico FLC (8 a 2 µg/mL) sozinhos ou em associação. Após 48 h de incubação a 37 °C os sistemas foram submetidos a leitura a 592 nm.

Tabela 4: Impacto da associação dos AcMs à AmB ou FLC na atividade anti-fúngica.

AcM	AmB [0,1 µg/mL]	IIF	FLC [4 µg/mL]	IIF
HC6/DD11 [µg/mL]	12,5	0,8	12,5	1,2
	6,2	0,7	6,2	1,4
AF1/CC5 [µg/mL]	12,5	0,8	12,5	1,3
	6,2	0,9	6,2	1,3

Índice inibitório fracionário (IIF); Fortemente sinérgico: IIF <0,5; Sinérgico: IIF <1; Aditivo: IIF = 1; Sem efeito: 1 <IIF <2; Antagonista: IIF > 2

6.2.6. Atividade dos AcMs na viabilidade do biofilme

A formação de biofilme é de grande importância na clínica médica, uma vez que causa dificuldades no tratamento de diversas enfermidades, incluindo a criptococose. Diante desse cenário, foi proposto avaliar o efeito dos AcMs na viabilidade do biofilme por ensaio de XTT.

Os efeitos dos AcMs (25 µg/mL) foram testados sobre três amostras fúngicas (*C. albicans*, *C. neoformans* (H99) e o mutante acapsular de *C. neoformans*, Cap67). Como controle o AcM anti-GXM 18B7 (25 µg/ml) foi utilizado apenas para H99. No primeiro ensaio (Figura 23 A e B) as suspensões celulares foram lavadas para retirada das células não aderentes ao substrato. Os AcMs inibiram significativamente a formação de biofilme quando comparado as células não tratadas e aderidas diretamente ao substrato ($p < 0,05$). No segundo ensaio (Figura 23 C e D) as suspensões celulares não foram lavadas e, novamente, os AcM inibiram a formação do biofilme ($p < 0,05$) quando comparada as células não tratadas com os anticorpos. Em ambos os ensaios foram observados o crescimento das células.

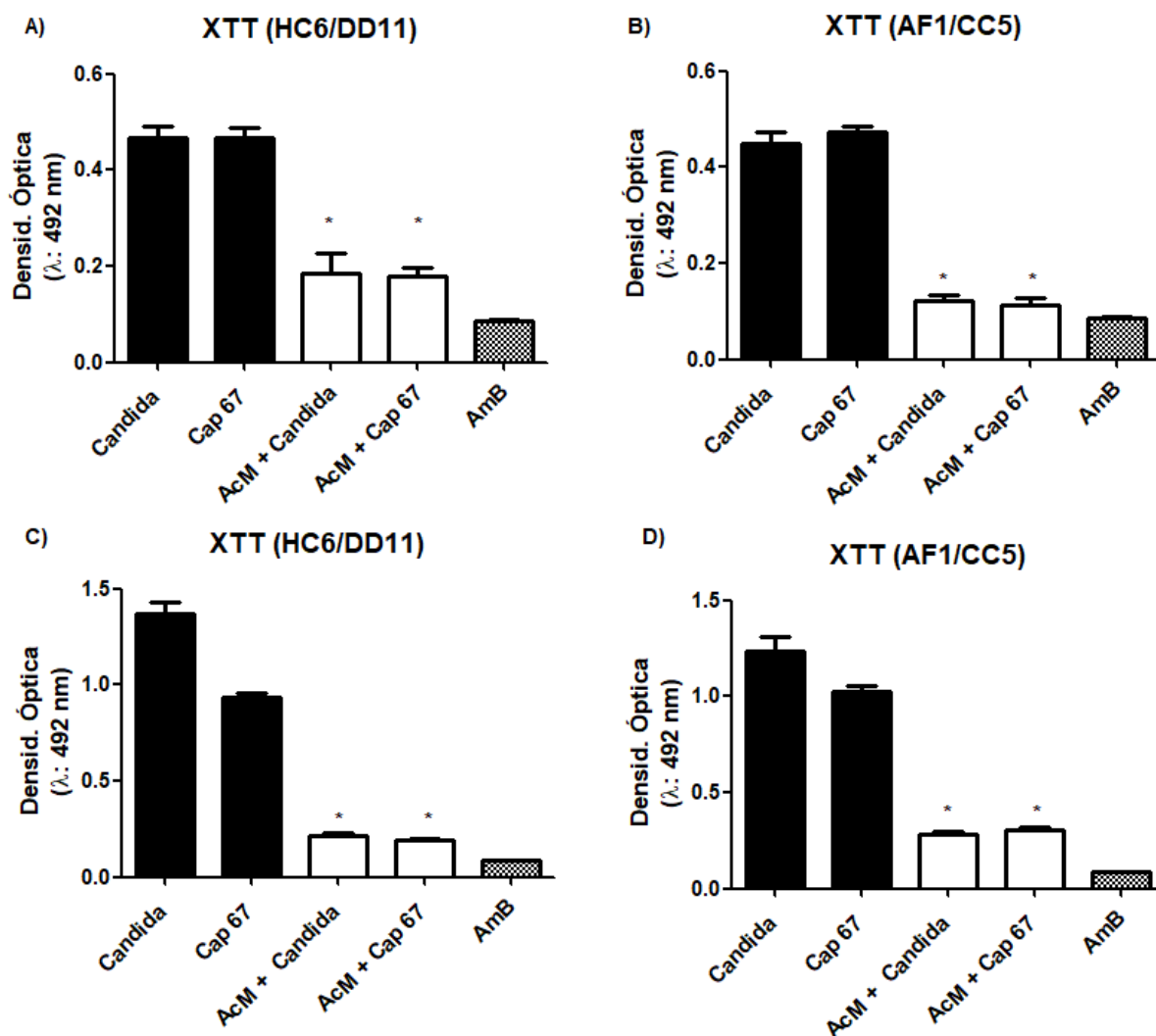


Figura 23: Atividade dos AcMs na formação de biofilme. Células ($1 \times 10^6/\text{ml}$) de *C. neoformans* Cap67 e *C. albicans* foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas em meio mínimo na ausência (Barra preta) ou presença de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dos AcMs (HC6/DD11 e AF1/CC5). Após 48 h, células lavadas (A e B) ou não (C e D) foram avaliadas quanto a viabilidade após adição do sal tetrazólio XTT e leitura a 492 nm. AmB 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi utilizada como controle (* $p < 0,05$).

Os AcMs foram comparados com o AcM anti-GXM 18B7 quanto a inibição da formação de biofilme. Tanto para as suspensões celulares lavadas quanto para aquelas não lavadas, os AcMs foram capazes de inibir significativamente a formação de biofilme da célula H99 quando comparada ao efeito das células não tratadas, além de apresentar comportamento semelhante ao AcM anti-GXM 18B7 ($p < 0,05$) (Figura 24).

Tratamentos com os AcMs afetam a formação de biofilme ($p < 0,05$) quando comparados ao fungo não tratado.

