

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

**Avaliação da utilização de uma vacina de DNA contendo a região
codificadora de 14-3-3 de *Cryptococcus gattii* como estratégia profilática
para criptococose**

Moara Rodrigues Mingori

Orientadora: Prof^a. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, Março 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

**Avaliação da utilização de uma vacina de DNA contendo a região
codificadora de 14-3-3 de *Cryptococcus gattii* como estratégia profilática
para criptococose**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Moara Rodrigues Mingori

Orientadora: Prof^ª. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, Março 2014

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	VI
Lista de Figuras.....	IX
Lista de Tabelas.....	XIII
Resumo.....	XIV
Abstract.....	XV
Introdução.....	16
Materiais e Métodos.....	36
Resultados.....	52
Discussão.....	66
Conclusões.....	71
Referências Bibliográficas.....	73
Anexos.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
°C	Grau Celsius
AFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmento Amplificado
BSA	Soro Albumina Bovina
C.	<i>Cryptococcus</i>
cDNA	DNA complementar
CDS	Sequência de DNA codificadora
Cg 14-3-3	Proteína 14-3-3 de <i>C. gatti</i>
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido dexoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FITC	Isotiocianato de Fluoreceína
h	Hora
(s)	Segundos

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
<i>Hsp</i>	Heat Shock Protein
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon-gamma
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilodáton(s)
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	MiliAmpère
mg	Miligrama
min	minuto(s)
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanograma
NCBI	<i>National Center Protein Identification Technology</i>
pb	Par de Base
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico

PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
<i>q.s.p</i>	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
S	segundo(s)
SAP	Fosfatase alcalina de camarão
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
Th	Linfócitos T auxiliares
TNF	Interferon
V	volume
VG	Tipo molecular de <i>C. gattii</i>
ϵ	Épsilon
ϵ 214-3-3	Isoforma épsilon da proteína 14-3-3 de <i>E. granulosus</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.

Ciclo da Criptococose19

Figura 02.

Ativação da resposta imune para Criptococose.....25

Figura 03.

Perfil da resposta imune anti-fúngica frente a um imunógeno.....31

Figura 04.

Esquema sequencial de imunizações e coletas sanguíneas por punção retro orbital.....46

Figura 05.

Representação dos domínios conservados da proteína 14-3-3 de *C. gattii*.....53

Figura 06.

Parâmetros de antigenicidade da proteína 14-3-3 de *C. gattii* gerados pelo programa Protean54

Figura 07.

Análise do produto de PCR para amplificação das sequências codificadoras da proteína 14-3-3 de *C. gattii* utilizando os iniciadores 14-3-3_pcDNA3.1(+)*F* e 14-3-3_pcDNA3.1(+)*R*.....55

Figura 08.

Análise dos produtos das clivagens para confirmação do clone recombinante.....56

Figura 09.

Expressão transiente da vacina de DNA contendo o gene 14-3-3 de *C. gattii*.....57

Figura 10.

Análise da especificidade do anticorpo anti-ε214-3-3 de *E. granulosus* na detecção da proteína 14-3-3 de *C. gattii*.....58

Figura 11.

Análise da localização das proteínas 14-3-3 em células *C. gattii*.....59

Figura 12.

Confirmação do clone contendo o plasmídeo pET23-d + 14-3-3.....60

Figura 13.

Análise da expressão da proteína 14-3-3 (30 kDa).....61

Figura 14.

Purificação da proteína recombinante Cg14-3-3.....62

Figura 15.

Níveis de imunoglobulinas (IgG) detectadas em amostras sorológicas de camundongos imunizados com o plasmídeo recombinante contendo o gene 14-3-3 de *C. gattii* após 15 dias de imunização.....63

Figura 16.

Níveis de imunoglobulinas (IgG) detectadas em amostras sorológicas de camundongos imunizados com o plasmídeo recombinante contendo o gene 14-3-3 de *C. gattii* após 45 dias de imunização.....64

Figura 17.

Níveis de imunoglobulinas detectadas em amostras sorológicas de camundongos imunizados com o plasmídeo recombinante contendo o gene 14-3-3 de *C. gattii* após 15 e 45 dias de imunização.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.

Oligonucleotídeos utilizados no estudo (T.A.: temperatura de anelamento).....38

Tabela 02.

Esquema de inoculações dos camundongos.....46

Tabela 03.

Características do gene e proteína 14-3-3 de *C. gattii*.....53

RESUMO

Cryptococcus gattii é um patógeno emergente que infecta principalmente indivíduos imunocompetentes, causando criptococose. Dentre os tratamentos estão anfotericina B e fluconazol, porém são insuficientes na erradicação da doença. A estimulação da resposta imune por vacinas de DNA em diversos modelos fúngicos vem sendo relatados. Dentre as proteínas fúngicas candidatas no desenvolvimento de vacinas estão às proteínas 14-3-3, as quais foram identificadas como proteínas imudominantes em estudos de proteômica de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* e em soro de pacientes com criptococose. O objetivo deste estudo foi realizar a construção do vetor recombinante contendo a região codificante do gene 14-3-3, seguido da análise preliminar da resposta imune em camundongos imunizados. A região codificante do 14-3-3 foi clonada em vetor de expressão eucariótico pcDNA3.1(+) e a funcionalidade do vetor recombinante foi confirmada a nível transcricional por RT-PCR a partir de células A549 transfectadas com a vacina de DNA e a nível traducional por *imunobloting*. A proteína 14-3-3 foi ainda localizada na parede celular da levedura, revelado por metodologias de microscopia por imunofluorescência. A porção codificante do gene 14-3-3 de *C. gattii* foi clonada em vetor de expressão pET23-d e a proteína recombinante foi expressa em células de *E. coli* BL21 e purificada por cromatografia de afinidade a níquel. A resposta imune humoral foi determinada por dosagem de imunoglobulinas, porém não ocorreu diferença estatística na indução de imunoglobulinas totais em camundongos inoculados com a vacina. Assim esse trabalho contribuiu para o estudo imunogenicidade da proteína 14-3-3 em *C. gattii* permitindo possíveis estudos em outros modelos animais usando a mesma estratégia profilática.

ABSTRACT

Cryptococcus gattii is an emerging pathogen that mainly infects immunocompetent individuals, causing cryptococcosis. Among the treatments are amphotericin B and fluconazole, but they have proven insufficient in eradicating this disease. The immune responses stimulation by DNA vaccines in several fungal models has been reported. Among fungal candidate proteins in vaccine development are the 14-3-3 proteins, which were identified as immunodominant sera proteins in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* proteomics and in serum of patients with cryptococcosis. The study aimed to construct a recombinant vector containing the 14-3-3 coding region, followed by the immune response preliminary analysis of immunized mice. The 14-3-3 gene was cloned into a eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+) vector and RT-PCR confirmed the recombinant transcriptional level functionality from A549 transfected with DNA vaccine cells and translational level by immunoblotting. The 14-3-3 protein was localized associated with the yeast cell wall, as revealed by immunofluorescence microscopy. The coding portion of the 14-3-3 *C. gattii* gene was cloned into pET23-d expression vector and the recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21 and purified by nickel affinity chromatography. The humoral immune response was determined by serum total immunoglobulin measurements, but no statistical differences were observed in total immunoglobulins from vaccine-inoculated mice. Thus, this research contributed to 14-3-3 *C. gattii* protein immunogenicity study, allowing possible researches in other animal models applying the same prophylactic strategy.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da Criptococose

Os dilemas no tratamento de doenças fúngicas relacionados à eficácia de fármacos, a toxicidade e altos níveis de mortes tem se tornado um desafio de saúde pública nas últimas décadas. A criptococose é uma doença fúngica invasiva causada majoritariamente pelos agentes etiológicos *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, podendo infectar indivíduos com sistema imune suprimido e até mesmo indivíduos imunocompetentes (Byrnes *et al.*, 2011).