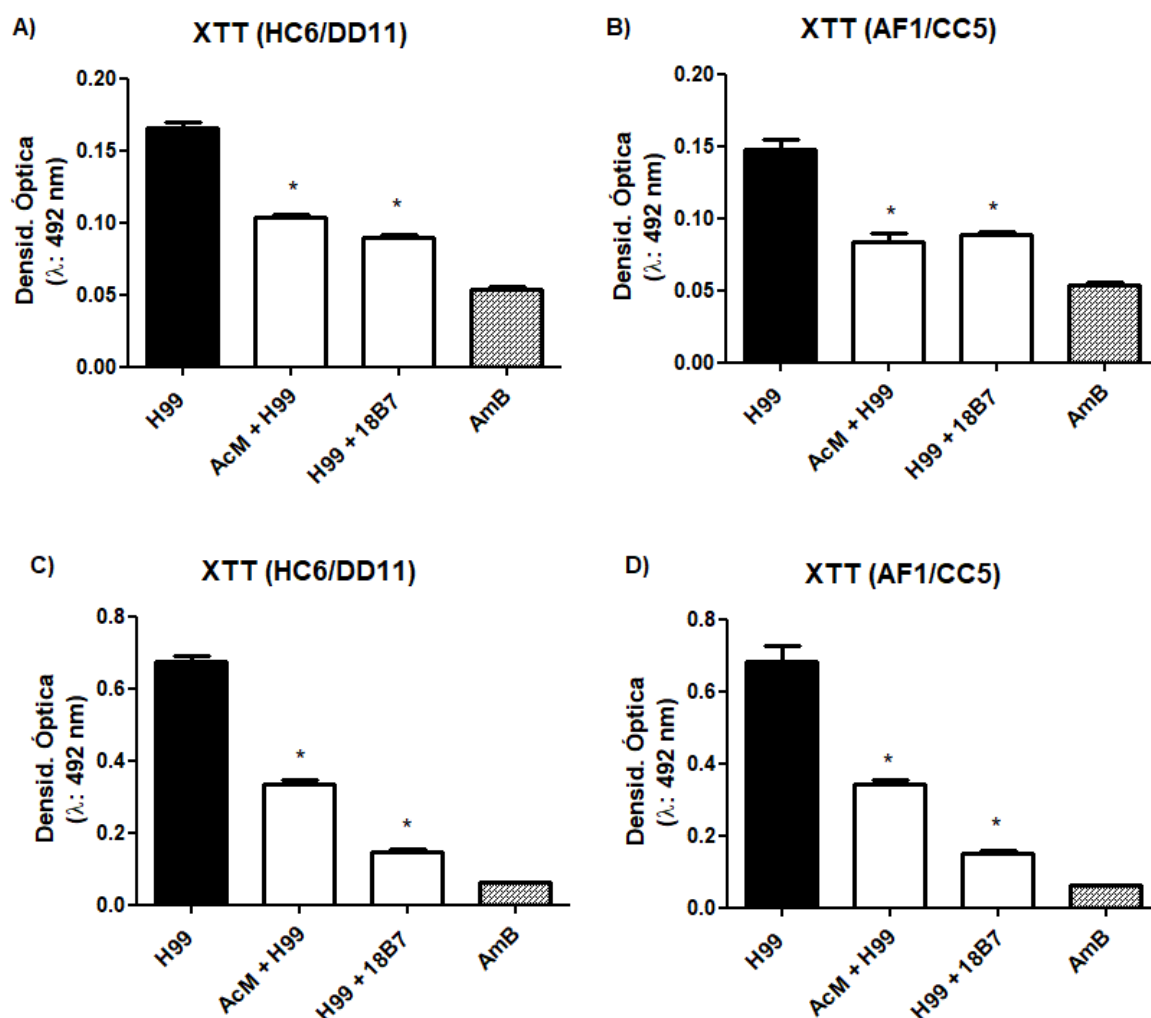


Figura 24: Atividade dos AcMs contra a formação de biofilme em comparação com a ação do AcM 18B7. *C. neoformans* (H99, 1×10^6 /mL) foram incubados em placas de 96 poços contendo meio mínimo na ausência (Barra preta) ou presença de 25 μ g/mL dos AcMs (HC6/DD11 e AF1/CC5) e do AcM anti-GXM 18B7 por 48 h a 37 °C. Após incubação, células lavadas (A e B) e não submetidas a lavagens (C e D) foram avaliadas quanto a viabilidade após adição de XTT e leitura a 492 nm. AmB 1 μ g/mL foi utilizada como controle (* $p < 0,05$).

6.2.7. Avaliação do efeito dos AcMs na melanização de *C. neoformans*

A capacidade de *C. neoformans* de produzir melanina representa um fator de virulência importante (Montes et al. 2015). A melanina é depositada na parede celular de *C. neoformans*. Considerando que os AcMs aqui testados são reconhecedores da parede celular, avaliamos a capacidade desses anticorpos em afetar a pigmentação. As concentrações estabelecidas de AcM HC6/DD11 e AF1/CC5 foram de 0,2 a 25 µg/mL. A L-DOPA foi utilizada como substrato para a melanização.

A ocorrência de pigmentação em *C. neoformans* foi avaliada visualmente pela sedimentação da coloração marrom ao preto no fundo das placas de 96 poços. Para documentar a pigmentação ou sua inibição, as placas foram fotografadas sobre superfícies brancas (fundo claro), para permitir a diferenciação entre populações pigmentadas e não pigmentadas.

O tratamento com os AcM HC6/DD11 inibe a melanização, parcialmente, até a concentração de 6,2 µg/mL ($p < 0,05$), enquanto nas concentrações menores não foram detectadas inibição ($p > 0,05$). O AcM AF1/CC5 inibe a melanização em concentrações superiores a 6,2 µg/mL ($p < 0,001$), enquanto nas concentrações de 3,2 e 1,6 µg/mL ($p < 0,05$) ocorreu inibição parcial, já as menores concentrações não afetaram de forma significativa a pigmentação ($p > 0,05$) (Figura 25).

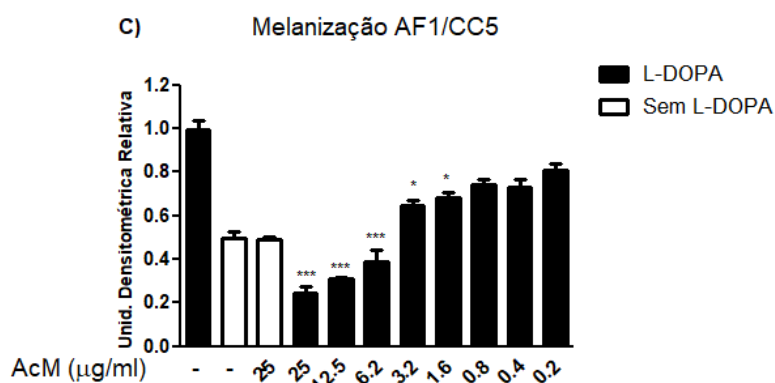
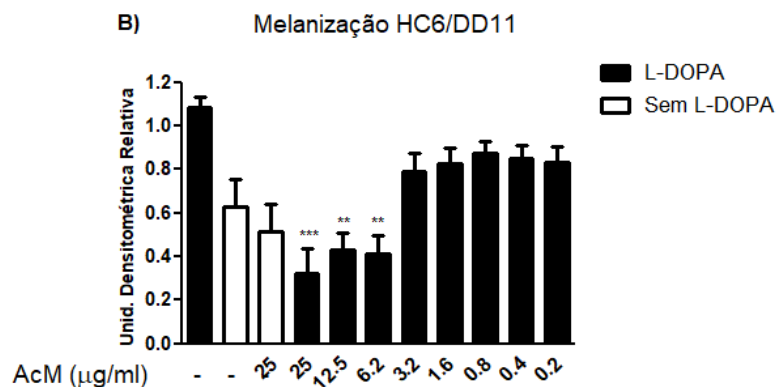
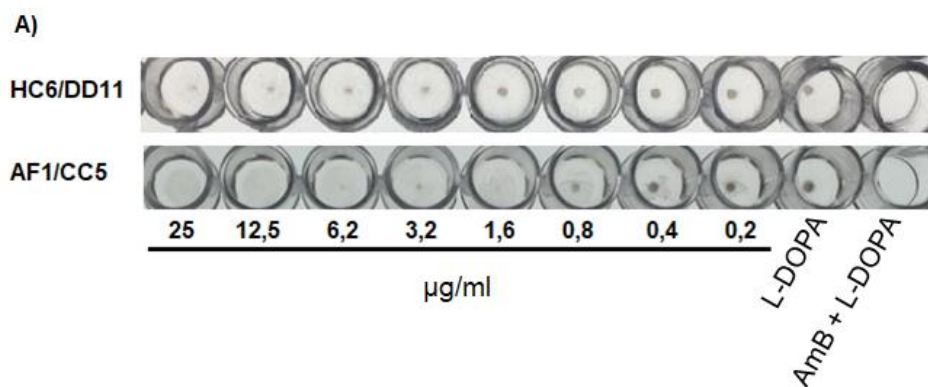


Figura 25: Efeito dos AcMs na melanização de *C. neoformans*. Leveduras de *C. neoformans* (1×10^6 células/mL) foram cultivadas por 72 h em meio mínimo suplementado com os AcMs HC6/DD11 ou AF1/CC5 em diferentes concentrações (0,2 a 25 µg/mL) com e sem adição de 1 mM de L-DOPA. A placa submetida a centrifugação e a formação do pigmento foi avaliada visualmente (A) e quantificada por densitometria (B e C) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

6.3. Teste de sobrevivência após tratamento com os AcMs

6.3.1. Infecção com *C. neoformans* e tratamento com AcM HC6/DD11

Os camundongos foram letalmente desafiados com um inóculo i.p. de 1×10^5 células de *C. neoformans*. Após 2 h foram tratados com PBS (controle negativo), IgM não relacionada 500 $\mu\text{g}/\text{animal}$ e concentrações de 500, 250 e 100 $\mu\text{g}/\text{animal}$ via i.p. de AcM (HC6/DD11). O AcM HC6/DD11 foi escolhido para os ensaios de sobrevivência por apresentar maior atividade antifúngica *in vitro* quando em associação a AmB.

Todos os animais tratados com AcM morreram em até 28 dias pós infecção, incluindo a IgM não relacionada e o grupo não tratado, não havendo diferença significativa entre os grupos tratados (Figura 26).

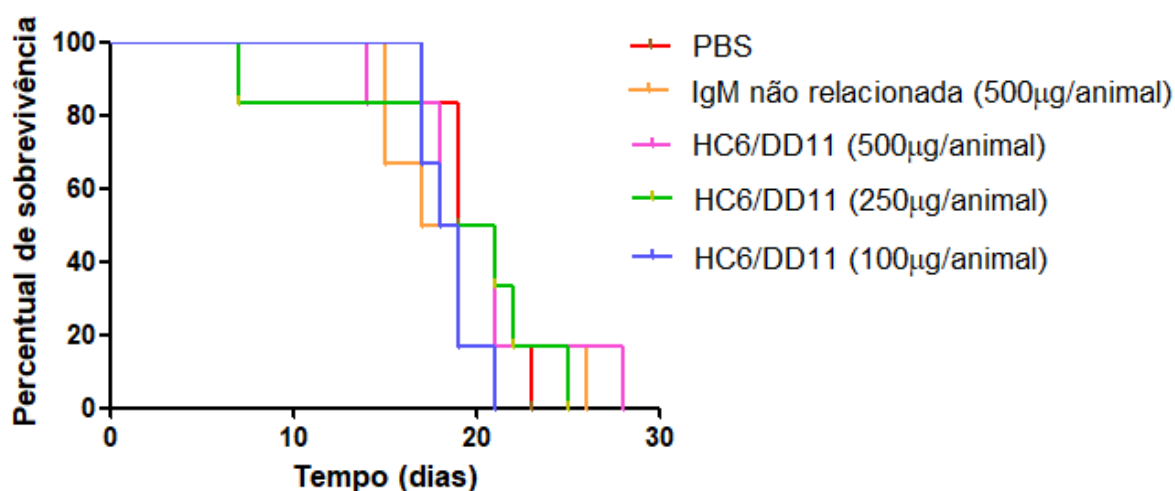


Figura 26: Curva de sobrevivência após tratamento com AcM H6/DD11. Camundongos Balb/C foram desafiados letalmente via i.p. com 10^5 células de *C. neoformans* (H99). Após 2 h os animais foram tratados com 100, 250 ou 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do AcM HC6/DD11. Como controle, os animais foram tratados somente com PBS.