O estabelecimento da criptococose por espécies do complexo *C. neoformans* se dá por inalação de propágulos infectivos dispersos no ambiente que alcançam os alvéolos pulmonares. Após a entrada do fungo no hospedeiro a evolução da doença pode apresentar perfil latente ou agudo dependendo de fatores como perfil imune do hospedeiro e virulência da linhagem (Figura 1) (Chayakulkeeree e Perfect, 2006; Lin e Heitman, 2006).

Existem diferenças significativas entre o perfil de infecção causado por *C. gattii* e *C. neoformans*. Ao passo que *C. neoformans* causa rápida disseminação cerebral com graves complicações no quadro de meningoencefalite em modelo de infecção animal por inalação, *C. gattii* causa alta incidência de criptococomas no pulmão e minimizada resposta a terapia antifúngica, provavelmente devido a algum fator desconhecido presente

durante o quadro infeccioso aliado a proteção imunitária do paciente que leva a redução da disseminação para o cérebro e estimula a infecção pulmonar (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2012). Além disso, evidências têm chamado a atenção dos pesquisadores para as linhagens emergentes de *C. gattii* desde o surto de criptococose ocorrido em 1999 na Colúmbia Britânica no Canadá aliado ao crescimento vertiginoso das infecções no noroeste dos Estados Unidos, que se iniciou em 2004 até dias atuais. Esse crescimento acelerado demonstra o alto grau de adaptabilidade dessa espécie principalmente por infectar indivíduos imunocompetentes (Byrnes *et al.*, 2009, Byrnes *et al.*, 2010).

Os medicamentos utilizados para criptococose disponíveis atualmente são os antifúngicos Anfotericina B e fluconazol, porém estes possuem efeitos tóxicos para o organismo e podem causar resistência fúngica (Gullo *et al.*, 2013; Perfect *et al.*, 2010). Com exceção de voriconazol, a falta de novos medicamentos aprovados nos últimos 10 anos no tratamento de criptococose e os problemas encontrados na utilização das drogas não específicas que a medicina dispõe, determina o gerenciamento insuficiente da doença através de método de diagnóstico, controle da toxicidade e regulação da imunidade do hospedeiro (Perfect *et al.*, 2010).

Diversas técnicas e metodologias imunoterapêuticas como imunização ativa, imunização passiva e administração de citocinas protetoras tem proporcionado avanços no tratamento da criptococose (Antachopoulos e Walsh, 2012). Interessantemente, no cenário imunoterapêutico do estudo da criptococose proteínas imunodominantes vêm sendo identificadas como candidatas no desenvolvimento de novas vacinas capazes de estimular a resposta imune do hospedeiro conferindo proteção contra a doença

(Chaturvedi *et al.*, 2013). Proteínas localizadas na parede celular do fungo como as manoproteínas, podem induzir resposta imune celular tipo Th1 em animais imunizados após a infecção por *Cryptococcus neoformans*, retratando a capacidade imunoestimulatória desta proteína (Mansour *et al.*, 2002). Igualmente outras proteínas como glicosilceramidas de *C. neoformans* são alvos terapêuticos, pois a administração de anticorpos contra esta proteína gerou proteção em modelo animal contra criptococose (Rodrigues *et al.*, 2007). Proteínas da família *Heat shock proteins (Hsp)*, enolase e proteínas 14-3-3 têm sido identificadas como antígenos de *C. gattii* e *C. neoformans* (Martins *et al.*, 2013).

Diante disto, o desenvolvimento e estudo de novos alvos terapêuticos e terapias alternativas no contexto imunológico são extremamente necessárias para o tratamento e prevenção da criptococose.

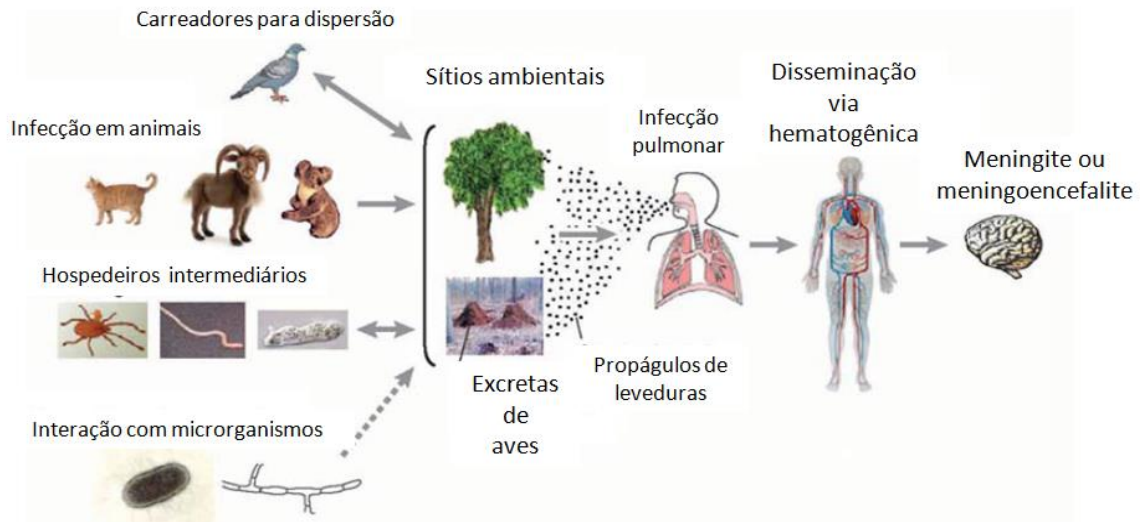


Figura 01 - Ciclo da Criptococose. Propágulos infectivos do fungo podem estar presentes no ambiente em árvores, solo e excretas de aves, e infectar animais. As leveduras podem ainda interagir com outros organismos do ambiente. Na infecção humana as leveduras são inaladas e alojam-se inicialmente nos alvéolos pulmonares. Por disseminação pela via hematogênica, ocorre o desenvolvimento da meningoencefalite ou meningite. Figura adaptada de Lin e Heitman, 2006.

1.2 *Cryptococcus gattii*

Cryptococcus gattii é uma levedura classificada dentro do filo Basidiomycota e membro do complexo de espécies *C. neoformans*, que inclui *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii* e *C. gattii*. Essas leveduras são agentes etiológicos da criptococose e estão associadas a mais de 30 milhões de mortes anuais em indivíduos portadores do Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV) de acordo com a Organização Mundial de Saúde e Programa HIV/AIDS das Nações Unidas (Lin e Heitman, 2006). *C. gattii* é considerado um patógeno primário, que acomete preferencialmente

pacientes imunocompetentes causando a criptococose, durante o curso da doença apresenta características peculiares como o aparecimento de criptococomas no cérebro e pulmão que levam a complicações graves que requerem com maior frequência de intervenção cirúrgica (Byrnes *et al.*, 2011). Acreditava-se que o nicho natural de *C. gattii* era apenas árvores do gênero *Eucalyptus* (Sorrell *et al.*, 1996), porém já é conhecido que essas leveduras habitam árvores de variadas espécies em regiões de clima tropical, subtropical e atualmente tem se disseminado em regiões de clima temperado (Kidd *et al.*, 2004; Mak *et al.*, 2010). Existem relatos, em menor escala, do isolamento de *C. gattii* e *C. neoformans* em excretas de aves e de animais domésticos (Abegg *et al.*, 2006; Lugarini *et al.*, 2008; Springer and Chaturvedi, 2010).