6.3.2. Infecção com *C. neoformans* e tratamento com AcM HC6/DD11 associado ao antifúngico AmB

De acordo com os dados anteriores, o AcM sozinho não apresentou efeito antifúngico *in vivo*, sendo assim foi testado o efeito em combinação com a AmB.

A taxa de mortalidade dos animais infectados com *C. neoformans* não tratados (sistema controle, PBS) foi de 100% no 28º dia pós infecção, enquanto os animais tratados com AcM permaneceram vivos até o 29º dia. No grupo dos animais tratados apenas com AmB a 0,25 mg/kg, 100% de mortalidade dos animais ocorreu somente no 37º dia, enquanto o grupo tratado em combinação (AcM -85 µg/animal - com AmB - 0,25 mg/kg -) apresentou 100% de sobrevivência. No grupo controle tratado com a dose padrão de AmB (2,5 mg/kg) nenhum animal veio a óbito (dado não mostrado). Desta forma, a combinação de AcM HC6/DD11 e uma dose sub-inibitória de AmB produziram 100% de sobrevivência de animais letalmente infectados em nosso modelo (Figura 27).

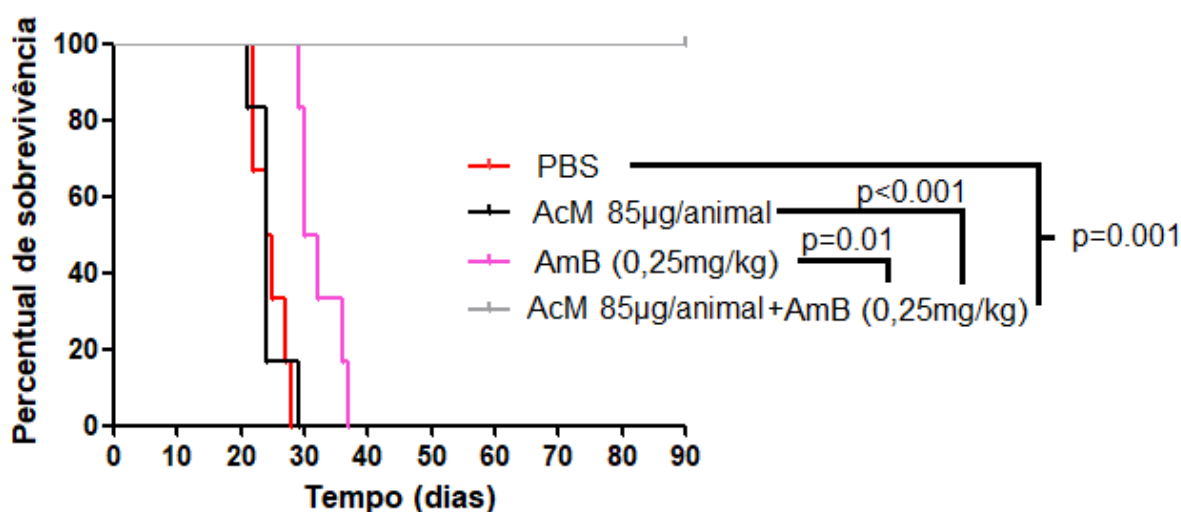


Figura 27: Curva de sobrevivência após tratamento com o AcM H6/DD11 e AmB isolados ou em associação. Camundongos Balb/C foram desafiados letalmente via i.p. com 10^5 células de *C. neoformans* (H99). Após 2 h os animais foram tratados isoladamente com 85 µg/animal do AcM HC6/DD11 ou com 0,25 ou 2,5 mg/kg de AmB. Os animais foram também tratados com a combinação de AcM (85 µg/animal) e AmB (0,25 mg/kg). Animais tratados somente com PBS foram utilizados como controle.

6.4. Modelagem Molecular

Com o intuito de futuramente humanizar os AcM murinos, foi realizado um alinhamento das cadeias leve e pesada dos AcMs HC6/DD11 e AF1/CC5 com o banco de dados de anticorpos humanos do IMGT (<http://imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>). As sequências que apresentaram maior homologia para HC6/DD11 cadeia pesada e leve foram, respectivamente, IGHV3-11*01 e IGKV1-16*01, enquanto para o AF1/CC5 foram, respectivamente, IGHV3-73*01 e IGKV1-17*03. Os aminoácidos que diferiram entre as sequências murinas e humanas foram substituídas pelos aminoácidos presentes na *framework* dos anticorpos humanos.

Para obter as estruturas tridimensionais dos anticorpos HC6/DD11 e AF1/CC5 murinos e humanizados foi utilizada a metodologia de modelagem molecular. Um alinhamento local através do BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*) contra o banco de dados PDB para a escolha e seleção das proteínas molde foi realizado. Como modelo para o AcM HC6/DD11 murino a sequência 4U0R foi utilizada, enquanto para AF1/CC5 murino as sequências 5IJK e 3NFT foram selecionadas para a cadeia pesada e leve, respectivamente. Com relação ao humanizado do HC6/DD11 foi utilizada a sequência 5F72, enquanto para o AF1/CC5 cadeia pesada e leve foram 6MAM e 3NFP, respectivamente.

A construção dos modelos tridimensionais foi feita utilizando o programa Modeller 9.19. Os modelos murinos e humanizados obtidos foram submetidos a minimização de energia utilizando o programa *Wincoot* e alinhados entre si para determinar as estruturas preditas (Figura 28).

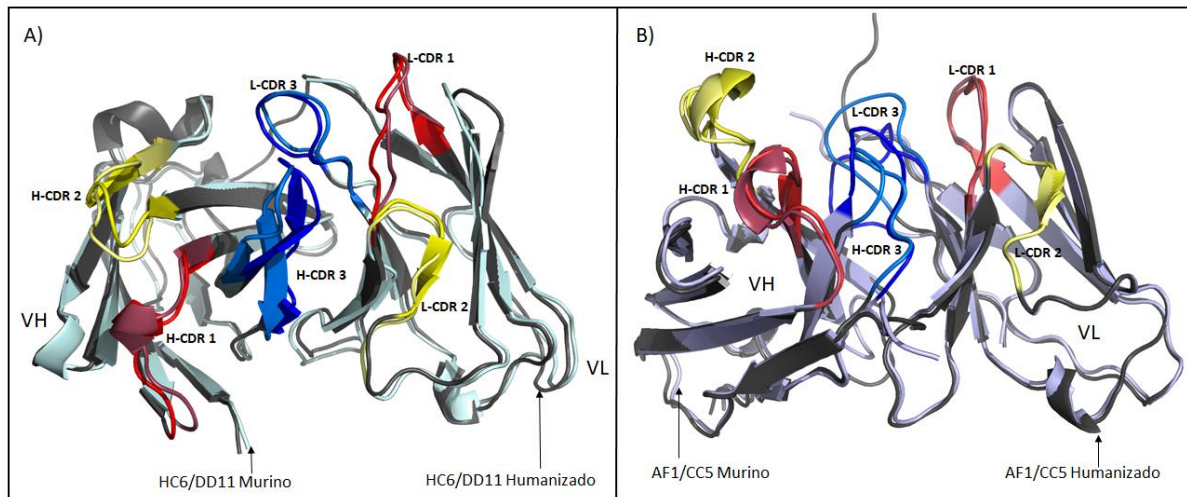


Figura 28: Modelagem molecular. As sequências das regiões variáveis dos anticorpos HC6/DD11 e AF1/CC5 obtidas por sequenciamento foram humanizadas e um modelo tridimensional foi desenhado utilizando diferentes programas conforme detalhado nos Materiais e Métodos. Imagem representativa da sobreposição *in silico* do anticorpo murino e do anticorpo humanizado (A e B). Em cinza claro estão representados os fragmentos scFv dos AcMs murinos e em cinza escuro os fragmentos scFv dos AcMs humanizados. L-CDRs representam os CDRs das cadeias leves e H-CDRs correspondem aos CDRs das cadeias pesadas.

7. DISCUSSÃO

Diversas pesquisas têm demonstrado que anticorpos monoclonais podem ser protetores contra infecções fúngicas (Guerriero et al. 2019). Proteínas, polissacarídeos, pigmentos e até mesmo glicolipídios fúngicos se apresentam como potenciais alvos para a ação de anticorpos protetores (Robertson & Casadevall 2009, Guerriero et al. 2019). Nosso laboratório demonstrou previamente que o bloqueio de quitooligômeros de parede celular é benéfico para o controle da criptococose animal (Fonseca et al. 2009). Dessa forma, escolhemos a quitotriose, um oligômero de quitina, como alvo para o desenvolvimento de AcM com potencial protetor.

Em nossos estudos os AcMs selecionados foram todos pertencentes ao isotipo IgM kappa, sugerindo uma expansão clonal oriunda de células de memória do tipo IgM (Racine & Winslow 2009, Capolunghi et al. 2013). Essa hipótese está de acordo com o uso do antígeno na sua forma pura, sem adição de adjuvante, na última imunização, o que pode ter propiciado indução de células B de memória produtoras de anticorpos do tipo IgM, o que é comum em processos de resposta humoral contra infecções bacterianas, virais e fúngicas (Capolunghi et al. 2013).

A estratégia de imunização com *C. gattii* foi adotada para expor o sistema imune do hospedeiro a complexa estrutura fúngica, ao qual inclui a quitina e seus oligômeros. Essa estratégia foi adotada em detrimento da utilização da imunização de quitotriose-BSA, visto que o uso da molécula conjugada gerou AcM contra o ligante (de origem desconhecida) da molécula de interesse e o BSA. Desta forma, a exposição ao fungo seguido da quitotriose pura combinada com AlOH_3 foi uma estratégia para indução da resposta humoral e consequente produção de anticorpos frente ao alvo de interesse (Petrovsky & Aguilar 2004, Haji-Ghassemi et al. 2015). Apesar de não ter gerado IgG, supomos que pelas características do antígeno, ocorreu maior proliferação de células de memória do tipo IgM.

Em modelos murinos foram identificadas células B de memória produtoras de IgM. Essas células se distribuem no baço e apresentam capacidade de expansão frente a um antígeno estimulador de respostas célula T-independentes (Racine & Winslow 2009). Estas células B de memória do tipo IgM proliferam de acordo com o alvo e voltam aos centros germinativos secundários para provocar a troca de classe (Phan & Tangye 2017). Entretanto, a rápida expansão seguida da geração de células plasmáticas independentes de células T propicia o acúmulo maior de

plasmócitos produtores de IgM, provavelmente pelo estímulo provocado pela quitotriose (Phan & Tangye 2017).

A partir da análise de sequenciamento foi possível identificar 2 AcMs diferentes oriundos dos 9 hibridomas. Diante disso, foram iniciados testes funcionais com dois gêneros de fungos diferentes daquela realizada na imunização, com o intuito de demonstrar a distribuição do alvo escolhido em diferentes patógenos fúngicos. Para tal, foi realizada uma padronização de ELISA com poli-l-lisina tanto para as células fúngicas quanto para os outros tipos celulares, visto que a utilização da célula direta ao substrato não apresentou uma aderência suficiente para o sinal, bem como a utilização de Anti-GXM para imobilizar *Cryptococcus* gerou sinal inespecífico e não poderia ser usado contra outras células. Cabe ressaltar que a utilização de poli-l-lisina foi realizada principalmente pela grande quantidade de carga negativa da cápsula polissacarídea de *C. neoformans* e *C. gattii* (Nosanchuk 1997, Azze et al. 1999) e pelo fato de auxiliar na imobilização de outras células.

Nossos dados mostraram a seletividade dos AcMs para reconhecimento de fungos, o que poderia implicar seu potencial uso como ferramenta no diagnóstico diferencial em casos de suspeita de patologias com características clínicas semelhantes, porém causadas por patógenos de natureza distinta (Drgona et al. 2014, Bongomin et al. 2017).

Essa hipótese é corroborada pelos dados de cinética de ligação obtidos por SPR, que demonstraram que a afinidade dos AcMs aqui desenvolvidos aparentemente se restringe a moléculas de quitotriose. Por se tratar de uma técnica muito sensível, sugerimos que, caso sejam aplicados em testes diagnósticos, os AcMs contra quitoooligômeros teriam baixa chance de produzir resultados falso-positivos. Nesse sentido, os AcMs aqui testados por SPR não apresentaram variações significativas nos valores de KD e KA quando testados na presença de diferentes concentrações do analito, o que leva a crer que independente da concentração do antígeno o anticorpo se liga com a mesma afinidade e especificidade, sugerindo que o possível uso dele *in vivo* poderia ser funcional, já que em concentrações muito baixas do antígeno este se ligaria ao AcM e a modulação da resposta imunológica poderia ser ativada.

Estudos anteriores do grupo demonstraram por microscopia confocal que os quitoooligômeros de *C. neoformans* se distribuem em polos específicos da superfície celular (Rodrigues et al. 2008). Nossos resultados com os AcMs revelaram padrões semelhantes. Além disso, os AcMs apresentam uma marcação difusa de forma basal

no restante da célula. Foi demonstrado que imunofluorescência utilizando AcM β 1,3-glucana em *C. albicans* aumenta a marcação difusa na periferia celular, sugerindo a ação das quitinases que atuam nas microfibrilas da quitina, diminuindo seu comprimento para possibilitar nova incorporação a parede celular, o que corrobora com o padrão do AcM desenvolvido (Sherrington et al. 2017). Sendo assim, podemos supor que além da marcação, os AcMs podem de alguma forma ampliar a atividade de quitinase endógena o que poderia gerar um padrão difuso, consequentemente aumentando o número de sítios disponíveis para a ligação dos AcMs (Fonseca et al. 2009, Sherrington et al. 2017).

A partir da alta especificidade dos AcMs aos quitoooligômeros, podemos sugerir um grande potencial no diagnóstico diferencial de infecções fúngicas, visto que quitina e seus derivados não são encontrados na parede de bactérias, por exemplo (Shatzmiller et al. 2018). Uma das formas mais úteis no diagnóstico de organismos patogênicos é a identificação de antígenos e no caso das infecções fúngicas isso pode direcionar a estratégia terapêutica e o prognóstico da doença (Theel & Doern 2013, Lamoth 2016).

A BDG é uma dos principais componentes da parede celular de vários fungos medicamente importantes (Fesel & Zuccaro 2016) e é utilizado na identificação de IFI, sendo incluído em 2008 como um dos critérios para diagnóstico de doenças fúngicas invasivas pela Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (Donnelly 2008). Entretanto, existem casos relatados de falso-positivos como: hemodiálise com membranas de celulose, administração de antimicrobianos contendo BDG, além de pacientes com infecções bacterianas (Albert et al. 2011).

Sendo assim, os AcMs apresentam um espectro potencial maior contra infecções fúngicas, visto que derivados de quitina são amplamente distribuídos entre os fungos, enquanto o diagnóstico de BDG não detecta certas espécies de fungos, como *Cryptococcus sp.* e *Blastomyces dermatitidis* por produzirem níveis muito baixos de BDG. Entretanto, a associação do diagnóstico de BDG com o AcM anti-quitoooligômero poderiam confirmar com maior precisão casos de infecções por *Pneumocystis*, visto que espécies deste gênero apresentam níveis basais ou não possuem quitina em sua parede, mas possuem alta sensibilidade para BDG no soro (Onishi et al. 2011).

Diversos estudos buscam analisar a combinação de fármacos e consequente diminuição das concentrações individuais de cada fármaco, o que pode resultar efeitos colaterais e o surgimento de resistência (Butts et al. 2017, Spitzer et al. 2017,

Nicola et al. 2019). Desta forma concentrações subinibitórias de AmB e FLC foram testadas em combinação com diversas concentrações dos AcMs. Os AcMs, isoladamente, não apresentaram ação antifúngica, mas tiveram efeitos inibitórios em combinação com os fármacos. Não são ainda conhecidas as razões para essa observação, mas especulamos que os AcMs poderiam promover desestruturação da parede celular, facilitando assim o acesso de AmB e FLC aos seus alvos celulares, potencializando assim os seus efeitos. Esses dados dão suporte a estudos que sugerem que combinação de dois ou mais fármacos em doses reduzidas são benéficos para o tratamento de infecções fúngicas (Chang et al. 2017, Sousa Pinheiro et al. 2017, Mourad & Perfect 2018).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra alvos fúngicos vem sendo explorada ao longo das duas últimas décadas (Casadevall & Scharff 1991, Dromer & Charreire 1991, Rosas & Nosanchuk 2001). Dois anticorpos se destacam nesse grupo, incluindo o AcM 18B7 contra GXM de *Cryptococcus* e 2G8 contra β 1,3 glucana de *Candida*, que apresentaram efeito fungicida em combinação com AmB (Casadevall et al. 1998, Rachini et al. 2007). Ambos têm a característica de tornar mais eficiente a capacidade do hospedeiro de controlar micoses sistêmicas (Ngel et al. 2001, Casadevall & Pirofski 2007b). Assim, a imunomodulação conferida por anticorpos monoclonais pode ajudar no tratamento de micoses invasivas.

Mecanismos clássicos de ação de anticorpos incluem efeitos diretos como neutralização de toxinas, e efeitos cooperativos, como mediados por células efectoras, aumento da fagocitose por opsonização (Casadevall & Pirofski 2007b), ativação e fixação do complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (Casadevall & Pirofski 2004). Nos últimos anos, mecanismos adicionais de ação de anticorpos contra fungos foram evidenciados, incluindo inibição do crescimento (Torosantucci et al. 2005), inibição da formação de biofilme (Martinez & Casadevall 2005b), inibição da aderência e germinação (Moragues et al. 2003) e inibição da formação de melanina (Rosas & Nosanchuk 2001). Os AcMs desenvolvidos afetaram a melanização e a formação de biofilme, dados similares aos descritos para o AcM anti-GXM 18B7 e o AcM 11B11, respectivamente (Ngel et al. 2001, Martinez & Casadevall 2005b).

Os biofilmes fúngicos apresentam uma estrutura tridimensional complexa com uma heterogeneidade espacial diversa (Wu et al. 2017). A consolidação do biofilme a algum substrato depende de diversas fases que passam pela aderência, iniciação da formação do biofilme, proliferação, maturação e dispersão. A fase de dispersão é

um desdobramento das etapas na formação de biofilme e inclui a liberação de células não aderentes em uma matriz extracelular (ME), características na formação de biofilme de *C. albicans* (Mitchell 2011). A partir desse raciocínio, analisamos diferentes tipos celulares para verificar a formação de biofilme na sua fase inicial de aderência, bem como na fase de maturação e dispersão.