C. gattii é dividido em dois sorotipos, B e C, tomando como base características antigênicas em sua cápsula polissacarídica (Sorrell, 2001). Estudos epidemiológicos moleculares, baseados em análises por PCR *fingerprinting* e por Polimorfismo de Tamanho de Fragmento Amplificado (AFLP) classificaram esta espécie em quatro tipos moleculares diferentes, VGI=AFLP4, VGII=AFLP6, VGIII=AFLP5, VGIV=AFLP7 (Kidd *et al.*, 2004). A virulência e distribuição geográfica destes tipos moleculares variam significativamente. O tipo molecular VGI tem sido isolado em diferentes regiões do globo, porém é considerado endêmico na Austrália (Cogliati, 2013) ao passo que o tipo molecular VGII, foi responsável por aproximadamente 95% das infecções causadas por *C. gattii* no surto de criptococose ocorrido nas Ilhas de Vancouver no Canadá e recentemente no norte dos Estados Unidos, os dois genótipos responsáveis pela maioria dos isolados foram VGIIa e VGIIb (Byrnes *et al.*, 2009; MacDougall *et al.*, 2007). Já os tipos moleculares VGIII e VGIV

são encontrados em menor frequência, sendo VGIII isolado na Índia e em regiões Iberoamericanas e VGIV isolado nos Estados Unidos e no continente africano (Cogliati, 2013). Um estudo pontual analisou a distribuição epidemiológica de *C. neoformans* e *C. gattii* em países da América Latina como Argentina, Colômbia, Brasil e México sugerindo a disseminação de certas variedades de *C. gattii* a partir de regiões da América do Norte para países latinos, através do aumento registrado dos tipos moleculares VGIII e VGII de *C. gattii* em cerca de 10% do total de amostras analisadas nestes países. Porém o estudo ressaltou que a maioria dos isolados, próximo de 41%, pertence ao tipo molecular VNI de *C. neoformans* variedade *grubii* (Meyer *et al.*, 2003).

Um estudo recente demonstrou o perfil da infecção por *C. gattii* no Brasil relatando essa espécie como endêmica em regiões localizadas ao norte do país como Piauí e Teresina. Na análise, o genótipo VGII de *C. gattii* foi apontado como o segundo isolado clínico mais frequente dentre as amostras coletadas de crianças, jovens e adultos (Martins *et al.*, 2011). Nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do país o predomínio é de espécies de *C. neoformans* sorotipo A (Nishikawa *et al.*, 2003). Ainda ao sul do país, na cidade de Porto Alegre, foram identificados e caracterizados isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*. demonstrando predomínio das amostra coletadas pertencentes ao sorotipo A. A maioria das amostras ambientais e clínicas foram identificadas como o tipo molecular VNI de *C. neoformans*. Em destaque as amostras relacionadas à variedade *gattii*, foram identificadas para o tipo molecular VGIII como majoritário, ao passo que o tipo molecular VGIV não foi encontrado neste estudo (Casali *et al.*, 2003; Horta *et al.*, 2002)

1.3 A defesa de hospedeiro contra Criptococose

A presença de partículas infecciosas de leveduras dentro do hospedeiro não necessariamente leva ao desenvolvimento da criptococose, uma vez que espécies de *Cryptococcus* podem colonizar o trato respiratório sem causar doença (Lin e Heitman, 2006). Porém para o estabelecimento da infecção, as leveduras precisam ultrapassar as barreiras de defesa do hospedeiro, incluindo membranas celulares, receptores e fatores humorais diversos (Romani, 2004). A resposta imune inata constitui-se do sistema complemento e células fagocíticas efetoras como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (Antachopoulos e Walsh, 2012). O sistema complemento associado à ativação de macrófagos pela via clássica, facilita a fagocitose do patógeno (Voelz e May, 2010). A imunidade inata, além de ser a primeira linha de defesa, gera sinais fundamentais para a ativação da resposta imune adaptativa. Os receptores de reconhecimento padrão são importantes nesse cenário, um estudo destacou a importância do receptor TLR9 na resposta imune protetora contra criptococose pulmonar, mediando indução de quimiocinas e citocinas durante a infecção (Qiu *et al.*, 2012). A resposta imune adaptativa para conter a criptococose envolve a imunidade mediada por célula e a imunidade humoral. A resposta imune mediada por célula, através da polarização Th1, envolve a secreção de citocinas como Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α , Interferon (IFN)- γ e interleucinas (IL)-12 e (IL)-13 e a polarização por células Th17, Interleucina (IL)-23 e (IL)-17 são componentes necessários para eliminação da doença. O influxo de citocinas pró- inflamatórias são estimuladas pela atuação de células T, CD4⁺ e CD8⁺ estabelecendo um ciclo de retroalimentação positiva que leva a eliminação do patógeno do ambiente pulmonar e

prevenindo a disseminação (Antachopoulos e Walsh, 2012; Hardison *et al.*, 2012). A resposta imune Th2 marcada pela secreção de Interleucinas tipo IL-13 e IL-14, é considerada não protetora em modelo animal, porém é necessária para um efeito sinérgico com a resposta Th1 na eliminação da doença (Murphy *et al.*, 1998). Os macrófagos alveolares são a primeira linha de defesa para *C. neoformans*. Essas células fagocíticas estimulam a síntese de molécula efetoras da resposta inflamatória caracterizada pelo aumento na disponibilidade de neutrófilos e monócitos nos sítios de infecção. A secreção de quimiocinas por polarização da resposta Th1/Th17 são essenciais para manter e reforçar a resposta imune de forma efetiva contra criptococose (Antachopoulos e Walsh, 2012).

Um estudo interessante retrata os resultados divergentes que podem ocorrer a partir da interação entre células de *C. neoformans* e macrófagos alveolares. As células do fungos quando internalizadas podem ser eficientemente eliminadas pelo sistema imune do hospedeiro (fagossomo), entrar em latência seguida por posterior reativação ou podem sobreviver, desenvolvendo a criptococose pulmonar ou meningoencefalite. Esses resultados são possíveis dependendo da capacidade de infecção do fungo e do perfil imune do hospedeiro que determina qual via de ativação do macrófago alveolar será estimulada (McQuiston e Williamson, 2012). Porém, a relação íntima entre células fúngicas e macrófagos pode representar um mecanismo muito oneroso para o patógeno e há relatos de que células de *C. gatti* e *C. neoformans* podem modular seu tamanho apresentando morfologia aumentada na forma de células gigantes impedindo a fagocitose para proteger-se do sistema imune do hospedeiro (Okagaki e Nielsen, 2012). A complexa relação

patógeno-hospedeiro travada entre o fungo e o macrófago alveolar é exemplificada ainda por estudos que relatam que a levedura internalizada é capaz de deixar o macrófago por meio de um mecanismo que não causa morte de nenhuma das células envolvidas, denominado exocitose não-lítica ou extrusão (Nicola *et al.*, 2011).

O controle eficiente de *C. neoformans* requer um balanço delicado entre a resposta tipo Th1 e Th2, num processo orquestrado que desencadeia infiltração de células B e T gerando uma produção maciça de anticorpos específicos que por sua vez ativam fagócitos em uma retroalimentação positiva que leva a morte (Figura 02) (Huffnagle e Lipscomb, 1992; Zhou e Murphy, 2006). A atuação de citocinas tipo Th1 tem um papel essencial na proteção inicial contra a criptococose pulmonar. Porém, a ativação Th1 é incapaz de conter, sozinha, a disseminação da doença, sendo necessário o influxo da resposta tipo Th2 para eliminação da infecção em modelo animal (Hoag *et al.*, 1997). A ativação da via do Sistema complemento também se mostrou necessária para disseminação de *C. neoformans* e *C. gattii* em experimentos *in vivo* (Mershon *et al.*, 2009; Mershon-Shier *et al.*, 2011).

C. gattii apresenta vários fatores de virulência para persuadir o complexo sistema imune do hospedeiro. Além dos principais atributos como presença da cápsula polissacarídica, a produção de melanina, a interação com macrófagos e o desenvolvimento a 37°, as leveduras são capazes de expressar genes que conferem proteção frente ao ambiente do hospedeiro. Já foi relatado que o gene codificador da enzima lacase, envolvida em processos de proteção contra o estresse oxidativo em macrófagos, pode modular o influxo de células CD4⁺ e

favorecer a disseminação da doença no sistema nervoso central (Qiu *et al.*, 2012).

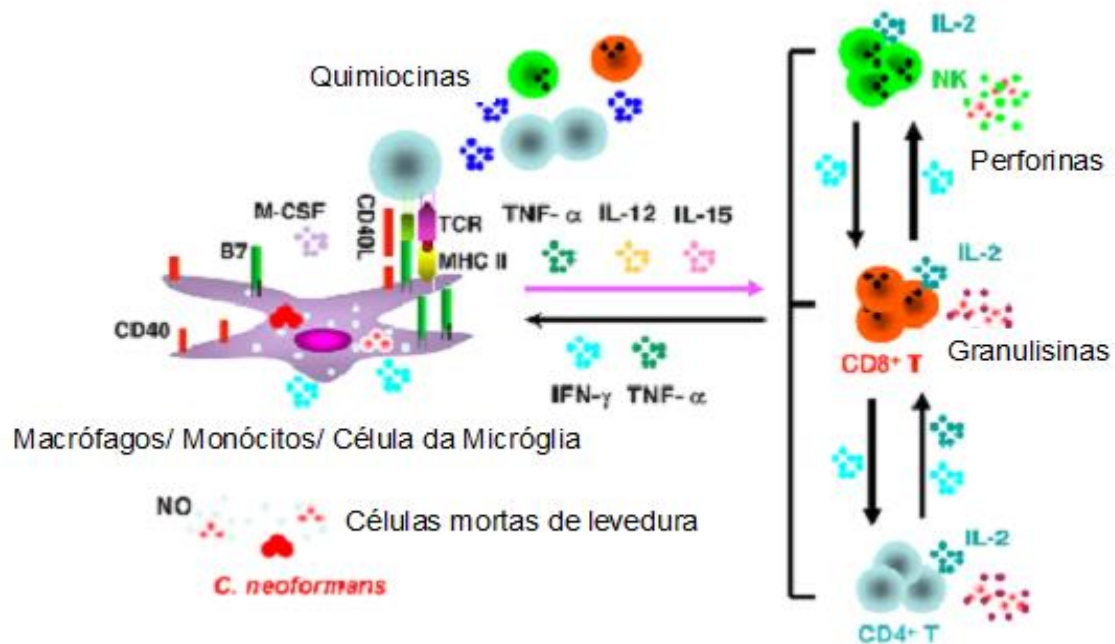


Figura 02. Ativação da resposta imune para Criptococose.

Macrófagos/monócitos alveolares podem englobar células de levedura e atuarem como Células apresentadoras de antígeno a linfócitos T. Quimiocinas como CCL2 medeiam à comunicação entre células fagocíticas ativadas e linfócitos juntamente com citocinas tipo Th1 como INF- γ e TNF- α . Moléculas oxidativas como NO aumentam a atividade fungicida paralelamente a ação de granulinas e perforinas que induzem apoptose e morte de células de Cryptococcus. Figura adaptada de Zhou e Murphy, 2006).

1.4 Vacina de DNA contra Doenças fúngicas

Os fármacos utilizados atualmente para o tratamento de criptococose são os antifúngicos anfotericina B e fluconazol que apresentam alguns efeitos tóxicos ao organismo (Odom *et al.*, 1997). O antifúngico anfotericina B mostra-se efetivo no tratamento contra criptococose, porém possui efeito altamente hepatotóxico. Distintivamente, fluconazol apresenta baixa toxicidade, e demonstra grande alcance de penetração em diversos tecidos incluindo sistema nervoso central (Nooney *et al.*, 2005). Porém várias linhagens resistentes de *C. neoformans* e *C. gattii* têm aumentado vertiginosamente revelando-se um problema de saúde pública, este fato estimula à investigação de novos alvos para intervenção terapêutica (Gast *et al.*, 2013). A vacinação tem sido muito investigada nesse contexto, desde a descoberta bem sucedida da vacinação contra varíola em 1796 realizada por Edward Jenner (Stewart e Devlin, 2006), várias tecnologias aprimoraram a imunização por vacinação buscando a cura ou tratamento de doenças.

Estudos bem preliminares acerca da vacinação contra criptococose já revelaram certa proteção contra *C. neoformans* por estimulação da resposta imune não específica via administração de endotoxina bacteriana (Louria, 1960). Estudos foram desenvolvidos utilizando células mortas ou linhagens atenuadas em ensaios de imunização em modelo animal. O potencial imunogênico de oligossacarídeos presentes na cápsula também foi explorado na produção de vacinas visando à profilaxia contra criptococose, a vacina revelou resultados promissores quanto à imunogenicidade em modelo animal (Oscarson *et al.*, 2005) .

Estudos que interrelacionam patógenos e indução da imunidade demonstraram que a exposição a *Mycobacterium bovis* anterior a indução da infecção por *C. neoformans* levou ao aumento de Interferon (IFN)- γ , redução no influxo de interleucina (IL)-5 e de eosinófilos no pulmão de camundongos infectados por *C. neoformans*. Este estudo sugere que a utilização do patógeno como vacina viva atenuada pode modular a resposta entre os tipos Th1 e Th2 no curso da infecção, conferindo proteção contra a doença (Walzl *et al.*, 2003).

Outras pesquisas demonstram que crianças podem entrar em contato com *C. neoformans* nos primeiros anos da infância, porém estudos são necessários para determinar a sintomatologia da criptococose pulmonar primária infantil (Goldman *et al.*, 2001). Da mesma forma indivíduos expostos à infecção mantêm os títulos de anticorpos elevados no soro sempre que desafiados a *C. neoformans* e *C. gattii* (Chen *et al.*, 1999; Marr *et al.*, 2012). Além disso, estudos destacam que infecções causadas por linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* podem ser vias facilitadoras para complicações respiratórias como asma, rinites ou micoses bronco-pulmonares graves (Arora e Huffnagle, 2005). A infecção criptocócica infantil pode se apresentar de forma assintomática, porém sua alta potencialidade de prospecção para outras doenças respiratórias na vida adulta merece ser investigada. Assim se faz necessário o estudo e investigação de novas estratégias de vacinação contra criptococose (Casadevall e Pirofski, 2005).

No início dos anos 90, a nova era das vacinas foi representada pela imunização com ácido desoxirribonucleico ou mais reconhecidamente como vacina de DNA, na qual conhecimentos avançados em biologia molecular aliado a microbiologia têm ajudado no controle e profilaxia de inúmeras

doenças infecciosas, autoimunes, inflamatórias e cânceres induzindo rápida e eficiente resposta imune tanto a nível celular quanto humoral, gerando até mesmo tolerância imunológica (Ferrera *et al.*, 2007).

Dentro deste cenário, vacinas de DNA mostram-se como uma alternativa interessante para a apresentação de moléculas antigênicas ao sistema imune do hospedeiro. Elas são construídas através da tecnologia do DNA recombinante e consistem da administração de vetores contendo um plasmídeo de expressão eucariótico, responsável por codificar o antígeno de interesse no hospedeiro, levando a apresentação deste ao sistema imune e conferindo proteção contra diversas patologias em ensaios *in vivo* (Cutler *et al.*, 2007; Gurunathan *et al.*, 2000b) (Figura 03). Sendo assim, além das vacinas disponíveis que induzem resposta imune humoral em longo prazo, as vacinas de DNA apresentam-se como estratégia tentadora para indução de resposta imune mediada por célula, além da resposta imune mediada por anticorpo, tão importante para o tratamento de doenças causadas por organismos intracelulares (Gurunathan *et al.*, 2000a).