Para tal, realizamos duas análises, a primeira com a lavagem das células e remoção das células não aderentes e a segunda sem lavagem. Em ambos os sistemas os AcMs foram capazes de inibir a formação de biofilme em *C. albicans*, apresentando papel mais significativo no sistema não lavado. Cabe ressaltar que no sistema não lavado, o biofilme é mais maduro com uma ME estabelecida, que representa um mecanismo de resistência do biofilme maior. Desta forma, supõe-se que a possível desorganização da parede fúngica não propiciou a melhor aderência ao substrato e não permitiu a proliferação da forma filamentosa que propiciassem a maturação do biofilme (Wu et al. 2017).

Com relação ao *Cap67* foi possível observar a mesma característica apresentada em *C. albicans* para ambos os sistemas, porém a maturidade do biofilme se relaciona com GXM e apesar de ser acapsular já foi descrito uma quantidade substancial de GXM em cultivos (Grijpstra et al. 2009). Desta forma assim como em relação ao *C. neoformans* é possível supor que os AcMs apresentem papel no desarranjo da parede fúngica e conseqüentemente desorganização de polissacarídeos capsulares e liberação, acarretando na desestabilização do biofilme (Martinez & Casadevall 2005b).

Diversos estudos sugerem que a quitina é necessária para a deposição de melanina na parede celular fúngica (Banks IR, Specht CA, Donlin M, Grik KJ 2005, Fonseca et al. 2009). O pigmento, por sua vez, é benéfico para a progressão da doença (Fang et al. 2001, Montes et al. 2015). Os AcMs aqui estudados apresentaram ação inibitória total ou parcial sobre a pigmentação, o que supõe a possível fragilidade imposta pelos anticorpos à parede fúngica. Além do efeito direto sobre a parede e conseqüente impedimento no acúmulo da melanina, os AcMs podem ter afetado a expressão de lacase, enzima responsável pela síntese de melanina, já que esta possui sua localização na parede do fungo (Zhu et al. 2001). Além disso, devido a indicação da localização na parede celular, a possível desagregação da parede pode diminuir a ação da lacase o que dificultaria a interação com substâncias extracelulares (L-DOPA) resultando na diminuição da melanização (Camacho et al. 2017). Embora nenhuma das duas hipóteses tenha

sido testada, a capacidade dos AcMs de inibir a melanização poderia representar uma importante vantagem terapêutica, dado o papel fundamental da melanina na virulência fúngica (Azevedo et al. 2016). Finalmente, a melanização e formação de biofilme protegem vários fungos patogênicos contra fármacos antifúngicos (Wu et al. 2017, Joffe et al. 2018). Dessa forma, a inibição desses processos produziria vantagens adicionais no controle das infecções causadas por fungos.

Diante do cenário de grande potencial terapêutico dos AcMs aqui estudados, os mesmos foram testados com relação a sua capacidade de promover inibição de criptococose animal na presença de uma concentração subinibitória de AmB. Essa combinação produziu 100% de sobrevivência de animais infectados com doses letais de *C. neoformans*. Os mecanismos pelos quais essa condição foi atingida ainda são obscuros, mas estudos na literatura indicam que os AcMs poderiam exercer uma função imunomoduladora direta e indireta a favor do hospedeiro (Rivera et al. 2005, Rodrigues et al. 2007). O aumento de IFN-gamma polariza para uma resposta Th1, ativando macrófagos e consequente eliminação de *C. neoformans* (Rivera et al. 2005). Além disso, as Igs podem ter propriedades pró ou anti-inflamatórias, dependendo das interações entre anticorpos e receptores do hospedeiro. IgM está relacionada à sua capacidade de ativar o complemento, enquanto a função da IgG é mais complexa, na medida em que é capaz de ser pró ou anti-inflamatória, dependendo da quantidade de anticorpo, sendo assim representando uma ação de controle ou disseminação da doença (Casadevall & Pirofski 2012b).

As formulações de AmB indicadas para infecções fúngicas invasivas variam enormemente em eficácia, segurança e custos (Borba et al. 2018). As formulações denominadas convencionais são de baixo custo, mas incluem efeitos colaterais expressivos. As formulações mais efetivas e menos tóxicas são representadas pela AmB lipossomal, que pode gerar custos até R\$400.000 por paciente (Borba et al. 2018). No Brasil, apenas a formulação convencional é fornecida pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Embora a AmB convencional apresente aspectos críticos de toxicidade para o hospedeiro, os altos custos de aquisição de AmB lipossomal impedem seu uso em larga escala no Brasil, dados os valores atualmente praticados. Esse cenário revela que agentes capazes de reduzir as doses terapêuticas de AmB podem impactar positivamente o tratamento das micoses disseminadas.

A humanização *in silico* apresenta pequenas diferenças estruturais dos CDRs de ambos os AcMs murino com relação aos AcMs humanizados, o que supõe boas estruturas para sintetizar os genes para humanização. Além disso, a possibilidade de conjugação com fármacos pode possibilitar uma alternativa na diminuição de custos e conseqüente aumento na eficácia de tratamento.

Em resumo, os AcMs desenvolvidos nesse estudo apresentam potencial para uso como ferramentas auxiliares em diagnóstico e terapia de infecções fúngicas. O uso dos AcMs contra quitooligômeros como um biofármaco para o tratamento de doenças fúngicas em combinação com doses menores de AmB, que diminuiria os efeitos colaterais, poderia diminuir os custos do SUS com terapia e internações, considerando a capacidade instalada da Fiocruz para produção de anticorpos monoclonais, ampla inserção com o SUS e longa tradição de produção de insumos com impacto altamente positivo sobre a saúde da população brasileira.

8. CONCLUSÕES

1. Os anticorpos monoclonais anti-quitooligômeros foram desenvolvidos pela técnica de hibridoma. Esses anticorpos se mostraram capazes de se ligar a fungos patogênicos;
2. A estratégia de imunização adotada com o estímulo do camundongo com células fixadas se mostrou eficaz para a seleção de linfócitos B produtores de anticorpos anti-quitooligômeros, em detrimento da clássica técnica de imunização apenas com antígenos purificados;
3. Os ensaios de ELISA, imunofluorescência e Dot Blot foram padronizados e se mostraram eficazes na ligação de mais de um gênero fúngico analisado;
4. Os AcMs tiveram sua especificidade por quitooligômeros fúngicos confirmada por ensaios sorológicos convencionais e sua afinidade pelos mesmos comprovada por ensaios de ressonância plasmônica;
5. Os AcMs foram capazes de inibir pigmentação de *C. neoformans*;
6. Os AcMs apresentaram efeito preventivo na formação de biofilme de mais de um gênero fúngico analisado;
7. O anticorpo HC6/DD11 apresenta efeito protetor em combinação com concentrações sub-inibitórias de AmB.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S 2015. *Imunologia Celular e Molecular* (T Digital, Org.). Elsevier Inc., Rio de Janeiro.
- Albert O, Toubas D, Strady C, Cousson J, Delmas C, Vernet V, Villena I 2011. Reactivity of (1→3)-β-d-glucan assay in bacterial bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 1453–1460.
- Alvarez C, Andes DR, Kang JY, Krug C, Kwon GS 2017. Antifungal Efficacy of an Intravenous Formulation Containing Monomeric Amphotericin B, 5-Fluorocytosine, and Saline for Sodium Supplementation HHS Public Access. *Pharm Res* 34: 1115–1124.
- Armstrong-James D, Meintjes G, Brown GD 2014. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Cell Press* 22: 120–127.
- Azab MM, Taleb AFA, Mohamed NAE, Omran FH 2015. Rapid Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 4(11):470-486
- Azevedo RVDM, Rizzo J, Rodrigues ML 2016. Virulence Factors as Targets for Anticryptococcal Therapy. *J. Fungi* 2: 1–15.
- Azze R, Olivares M, Rodriguez J 1999. Use of Poly-L-lysine Precoating in an ELISA for the Detection of Antibodies against Serogroup C *Neisseria meningitidis* Capsular Polysaccharide. *Biotecnol. Apl.* 16: 173–175.
- Bain JM, Lewis LE, Okai B, Quinn J, Gow NAR, Erwig L-P 2012. Non-lytic expulsion/exocytosis of *Candida albicans* from macrophages. *Fungal Genet. Biol.* 49: 677–678.

Baker LG, Specht CA, Donlin MJ, Lodge JK 2007. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 6: 855–867.

Banks IR, Specht CA, Donlin M, Grik KJ LS and LJ 2005. A Chitin Synthase and Its Regulator Protein Are Critical for Chitosan Production and Growth of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell*: 1902–1912.

Barnes PD, Marr KA 2006. Aspergillosis: Spectrum of Disease, Diagnosis, and Treatment. *Infect. Dis. Clin. NA* 20: 545–561.

Beenhouwer DO, Yoo EM, Lai C-W, Rocha MA, Morrison SL 2007. Human Immunoglobulin G2 (IgG2) and IgG4, but Not IgG1 or IgG3, Protect Mice against *Cryptococcus neoformans* Infection. *Infect. Immun.* 75: 1424–1435.

Benedict K, Richardson M, Vallabhaneni S, Jackson BR, Chiller T 2017. Fungal infections 7 Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks. *Ser. Lancet Infect Dis* 17: 403–415.

Biacore X 202AD. Getting Started. GE, 2002

Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning D 2017. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *J. Fungi* 3: 57.