Um dos primeiros estudos que demonstrou eficientemente que o DNA poderia ser utilizado para induzir resposta imune contra infecções patogênicas utilizou a sequência codificadora do hormônio do crescimento humano na pele de camundongos através da técnica de *gene gun*, e este procedimento aumentou anticorpos específicos contra o hormônio humano (Tang *et al.*, 1992). Diversos estudos se seguiram relatando o uso de vacinas de DNA para estimulação da resposta imune contra patógenos e tumores. Dois destes trabalhos demonstraram a geração de resposta imune contra o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) e mais recentemente uma vacina quimérica

utilizando (HIV-1) e proteínas de membrana associada ao lisossomo que gerou resposta de longa duração para células T de memória CD4⁺ e CD8⁺ e células B (de Arruda *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1993). Resultados semelhantes foram encontrados na medicina veterinária, após imunização com DNA contra o vírus da Herpes bovino I (Cox *et al.*, 1993). Estudos mais robustos demonstram que vacinas de DNA estimulam resposta imune humoral e celular contra doenças infecciosas. Dois estudos são representativos, um deles utilizando-se do modelo de tuberculose demonstrou que uma vacina codificando epítomos de células T foi capaz de induzir o repertório de citocinas Th1, aumentar a atividade de linfócitos T citotóxicos, induzir anticorpos do tipo IgG, conferindo proteção a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Jiang *et al.*, 2013). Resultados interessantes foram encontrados para doenças fúngicas. A imunização com DNA de *Hsp65* foi indicado como forte candidato na prevenção e tratamento contra paracoccidiomicose, uma vez que a vacina de DNA gerou forte indução de citocinas como INF- γ e IL-12 via resposta Th1 (Ribeiro *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2010). Diferentemente do resultado encontrado utilizando um epítomo a partir de GP43, o principal antígeno de superfície de *Paracoccidioides brasiliensis*, que demonstrou níveis elevados de IgG1 caracterizando a polarização para resposta Th2 (Rittner *et al.*, 2012). Porém, ambos os estudos apresentaram marcada redução na carga fúngica observado nos cortes histológicos, tornando o antígeno candidato tanto para o tratamento profilático quanto terapêutico da doença.

De modo geral os estudos sobre vacinação utilizando antígenos como polissacarídeos e lipídios de *C. neoformans* têm demonstrado que esses antígenos são capazes de induzir resposta imune e fornecer moderado grau

de proteção contra a doença, porém pouco se sabe sobre proteínas que atuem como antígenos majoritários para a infecção. Polissacarídeos como GXM conjugado com proteínas carreadoras apresentaram proteção via indução de anticorpos (Devi, 1996). Manoproteínas também foram extensivamente estudadas e foram vistas como antígenos majoritários em preparações filtradas de *Cryptococcus*, demonstrando forte indução da resposta imune mediada por célula durante a infecção (Mansour *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 1988). Esta proteína ainda foi relatada como moduladora da resposta imune do hospedeiro via secreção de citocinas como Interferon (IFN)- γ conferindo proteção em modelo animal de infecção por *C. neoformans* (Pietrella *et al.*, 2001). Contudo, até o momento não há nenhuma estratégia relatada de terapia imune efetiva ou vacina de DNA para o tratamento da criptococose.

O progresso ocorrido na imunização por DNA a partir de vacinas de segunda geração tem sua eficácia aumentada devido a diversos fatores como o melhoramento da entrega dos plasmídeos recombinantes as células alvos, a administração de adjuvantes vacinais e a otimização de sequências imunogênicas, processos que estimulam os crescentes ensaios clínicos em curso que utilizam vacinas de DNA tanto numa perspectiva profilática quanto terapêutica (Ferraro *et al.*, 2011).

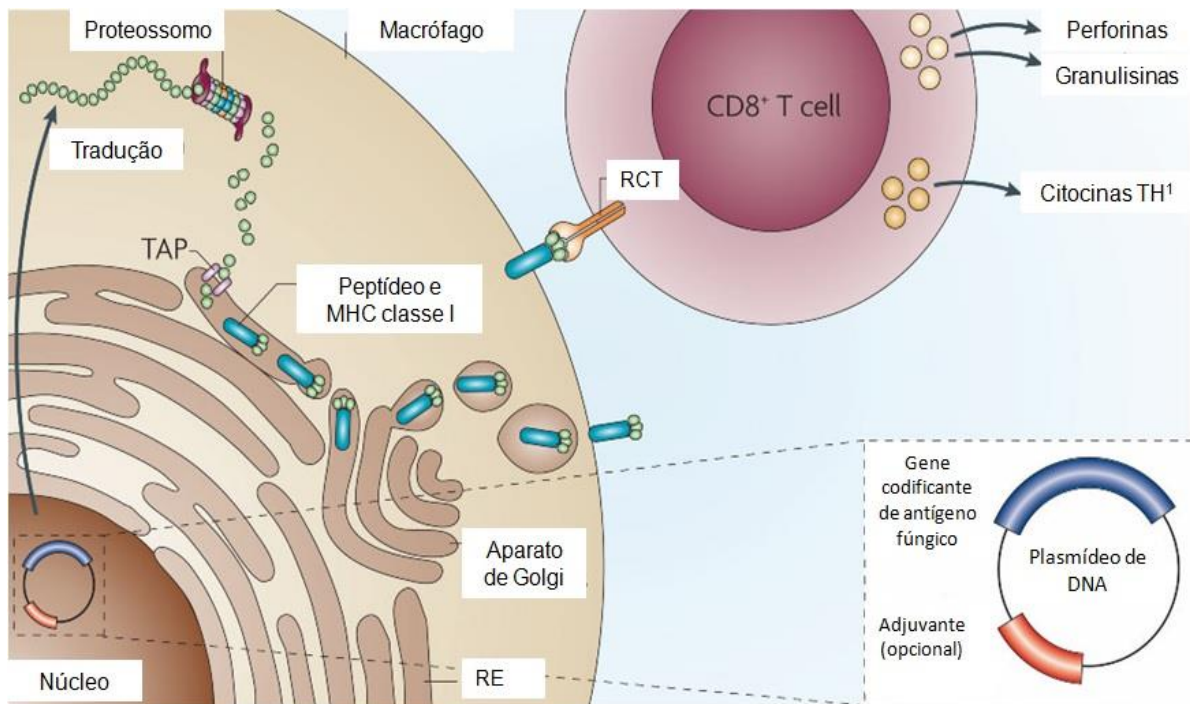


Figura 03 – Perfil da resposta imune anti-fúngica frente a um imunógeno.

Na vacinação por DNA, o plasmídeo contém um gene fúngico que está sendo expresso sob controle de um promotor ativo. As proteínas fúngicas são traduzidas no citosol e posteriormente entram na rota endógena de processamento de antígeno. O complexo de histocompatibilidade I (MHC-I) apresenta o antígeno (peptídeo) a células T CD8⁺ que estimula a indução de citocinas Th1 e secreção direta de perforinas e granulinas. Outros genes podem ser co-expressos funcionando como adjuvantes na maximização da resposta imune. Figura adaptada de Cutler *et al.*, 2007.