Borba HHL, Steimbach LM, Riveros BS, Tonin FS, Ferreira VL, Bagatim BA de Q, Balan G, Pontarolo R, Wiens A 2018. Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. *Mycoses* 61: 754–763.

Brena S, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Cabezas J, Moragues MD, Pontón J 2007. Fungicidal Monoclonal Antibody C7 Binds to *Candida albicans* Als3.

Infect. Immun. 75: 3680–3682.

Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC 2012. Hidden killers: Human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* 4: 1–9.

Buissa-Filho R, Puccia R, Marques AF, Pinto FA, Muñoz JE, Nosanchuk JD, Travassos LR, Taborda CP 2008. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. *Infect. Immun.* 76: 3321–3328.

Buitrago MJ, Aguado JM, Ballen A, Bernal-Martinez L, Prieto M, Garcia-Reyne A, Garcia-Rodriguez J, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M 2013. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin. Microbiol. Infect.* 19: E271–E277.

Butts A, Palmer GE, David Rogers P 2017. Antifungal adjuvants: Preserving and extending the antifungal arsenal. *Virulence* 8: 198–210.

Camacho E, Chrissian C, Cordero RJB, Lopes LL, Stark RE, Casadevall A 2017. N-acetylglucosamine affects *Cryptococcus neoformans* cell-wall composition and melanin architecture. *Microbiol. (United Kingdom)* 163: 1540–1556.

Campuzano A, Wormley FL 2018. Innate Immunity against *Cryptococcus*, from Recognition to Elimination. *J. Fungi* 4: 1–22.

Capolunghi F, Rosado MM, Sinibaldi M, Aranburu A, Carsetti R 2013. Why do we need IgM memory B cells? *Immunol. Lett.* 152: 114–120.

Casadevall A, Cleare W, Feldmesser M, Glatman-Freedman A, Goldman DL, Kozel TR, Lendvai N, Mukherjee J, Pirofski L-A, Rivera J, Rosas AL, Scharff MD,

- Valadon P, Westin K, Zhong AZ 1998. Characterization of a Murine Monoclonal Antibody to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide That Is a Candidate for Human Therapeutic Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 1437-1446
- Casadevall A, Pirofski L-A 2004. MINIREVIEW New Concepts in Antibody-Mediated Immunity. *Infect. Immun.* 72: 6191–6196.
- Casadevall A, Pirofski L-A 2007a. MINIREVIEWS Accidental Virulence, Cryptic Pathogenesis, Martians, Lost Hosts, and the Pathogenicity of Environmental Microbes. *Eukaryot. Cell* 6: 2169–2174.
- Casadevall A, Pirofski L-A 2007b. Antibody-Mediated Protection through Cross-Reactivity Introduces a Fungal Heresy into Immunological Dogma. *Infect. Immun.* 75: 5074–5078.
- Casadevall A, Pirofski L-A 2012a. Immunoglobulins in defense, pathogenesis and therapy of fungal diseases. *Cell Host Microbe* 11(5): 447–456.
- Casadevall A, Pirofski L-A 2012b. A new synthesis for antibody-mediated immunity NIH Public Access. *Nat Immunol* 13: 21–28.
- Casadevall A, Scharff MD 1991. The Mouse Antibody Response to Infection with *Cryptococcus neoformans*: VH and VL Usage in Polysaccharide Binding Antibodies. *J Exp Med*: 151–160.
- Chang Y-L, Yu S-J, Heitman J, Wellington M, Chen Y-L 2017. New facets of antifungal therapy. *Virulence* 8: 222–236.
- Chayakulkeeree M 2006. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin N Am* 20: 507–544.

- Coelho C, Bocca AL, Casadevall A 2014. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Adv. Appl. Microbiol.* 87: 1–41.
- Colombo ANAC, Rodrigues ML 2015. Fungal colonization of the brain: anatomopathological aspects of neurological cryptococcosis. *An Acad Bras Cienc* 87: 1293–1309.
- Denning DW 2015. The ambitious “95–95 by 2025” roadmap for the diagnosis and management of fungal diseases. *Thorax* 70: 613–614.
- Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, Warnock DW, Kelly SL 1997. Itraconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(6): 1364-1368
- Dos Santos M., Quintilio W., Manieiri TM., Tsuruta LR., Moro Am. Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 54: 1-15
- Donnelly JP 2008. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive. *Clin Infect Dis* 46: 1813–1821.
- Drgona L, Khachatryan A, Stephens J, Charbonneau C, Kantecki M, Haider S, Barnes R 2014. Clinical and economic burden of invasive fungal diseases in Europe: focus on pre-emptive and empirical treatment of *Aspergillus* and *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
- Dromer F, Charreire J 1991. Improved Amphotericin B Activity by a Monoclonal Anti-*Cryptococcus neoformans* Antibody: Study during Murine Cryptococcosis and Mechanisms of Action. *J. Infect. Dis.* 163: 1114–1120.

- Dutra FF, Albuquerque PC, Rodrigues ML, Fonseca FL 2018. Warfare and defense: The host response to *Cryptococcus* infection. *Fungal Biol. Rev.* 32: 35–51.
- Edith Albengres, Hervé Le Louët J-PT, Tillement J-P 1998. Systemic Antifungal Agents. *Drug Saf.* 18: 83–97.
- Erwig LP, R Gow NA 2016. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 163–176.
- Fang N, Chan V, Mao H-Q, Leong KW 2001. Interactions of Phospholipid Bilayer with Chitosan: Effect of Molecular Weight and pH. *Biomacromolecules* 2: 1161–1168.
- Fesel PH, Zuccaro A 2016. β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genet. Biol.* 90: 53–60.
- Fisher CE, Stevens AM, Leisenring W, Pergam SA, Boeckh M, Hohl TM 2014. Independent contribution of bronchoalveolar lavage and serum galactomannan in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Transpl Infect Dis* 16(3): 505–510.
- Fonseca FL, Guimarães AJ, Kmetzsch L, Dutra FF, Silva FD, Taborda CP, Araujo G de S, Frases S, Staats CC, Bozza MT, Schrank A, Vainstein MH, Nimrichter L, Casadevall A, Rodrigues ML 2013. Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* chitooligomers affects multiple mechanisms required for fungal pathogenesis. *Fungal Genet. Biol.* 60: 64–73.
- Fonseca FL, Nimrichter L, Cordero RJB, Frases S, Rodrigues J, Goldman DL, Andruszkiewicz R, Milewski S, Travassos LR, Casadevall A, Rodrigues ML 2009. Role for chitin and chitooligomers in the capsular architecture of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 8: 1543–1553.

GAFFI FUNGAL DISEASE FREQUENCY. : <https://www.gaffi.org/why/fungal-disease-frequency>.

Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, Pasqualotto AC 2016. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses* 59: 145–150.

Grijpstra J, Gerwig GJ, Wo H, Kamerling JP, Cock H De 2009. Production of Extracellular Polysaccharides by CAP Mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 8: 1165–1173.

Guerriero I, Magnani M, Marra E, Aurisicchio L, Mambro T Di 2019. The Yin and Yang of Current Antifungal Therapeutic Strategies: How Can We Harness Our Natural Defenses? *Front. Pharmacol.* 10: 1–11.

Guimarães AJ, Frases S, Gomez FJ, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD 2009a. Monoclonal Antibodies to Heat Shock Protein 60 Alter the Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 77: 1357–1367.

Guimarães AJ, Frases S, Gomez FJ, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD 2009b. Monoclonal Antibodies to Heat Shock Protein 60 Alter the Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 77: 1357–1367.

Guimarães AJ, Frases S, Gomez FJ, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD 2009c. Monoclonal Antibodies to Heat Shock Protein 60 Alter the Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 77: 1357–1367.

Guimarães AJ, Frases S, Pontes B, Duarte De Cerqueira M, Rodrigues ML, Bessa Viana N, Nimrichter L, Nosanchuk JD 2011. Agglutination of *Histoplasma capsulatum* by IgG Monoclonal Antibodies against Hsp60 Impacts Macrophage Effector Functions. *Infect. Immun.* 79: 918–927.

- Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, Falk R, Parnmen S, Lumbsch HT, Boekhout T 2015. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet. Biol.* 78: 16–48.
- Haji-Ghassemi O, Blackler RJ, Young NM, Evans S V. 2015. Antibody recognition of carbohydrate epitopes. *Glycobiology* 25: 920–952.
- Hamill RJ 2013. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs* 73: 919–934.
- Harris JR, Lockhart SR, Debess E, Marsden-Haug N, Goldoft M, Wohrle R, Lee S, Smelser C, Park B, Chiller T 2011. *Cryptococcus gattii* in the United States: Clinical Aspects of Infection With an Emerging Pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 53(12): 1188–1195.
- Harris JR, Lockhart SR, Sondermeyer G, Vugia DJ, Crist MB, Tobin D'angelo M, Sellers B, Franco-Paredes C, Makvandi M, Smelser C, Greene J, Stanek D, Signs K, Nett RJ, Chiller T, Park BJ, Sondemeyer G 2013. *Cryptococcus gattii* Infections in Multiple States Outside the US Pacific Northwest. *Emerging Infectious Diseases* 19(10): 1620-1626.
- Heitman J 2011. Microbial Pathogens in the Fungal Kingdom. *Fungal Biol Rev* 25: 48–60.
- Huang H-R, Fan L-C, Rajbanshi B, Xu J-F 2015. Evaluation of a New Cryptococcal Antigen Lateral Flow Immunoassay in Serum, Cerebrospinal Fluid and Urine for the Diagnosis of Cryptococcosis: A Meta-Analysis and Systematic Review. *PLoS One*: 1–10.
- Jaijakul S, Vazquez JA, Swanson RN, Ostrosky-Zeichner L 2012. 3)- β -D-Glucan as a Prognostic Marker of Treatment Response in Invasive Candidiasis. *Clin. Infect.*

Dis. 55(4): 521–526.