1.5 Proteínas 14-3-3

Entre as proteínas identificadas e descritas como proteínas criptocócicas imunodominantes com potencial para induzir resposta imune estão as proteínas 14-3-3 e fosfopiruvato hidratase (enolase) (Jobbins *et al.*,

2010; Young *et al.*, 2009).Essas proteínas também foram encontradas como produtos de secreção por meio de vesículas relacionadas à patogênese em *C. neoformans* (Rodrigues *et al.*, 2008), bem como identificadas como proteínas imunogênicas em experimentos utilizando soro de pacientes infectados com *C. gattii*, revelando-se assim como antígeno potencial para diagnóstico de infecção causada por esta levedura (Martins *et al.*, 2013).

As proteínas 14-3-3 formam uma família de proteínas acídicas altamente conservadas e expressas em todos os organismos eucarióticos, com massa molecular de aproximadamente 30 kDa (Obsil e Obsilova, 2011). Essas proteínas regulam importantes processos biológicos como transdução de sinal, ciclo celular e apoptose através de sua interação direta com resíduos de Serina/Treonina fosfatados de proteínas alvo (Gardino e Yaffe, 2011; Tzivion *et al.*, 2011; Yaffe e Elia, 2001). As proteínas 14-3-3 são abundantes no tecido cerebral e sua localização clássica em células eucarióticas é citoplasmática, porém elas já foram encontradas na superfície de membranas celulares e organelas como o complexo de Golgi e núcleo (Fu *et al.*, 2000).

Existe um número variado de isoformas que parece ser espécie-específico, em mamíferos são encontradas sete isoformas diferentes, ao passo que em *Arabidopsis spp.* pelo menos 13 isoformas da proteína já foram descritas (van Heusden e Steensma, 2006). O alto grau de conservação destas proteínas e sua natureza ubíqua reflete sua importância biológica no desenvolvimento de organismos eucarióticos, o que já foi relatado por diversos estudos (Fu *et al.*, 2000).

Em diferentes organismos foi demonstrado que as proteínas 14-3-3 são capazes de interagir com mais de 300 proteínas-alvo diferentes (Schoonheim

et al., 2007). Em contraste, é estimado que apenas 25% do total de proteínas que interagem com as proteínas 14-3-3 tenham sido identificadas até o momento (Bridges e Moorhead, 2005). Análises cristalográficas demonstram que as proteínas 14-3-3 se organizam como homo ou heterodímeros, sendo os dímeros a estrutura mais frequente apresentando estrutura rígida (Rittinger *et al.*, 1999). Quando em interação com outras proteínas as 14-3-3 podem promover mudança conformacional e/ou representar uma barreira física em suas proteínas alvos resultando na alteração da atividade, estabilidade ou localização destas proteínas (Obsil e Obsilova, 2011; Siles-Lucas *et al.*, 2003). As regiões responsáveis pela dimerização estão relacionadas às porções carboxi e aminoterminal que apresentam baixo grau de conservação (Bridges e Moorhead, 2005). Os resíduos responsáveis pela ligação a outras proteínas são conservados entre as isoformas, porém é possível que mutações nos resíduos situados dentro do sítio de ligação possam contribuir para diferentes graus de afinidades aos seus ligantes (Fu *et al.*, 2000).

Dentro dos aspectos imunológicos das proteínas 14-3-3 investigados em patógenos infecciosos como leveduras, outros estudos relatam esse papel frente a parasitas. Dois estudos destacam a localização da proteína 14-3-3 em vesículas contendo produtos de excreção de *Echinococcus granulosus* salientando que esta proteína pode ter papel importante no início da infecção através da entrega de moléculas sintetizadas pelo patógeno para dentro do hospedeiro através de grânulos secretores (Siles-Lucas *et al.*, 2000). Similarmente um estudo acerca da imunização com a proteína recombinante 14-3-3 de *E. multiloculares* conferiu certa proteção contra infecção por ovos do parasita (Siles-Lucas *et al.*, 2003). Outra pesquisa também assinala a presença

da proteína 14-3-3 recombinante de *Clonorchis sinensis* em vesículas secretórias e como estímulo imune foi capaz de induzir altos níveis de IgG1 e IgG2a via resposta imune Th1/Th2 balanceada em modelo de infecção por *C. sinensis* (Wang *et al.*, 2012) da mesma forma a proteína 14-3-3 revelou-se um possível candidato a vacina contra toxoplasmose (Meng *et al.*, 2012). Estes estudos relatam que as proteínas 14-3-3, além de desempenhar sua função central e conservada como proteína de transdução de sinal em organismos eucarióticos, podem desempenhar funções mais especializadas no contexto da relação patógeno-hospedeiro, durante a infecção. Diante do exposto, a investigação da proteína 14-3-3 como potencial candidata a vacina de DNA contra criptococose mostra-se uma metodologia válida na busca por novas estratégias profiláticas e/ou terapêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi o desenvolvimento de uma vacina de DNA contendo a porção codificante do gene 14-3-3 de *Cryptococcus gattii*.

2.2 Objetivos específicos:

- i. Clonar a sequência codificadora da proteína 14-3-3 de *Cryptococcus gattii* em vetor de expressão em células eucarióticas;
- ii. Realizar experimentação piloto de imunização em modelo animal;
- iii. Determinar a localização celular da proteína 14-3-3 em *C. gattii*;
- iv. Clonar a sequência codificadora da proteína 14-3-3 e expressar a proteína recombinante;
- v. Analisar a resposta imune humoral.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos e condições de cultivo

A linhagem hipervirulenta R265 de *C. gattii* proveniente da epidemia de Vancouver foi gentilmente cedida pelo Dr. Wieland Meyer (Universidade de Sidney - Austrália). A linhagem foi mantida em meio YPD (2% de glicose, 2% de peptona, 1% de extrato de levedura e 1,5% de ágar). Para os experimentos, as células foram cultivadas em meio YPD líquido (10 ml) e incubadas a 30°C com agitação (200 rpm) por 20 h.

3.2 Análises *in silico* que codifica a proteína a 14-3-3 de *C. gattii*

A sequência putativa do gene que codifica para 14-3-3 de *C. gattii* (CNBG_5765.2) foi identificada por análise do banco de dados público do genoma de *C. gattii* do Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/>). As predições de massa molecular e ponto isoelétrico foram realizadas utilizando ferramentas disponíveis no site ExPASy (<http://www.expasy.org/>). A presença de domínios conservados na proteína 14-3-3 de *C. gattii* foi analisada através das ferramentas disponíveis no site <http://pfam.sanger.ac.uk/> e <http://prosite.expasy.org/>. A antigenicidade dos peptídeos foi determinada seguindo o índice de James Wolf através do programa *Protean* (DNASTAR – Lasergene, Madson, USA).

3.3 Desenvolvimento da vacina de DNA

3.3.1 Isolamento de RNA e síntese de cDNA.

O RNA total foi extraído de células de *C. gattii*, linhagem R265, utilizando o kit RNAeasy Mini (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante.

Para a síntese de cDNA, utilizou-se 0,65 µg de RNA, e a reação foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen, California, USA) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Uma reação de PCR também foi realizada como controle, utilizando *primers* de actina, para comprovar a síntese da fita complementar.