Joffe LS, Barcellos VA, Vainstein MH, Schrank A, Rodrigues ML, Zimbres ACG, Kmetzsch L, Fonseca FL, Staats CC, Reuwsaat JC V 2018. Pharmacological inhibition of pigmentation in *Cryptococcus*. *FEMS Yeast Res.* 19: 1–10.

Joffe LS, Schneider R, Lopes W, Azevedo R, Staats CC, Kmetzsch L, Schrank A, Poeta M Del, Vainstein MH, Rodrigues ML 2017. The anti-helminthic compound mebendazole has multiple antifungal effects against *Cryptococcus neoformans*. *Front. Microbiol.* 8: 1–14.

Kaplon H, Reichert JM 2019. Antibodies to watch in 2019. *MAbs* 11: 219–238.

Kauffman CA 2007. Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update. *Clin. Microbiol. Rev.* 20: 115–132.

Kö Hler JR, Casadevall A, Perfect J 2015. The Spectrum of Fungi That Infects Humans. *Cold Spring Harb Perspect Med*: 1–22.

Köhler G, Milstein C 2005. Pillars Article : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256 (5517): 495-497. *J. Immunol.* 174: 2453–2455.

Kozel TR, Wickes B 2014. Fungal Diagnostics. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4: 1–14.

Kurtz MB, Douglas CM 1997. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *Journal of Medical & Veterinary Mycology* 35: 79-86

Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, Bicanic TA, Castañeda E, Chang YC, Chen J, Cogliati M, Dromer F, Ellis D,

- Filler SG, Fisher MC, Harrison TS, Holland SM, Kohno S, Kronstad JW, Lazera M, Levitz SM, Lionakis MS, May RC, Ngamskulrongroj P, Pappas PG, Perfect JR, Rickerts V, Sorrell TC, Walsh TJ, Williamson PR, Xu J, Zelazny AM, Arturo Casadevall bb A, Kwon-Chung CK 2017. The Case for Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere* 2: 1–7.
- Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, Bahn Y-S 2014. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*.
- Lamoth F 2016. Galactomannan and 1,3-β-d-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J. Fungi* 2: 1–8.
- Leach MD, Cowen LE 2013. Surviving the Heat of the Moment: A Fungal Pathogens Perspective. *PLOS Pathogens*: 1-4.
- Lemke F Kiderlen O Kayser Amphotericin B AA 2005. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 151–162.
- Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, Wormley FL, Jr. 2016. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. *Front. Microbiol.* 7: 105.
- Liedke SC, Miranda DZ, Gomes KX, Luis J, Gonçalves S, Frases S, Nosanchuk JD, Rodrigues ML, Nimrichter L, Peralta JM, Guimarães AJ 2017. Characterization of the antifungal functions of a WGA-Fc (IgG2a) fusion protein binding to cell wall chitin oligomers. *Sci. Rep.*: 1–17.
- Lin X 2009. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. *Infect. Genet. Evol.* 9: 401–416.

- Lin X, Heitman J 2006. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 69–105.
- Liu T-B, Perlin DS, Xue C 2012. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence* 3:2: 173–181.
- Lopes LCL, Rollin-Pinheiro R, Guimarães AJ, Bittencourt VCB, Martinez LR 2010. Monoclonal Antibodies Against Peptidorhamnomannans of *Scedosporium apiospermum* Enhance the Pathogenicity of the Fungus. *PLoS Negl Trop Dis* 4: 853.
- Martinez LR, Casadevall A 2005a. Specific Antibody Can Prevent Fungal Biofilm Formation and This Effect Correlates with Protective Efficacy. *Infect. Immun.* 73: 6350–6362.
- Martinez LR, Casadevall A 2005b. Specific Antibody Can Prevent Fungal Biofilm Formation and This Effect Correlates with Protective Efficacy. *Infect. Immun.* 73: 6350–6362.
- Martinez LR, Moussai D, Casadevall A 2004. Antibody to *Cryptococcus neoformans* Glucuronoxylomannan Inhibits the Release of Capsular Antigen. *Infect. Immun.* 72: 3674–3679.
- Meya DB, Manabe YC, Castelnuovo B, Cook BA, Ali M, Kambugu A, Kanya MR, Bohjanen PR, David R 2010. Serum Cryptococcal Antigen (CRAG) Screening is a Cost- Effective Method to Prevent Death in HIV- infected persons with CD4 $\leq 100/\mu\text{L}$ starting HIV therapy in Resource-Limited Settings. *Clin Infect Dis* 51: 448–455.
- Mitchell FJ and 2011. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.* 9: 109–118.

- Montes HM, Wormley FL, Valiante V, Rodrigues AM, Nosanchuk JD, Stark RE, Casadevall A 2015. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? *Front. Microbiol.* 6: 1–7.
- Mor, V., Rella, A., Farnoud, A. M., Singh, A., Munshi, M., Bryan, A., et al. (2015). Identification of a new class of antifungals targeting the synthesis of fungal sphingolipids. *mBio* 6(3): 1-15
- Moraes Nicola A, Robertson EJ, Albuquerque P, Silveira Derengowski L da, Casadevall A 2011. Nonlytic Exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from Macrophages Occurs In Vivo and Is Influenced by Phagosomal pH. *MBio* 2: 1–9.
- Moragues MD, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Sevilla MJ, Conti S, Polonelli L, Pontón J 2003. A Monoclonal Antibody Directed against a *Candida albicans* Cell Wall Mannoprotein Exerts Three Anti-C. albicans Activities. *Infect. Immun.* 71: 5273–5279.
- Mourad A, Perfect JR 2018. The war on cryptococcosis: A Review of the antifungal arsenal. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro* 113: 170391.
- Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, Ghannoum MA 2005. Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 163–194.
- Ngel A ´, Rosas L, Nosanchuk JD, Casadevall A 2001. Passive Immunization with Melanin-Binding Monoclonal Antibodies Prolongs Survival of Mice with Lethal *Cryptococcus neoformans* Infection. *Infect. Immun.* 69: 3410–3412.
- Nguyen H, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Press EG, Shields RM, Cheng S, Mitsani D, Vadnerkar A, Silveira FP, Kleiboeker SB, Clancy CJ 2012. Performance of *Candida* Real-time Polymerase Chain Reaction, b-D-Glucan Assay, and Blood Cultures in the Diagnosis of Invasive Candidiasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 54(9): 1240–1248.

- Nicola AM, Albuquerque P, Paes HC, Fernandes L, Costa FF, Kioshima ES, Abadio AKR, Bocca AL, Felipe MS 2019. Antifungal drugs: New insights in research & development. *Pharmacol. Ther.*: 21–38.
- Nimrichter L, Frases S, Cinelli LP, Viana NB, Nakouzi A, Travassos LR, Casadevall A, Rodrigues ML 2007. Self-Aggregation of *Cryptococcus neoformans* Capsular Glucuronoxylomannan Is Dependent on Divalent Cations. *Eukaryot. Cell* 6: 1400–1410.
- Nosanchuk JD and CA 1997. Cellular Charge of *Cryptococcus neoformans*: Contributions from the Capsular Polysaccharide , Melanin , and Monoclonal Antibody Binding. *Infect. Immun.* 65: 1836–1841.
- Nosanchuk JD, Steenbergen JN, Shi L, Deepe GS, Casadevall A, Casadevall A 2003. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J. Clin. Invest.* 112: 1164–1175.
- Nucci M, Marr K a 2005. Emerging fungal diseases. *Clin. Infect. Dis.* 41: 521–526.
- Odds FC, Brown AJP, Gow NAR 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11: 272–279.
- Olszewski MA, Wormley FL, Chrissy Leopold Wager JM, Hole CR 2014. Mice Infection in *Cryptococcus neoformans* against STAT1 Signaling Is Essential for Protection. *J Immunol Ref.* 193: 4060–4071.
- Olszewski MA, Wormley FL, Williamson Sarah E Hardison PR, Malachowski AN, Davis JJ, Vedula P, Lyons DM, Park Y-D, Eastman AJ, He X, Qiu Y 2015. Polarization Response by Promoting Macrophage M2 during the Afferent Phase of the Immune *Cryptococcus neoformans* Expansion of Homolog Ssa1 Contributes to Pulmonary Cryptococcal Heat Shock Protein 70. *J Immunol Ref.* 194: 5999–6010.

- Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, Kumagai S 2011. Diagnostic Accuracy of Serum 1,3-D-Glucan for *Pneumocystis jiroveci* Pneumonia, Invasive Candidiasis, and Invasive Aspergillosis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Microbiol.*: 7–15.
- Pelleschi Taborda C, Frases S, Rao Juvvadi P, Fusco-Almeida AM, Scorzoni L, A de Paula Silva AC, Marcos CM, Assato PA, M A de Melo WC, Oliveira HC de, Costa-Orlandi CB, S Mendes-Giannini MJ 2017. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Front. Microbiol.* 8: 1–23.
- Petrovsky N, Aguilar JC 2004. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol. Cell Biol.* 82: 488–496.
- Phan TG, Tangye SG 2017. Memory B cells: total recall. *Curr. Opin. Immunol.* 45: 132–140.
- Polvi EJ, Li X, O’meara TR, Leach MD, Cowen LE 2015. Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. *Cell. Mol. Life Sci* 72: 2261–2287.
- Posch W, Steger M, Wilflingseder D, Lass-Flörl C 2017. Promising immunotherapy against fungal diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* 17: 861–870.
- Powers-Fletcher M V, Hanson KE 2016. Nonculture Diagnostics in Fungal Disease. *Infect. Dis. Clin. NA* 30: 37–49.
- Preserve L, Flora Sherman R 2011. Purification and Functional Characterization of Antibody Subclasses Produced in Response to HSV-2 gC Immunization in Mice. *Lehigh University* 1-47.