3.3.2 Amplificação da sequência gênica de 14-3-3 de *C. gattii*

Para amplificação do gene que codifica 14-3-3 foram projetados *primers* específicos a partir da sequência disponível no banco de dados do *Broad Institute* (Tabela 1). Os iniciadores também continham sequências para reconhecimento por enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI* flanqueando a ORF do gene 14-3-3 de *C. gattii*. As enzimas foram selecionadas por fazerem parte do sítio de clonagem do vetor pUC18 e por não clivarem o inserto em sua sequência nativa. A reação de PCR foi realizada utilizando a enzima *Taq DNA polymerase Platinum* (Life Technologies, Gent, Belgium). As reações foram suplementadas com 5 pmol de cada iniciador para o gene 14-3-3 *C. gattii*, e 1 µL de cDNA, em um volume final de 25 µL. As reações foram realizadas com um estágio de desnaturação de inicial de 5 min a 95°C seguido de 30 ciclos

compostos de 3 etapas, desnaturação por 30 s a 94°C, anelamento por 30 s a 60°C, extensão por 1 min a 72°C. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% confirmando a presença de um produto único de PCR. O produto de PCR foi purificado utilizando-se o Kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band* (GE Healthcare, Freiburg, Germany) conforme descrições do fabricante. A quantificação foi realizada utilizando o sistema *Qubit™* (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Tabela 01 – Oligonucleotídeos utilizados no estudo (T.A: temperatura de anelamento).

Oligos	Sequências	T.A (C°)
14-3-3_pcDNA3.1(+) F	GGATCCATGTCTA	57
	ACCGAGAAGACTC	
14-3-3_pcDNA3.1(+) R	CTCGAGCTAAGCC	57
	GCGGGGGCAACCT	

3.3.3 Clonagem em vetor pUC18

As enzimas DNA polimerase I (Klenow) e polinucleotídeo quinase (Promega, Madison, USA) foram utilizadas no preenchimento e fosforilação de produtos de PCR. Foi utilizado como vetor de clonagem o plasmídeo pUC18 clivado com a enzima *SmaI* (Promega, Madison, USA) para linearização, e posteriormente defosforilado com Fosfatase alcalina de Camarão - SAP (*New England BioLabs*, Ipswich, USA) seguindo orientações do fabricante. O fragmento correspondente a região codificadora de 14-3-3 foi clonado no vetor

pUC18 (Invitrogen, Vilnius, Lithuania), utilizando células eletrocompetentes de *E. coli* linhagem *XL-1 blue*. Amostras de DNA plasmidial foram obtidas por minipreparação utilizando-se o método de lise alcalina. Os clones obtidos foram submetidos à clivagem por enzimas de restrição específicas para confirmação da clonagem e posterior subclonagem em vetor de expressão.

3.3.4 Subclonagem em vetor de expressão eucariótico

Posteriormente, foi realizada a etapa de subclonagem do inserto em vetor de expressão pcDNA3.1(+)TM (Invitrogen, Carlsbad, USA). Para isso, foi realizada a clivagem do plasmídeo recombinante pUC14-3-3 com as enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI*. O fragmento correspondente a região codificadora de 14-3-3 foi purificado por eletroforese preparativa utilizando o Kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band* e o inserto isolado foi subclonado no vetor de expressão eucariótico pcDNA3.1(+)TM. O vetor foi previamente linearizado com as mesmas enzimas de restrição a fim de criar extremidades coesivas para a clonagem em fase do inserto. Para a subclonagem, células de *E. coli* da linhagem *XL1-Blue* eletrocompetentes foram transformadas com o produto de ligação contendo 50ng do plasmídeo linearizado e 22ng do fragmento 14-3-3 purificado. O plasmídeo recombinante pcDNA3.1(+)-14-3-3 foi isolado utilizando o kit de maxipreparação livre de endotoxina (Sigma, Saint Louis, USA) e o produto clonado foi analisado por sequenciamento de DNA (MegaBACE 1000, GE, Freiburg, Germany).

3.4 Verificação da funcionalidade do plasmídeo pcDNA3.1(+)¹⁴⁻³⁻³ em cultura de células de mamíferos

3.4.1 Linhagem celular e condições de cultura

A linhagem celular de adenocarcinoma alveolar humano - A549 (ATCC® CCL185™, Manassas, USA) foi mantida em meio mínimo DMEM (Gibco, New York, USA), suplementado com 20% ou 10% soro fetal bovino e mantida em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A cada 2 dias as células eram subcultivadas por tripsinização.

Os estoques celulares foram mantidos em nitrogênio líquido, em uma solução contendo 80% de meio DMEM, 10% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido.

3.4.2 Transfecção transitória

Foi realizada transfecção *in vitro* do plasmídeo recombinante pcDNA3.1(+)¹⁴⁻³⁻³ ou vetor vazio pcDNA3.1(+) como controle utilizando lipofectamina (*Lipofectamine LTX and Plus reagents* – Invitrogen, Carlsbad, USA) conforme descrições fornecidas pelo fabricante. Após 24 h o RNA e extrato proteico total das células foram extraídos utilizando o reagente TRizol (Invitrogen, Carlsbad, USA).

3.4.3 Extração de RNA

Foi realizado procedimento de extração de RNA das células de epitélio pulmonar transfectadas com plasmídeo recombinante pcDNA3.1(+)+14-3-3, células transfectadas com o vetor vazio e células não transfectadas utilizando o reagente TRIzol, segundo instruções do fabricante. A quantificação de RNA foi determinada utilizando o sistema QuBit™.

3.4.4 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA a partir do RNA extraído das células, foi utilizada a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, USA) de acordo com instruções do fabricante.

3.4.5 RT-PCR para a verificação da expressão

Utilizando os cDNAs obtidos a partir de células transfectadas com pcDNA3.1(+)+14-3-3, células transfectadas com o vetor vazio e células não transfectadas, foram realizados experimentos de RT-PCR utilizando os *primers* específicos para a região codificadora de 14-3-3 para avaliação da expressão do gene 14-3-3 de *C. gattii*.

Como controle positivo da reação foi utilizado DNA genômico de *C. gattii* linhagem R265. A PCR foi realizada em reações de 25 µL. Cada reação

continha 1 µL de cDNA, 14,7 µL de água milliQ, 1 µL de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10mM, 1 µL de Cloreto de magnésio (2 mM de concentração final), 2,5 µL de tampão Taq (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM de KCl), 2 µL de oligonucleotídeos direto e reverso (40 nM de concentração final), 0,3 µL (1U) da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, USA). As condições de PCR de cada par de oligonucleotídeos estão representadas na (Tabela 1). Em todas as PCR foram realizados 35 ciclos. Outra PCR foi realizada utilizando os *primers* para β-actina como controle. Foi utilizado como controle positivo DNA de células pulmonares.

3.4.6 Extração de proteínas totais

Após 24h de transfecção seguiu-se à extração protéica das células transfectadas com o plasmídeo recombinante pcDNA3.1(+)+14-3-3, células transfectadas com vetor vazio e células não transfectadas, utilizando o reagente TRIzol, segundo protocolo descrito pelo fabricante. As amostras foram estocadas a -20°C para uso posterior em experimentos de *Western Blot*.

3.4.7 Análise das proteínas em SDS-PAGE

As proteínas extraídas das células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1(+)+14-3-3, células transfectadas com vetor vazio e células não transfectadas, foram resolvidas em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes (*SDS-PAGE*), conforme protocolo já estabelecido (Sambrook e Gething, 1989). Após a eletroforese, os géis incubados em solução contendo

Coomassie Blue (1% de *coomasie brilliant blue* R-250, 10% de ácido acético, 50% de metanol) e permaneceram em agitação leve por 16h. Os géis foram mantidos em solução de ácido acético 10% (v/v).

3.4.8 Precipitação de Proteínas

Devido às baixas concentrações de proteínas totais obtidas, foi utilizado um protocolo de precipitação de proteínas em presença de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Nesse protocolo adicionou-se TCA 20% 1:1 em relação às alíquotas das amostras de extrato protéico. As proteínas foram incubadas a 4°C por 10 minutos. Após isso, centrifugou-se as amostras a 10.000 x g, 4°C por 5 min. Os *pellets* foram lavados por 2 vezes com acetona gelada, e ressuspensos em tampão de amostra 5x. As amostras foram então sonicadas por 10 s (em gelo) e em seguida fervidas por 10min para uma completa desnaturação das proteínas. Após isso, as amostras foram centrifugadas por 10 s e aplicou-se o sobrenadante no gel de poliacrilamida a 10%.