- PRIVAT J -P, MONSIGNY M 1975. Luminescence Studies of Saccharide Binding to Wheat Germ Agglutinin (Lectin). *Eur. J. Biochem.* 60: 555–567.
- Rachini A, Pietrella D, Lupo P, Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, Proietti C, Bistoni F, Cassone A, Vecchiarelli A 2007. An Anti-Glucan Monoclonal Antibody Inhibits Growth and Capsule Formation of *Cryptococcus neoformans* In Vitro and Exerts Therapeutic, Anticryptococcal Activity In Vivo. *Infect. Immun.* 75: 5085–5094.
- Racine R, Winslow GM 2009. IgM in microbial infections: Taken for granted? *Immunol. Lett.* 125: 79–85.
- Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, Denning DW, Loyse A, Boulware DR 2017. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis* 17(8): 873–881.
- Ramanan P, Wengenack NL, Theel ES 2017. Laboratory Diagnostics for Fungal Infections: A Review of Current and Future Diagnostic Assays. *Clin. Chest Med.* 38: 535–554.
- Rampini SK, Zbinden A, Speck RF, Bloemberg G V 2016. Similar efficacy of broad-range ITS PCR and conventional fungal culture for diagnosing fungal infections in non-immunocompromised patients. *BMC Microbiol.* 16: 1–8.
- Rivera J, Zaragoza O, Casadevall A 2005. Antibody-Mediated Protection against *Cryptococcus neoformans* Pulmonary Infection Is Dependent on B Cells. *Infect. Immun.* 73: 1141–1150.
- Robertson EJ, Casadevall A 2009. Antibody-mediated immobilization of *Cryptococcus neoformans* promotes biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2528-25–33.

- Rodrigues ML, Alvarez M, Fonseca FL, Casadevall A 2008. Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* suggests an association of chitinlike structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot. Cell* 7: 602–609.
- Rodrigues ML, Carlos Chagas I, Oswaldo Cruz F 2018. The Multifunctional Fungal Ergosterol. *MBio* 9: 1–5.
- Rodrigues ML, Shi L, Barreto-Bergter E, Nimrichter L, Farias SE, Rodrigues EG, Travassos LR, Nosanchuk JD 2007. Monoclonal antibody to fungal glucosylceramide protects mice against lethal *Cryptococcus neoformans* infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 1372–1376.
- Roemer T, Krysan DJ 2014. Antifungal Drug Development: Challenges , Unmet Clinical Needs , and New Approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4: 1–14.
- Rosas NL, Nosanchuk JD 2001. Passive Immunization with Melanin-Binding Monoclonal Antibodies Prolongs Survival of Mice with Lethal *Cryptococcus neoformans* Infection. *Society* 69: 3410–3412.
- Saeed AFUH, Ling S, Yuan J, Wang S 2017. The Preparation and Identification of a Monoclonal Antibody against Domoic Acid and Establishment of Detection by Indirect Competitive ELISA. *Toxins (Basel)*. 9: 2–16.
- Santos ML Dos, Quintilio W, Manieri TM, Tsuruta LR, Moro AM 2018. Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 54: 1–15.
- Schwartz S, Kontoyiannis DP, Harrison T, Ruhnke M 2018. Advances in the diagnosis and treatment of fungal infections of the CNS. *Lancet Neurol.* 17: 362–372.

- Shatzmiller S, Gellermann G, Albeck A, Malka R, Malka D, Krieger R, Traube T, Kovaliov M, Lapidot I, Zats G 2018. Bacteria Cell Wall Polypeptides as Targets for the Selectivity in Antimicrobial Peptides as Antibiotic compounds. *EC Pharmacology and Toxicology*: 559-579.
- Sherrington SL, Sorsby E, Mahtey N, Kumwenda P, Lenardon MD, Brown I, Ballou ER, Maccallum DM, Hall RA 2017. Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. *Plos Pathog.*: 1–28.
- Singh N, Paterson DL 2005. Aspergillus Infections in Transplant Recipients. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 44–69.
- Smulian AG, Sullivan DW, Theus SA 2000. Immunization with recombinant *Pneumocystis carinii* p55 antigen provides partial protection against infection: characterization of epitope recognition associated with immunization. *Microbes and Infection* 2:127-136.
- Sousa Pinheiro L, Alves de Oliveira Filho A, Queiroga Sarmiento Guerra F, Pinheiro de Menezes C, Golzio dos Santos S, Pereira de Sousa J, Barbosa Dantas T, Oliveira Lima E de 2017. Antifungal activity of the essential oil isolated from *Laurus nobilis* L. against *Cryptococcus neoformans* strains. *J. Appl. Pharm. Sci.* 7: 115–118.
- Spitzer M, Robbins N, Wright GD 2017. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. *Virulence*: 169–185.
- Stearns NA, Zhou S, Petri M, Binder SR, Pisetsky DS 2016. The Use of Poly-L-Lysine as a Capture Agent to Enhance the Detection of Antinuclear Antibodies by ELISA. *PLoS One* 9: 1–25.
- Steimbach LM, Tonin FS, Virtuoso S, Borba HHL, Sanches ACC, Wiens A,

- Fernandez-Llimós F, Pontarolo R 2017. Efficacy and safety of amphotericin B lipid-based formulations—A systematic review and meta-analysis. *Mycoses* 60: 146–154.
- Sulahian A, Porcher R, Bergeron A, Touratier S, Raffoux E, Menotti J, Derouin F, Ribaud P 2014. Use and limits of (1-3)- β -D-glucan assay (fungitell), compared to galactomannan determination (platelia Aspergillus), for diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.*: 1–23.
- Templeton S, Pirofski L-A, Johnston SA, Wormley FL, Williamson PR, Elsegeiny W, Marr KA 2018. Immunology of Cryptococcal infections: Developing a Rational approach to Patient Therapy. *Front. Immunol.* 9: 1–9.
- Theel ES, Doern CD 2013. D-Glucan Testing Is Important for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *J. Clin. Microbiol.* 51: 3478–3483.
- Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, Mcleod HL, Klein TE, Altman RB 2011. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *pharmacogenet Genomics* 21(4): 237–242.
- Torosantucci A, Bromuro C, Chiani P, Bernardis F De, Berti F, Galli C, Norelli F, Bellucci C, Polonelli L, Costantino P, Rappuoli R, Cassone A 2005. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. 202: 597–606.
- Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, Bernardis F De, Palma AS, Liu Y, Mignogna G, Maras B, Colone M, Stringaro A, Zamboni S, Feizi T, Cassone A 2009. Protection by Anti-b-Glucan Antibodies Is Associated with Restricted b-1,3 Glucan Binding Specificity and Inhibition of Fungal Growth and Adherence. *PLoS One* 4: 1–17.
- Vallabhaneni S, Mody RK, Walker T, Chiller T 2016. The Global Burden of Fungal Diseases. *Infect Dis Clin N Am* 30: 1–11.

- Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT 2012. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *Int. J. Microbiol.*: 1–26.
- Walker CA, Gómez BL, Mora-Montes HM, Mackenzie KS, Munro CA, P Brown AJ, R Gow NA, Kibbler CC, Odds FC 2010. Melanin Externalization in *Candida albicans* Depends on Cell Wall Chitin Structures. *Eukaryotic cell* 9: 1329–1342.
- Wang Z, Raifu M, Howard M, Smith L, Hansen D, Goldsby R, Ratner D 2000. Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: The design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J. Immunol. Methods* 233: 167–177.
- Wu S, Wang Y, Liu N, Dong G, Sheng C 2017. Tackling Fungal Resistance by Biofilm Inhibitors. *J. Med. Chem.* 60: 2193–2211.
- Zeller I, Schabereiter-Gurtner C, Mihalits V, Selitsch B, Barousch W, Hirschl AM, Makristathis A, Willinger B 2017. Detection of fungal pathogens by a new broad range real-time PCR assay targeting the fungal ITS2 region. *J. Med. Microbiol.* 66: 1383–1392.
- Zhou H, Fisher RJ, Papas11+ TS 1994. Optimization of primer sequences for mouse scFv repertoire display library construction. *Nucleic Acids Research* 22(5): 888-889
- Zhu X, Gibbons J, Garcia-Rivera J, Casadevall A, Williamson PR 2001. Laccase of *Cryptococcus neoformans* Is a Cell Wall-Associated Virulence Factor. *Infect. Immun.* 69: 5589–5596.
- Zotchev S 2012. Polyene Macrolide Antibiotics and their Applications in Human Therapy. *Curr. Med. Chem.* 10: 211–223.

10. ANEXO

ANEXO A – Depósito de Patente dos Anticorpos Monoclonais Anti- Quitooligômeros



31/01/2020 870200015101
15:21
29409161915405687

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 002165 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 33781055000135

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AV. BRASIL, 4365

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 21045900

País: Brasil

Telefone: 0000-0000

Fax:

Email:

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 31/01/2020 às
15:21, Petição 870200015101