3.4.9 Western Blot

Para detecção da proteína 14-3-3 proveniente de células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1(+)+14-3-3 e em extrato bruto proteico de *C. gattii*, os respectivos extratos proteicos foram resolvidos em gel *SDS-PAGE* e em seguida foram submetidos ao ensaio de *Western blot* (Sambrook e Gething, 1989). Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF, as quais foram incubadas com o anticorpo anti-ε214-3-3 de

Echinococcus granulosus e a seguir com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). O anticorpo anti-ε214-3-3 foi gentilmente cedido pelo Professor Dr. Henrique Ferreira do Centro de Biotecnologia - UFRGS, do Centro de Biotecnologia da UFRGS. A transferência foi realizada no sistema *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad, Carlsbad, USA) a 300mA durante 3h. Após a transferência a membrana de PVDF foi lavada com PBS. A revelação foi realizada com o sistema ECL por quimioluminescência (ECL, GE Healthcare, Piscataway, USA).

Soluções:

Tampão de Transferência (pH 7,4): 3,0 g de Tris (25 mM), 14,4 g de glicina (192 mM), 200 mL de metanol (20%) e água destilada *q.s.p.* 1 L.

PBS 0,15M: 137mM de NaCl (8g), 2,7mM de KCl (0,2g), 10mM de Na₂HPO₄ (1,44g), 1,8mM de KH₂PO₄ (0,24g), água destilada *q.s.p.* 1L; pH 7,4. A solução foi esterelizada por autoclavação.

PBS 0,15M e 0,1% de Tween-20: 500μL de Tween-20 em 500mL de PBS 0,15M.

Tampão de Bloqueio: 5% Leite desnatado em pó, 0,1% Tween 20 e PBS *q.s.p.* 1L.

Corante Ponceau: 2g de Ponceau em 30g de ácido tricloroacético e água destilada *q.s.p.* 100mL.

3.5 Imunofluorescência

Foi realizada imunofluorescência para determinar a localização da proteína 14-3-3 em células de *C. gattii* linhagem R265. Para isso as células foram cultivadas durante 16 h em meio YPD. Brevemente, o cultivo foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 min e as células de *C. gattii* foram fixadas com paraformaldeído a 4% a 37°C por 1 h. As células foram coradas com Calcofluor white 5 µg/mL a 37°C durante 30 min, para coloração da parede celular da levedura e posteriormente foram incubadas com anticorpo primário anti-ε214-3-3 de *E. granulosus* na diluição de 1:10 a 37°C durante 1 h seguido de incubação com anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado a FITC na concentração de 20 µg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

3.6 Inoculação dos camundongos

Após as confirmações de expressão da vacina de DNA contendo a região codificadora de 14-3-3, seguiu-se com experimento de inoculação em modelo animal, para posterior determinação da resposta imune humoral. Três grupos de três camundongos BALB/c fêmeas com 6 semanas de vida foram inoculados conforme descrição da (Tabela 2). Durante os experimentos, os animais tiveram livre acesso à água e alimento e permaneceram em gaiolas coletivas. Os inóculos de 100µg de vetor recombinante foram aplicados via intramuscular na pata direita em três doses com intervalos de 15 dias. Dois grupos controles foram mantidos com administração do vetor vazio e PBS. Os

animais foram anestesiados com Xilasina (8 mg/mL) e Cetamina (60 mg/mL) via intraperitoneal.

Ao fim de cada quinzena foi realizado coleta de sangue dos animais por punção do plexo retro-orbital (Fernández *et al.*, 2010), conforme descrito na Figura 04. O sangue coletado foi incubado a 30°C por 30min e o soro foi recuperado e armazenado a -20°C.

Tabela 02- Esquema de inoculações dos camundongos

Grupo	Nº animais	Massa média (g)
PBS	3	21,15
pcDNA3.1(+) 3.1	3	20,90
pcDNA3.1(+)14-3-3	3	21,33

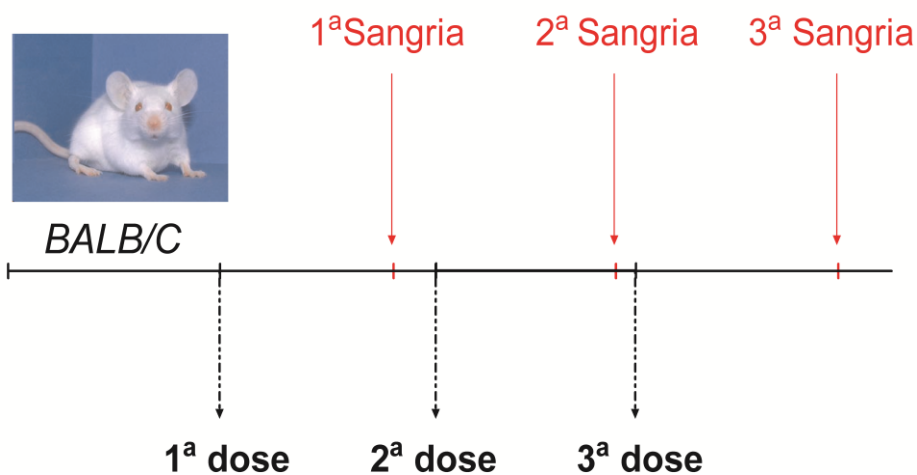


Figura 04 - Esquema sequencial de imunizações e coletas sanguíneas por punção retro orbital.

3.7 Clonagem e construção do vetor de expressão pET23-d+14-3-3

A sequência codificadora do gene 14-3-3 de *C. gattii* utilizada neste estudo foi obtida a partir do banco de dados público (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans_b/MultiHome.html) o qual está identificado pelo número de acesso CNBG_5765.2.

Para clonagem e expressão da proteína fusionada a uma cauda de histidinas, a sequência codificadora de 14-3-3 foi amplificada por PCR com os iniciadores 14-3-3-expF (5'-AAAAAACCATGGCTAACCGAGAAGACTCTGTCTACCTTG-3') e 14-3-3expR (5'-AAAAAAAAGCTTAGCCGCGGGGGCAACCTCCTCCTGCTTTGTT-3'). Esses iniciadores continham sítios específicos para clivagem com as enzimas de restrição *NcoI* e *HindIII*. O vetor pET23-d foi linearizado por clivagem com endonucleases de restrição *NcoI* e *HindIII*.

Para a clonagem em pET23-d foi utilizada a linhagem TG2 de *E. coli* quimiocompetente. As células bacterianas foram transformadas com o produto de ligação contendo 50ng de vetor linearizado e 32ng do produto de PCR. A identificação dos plasmídeos recombinantes foi realizada por PCR de colônia utilizando os iniciadores específicos do gene 14-3-3 de *C. gattii*. A extração do DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina (Sambrook e Gething, 1989). A identificação dos plasmídeos recombinantes foi realizada por clivagem do DNA plasmidial extraído com endonucleases de restrição específicas *NcoI* e *HindIII*. O clone utilizado para posterior expressão foi sequenciado utilizando o kit *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare, Freiburg,

Germany) em sequenciador automático *MEGABACE* 1000, conforme manual do fabricante.

3.7.1 Expressão e Purificação da proteína recombinante 14-3-3 *C. gattii*

Os plasmídeos recombinantes obtidos da clonagem em pET23-d foram utilizados para transformação em células de *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* por eletroporação. Os clones foram confirmados por PCR de colônia por amplificação do gene 14-3-3 de *C. gattii*. A expressão da proteína recombinante foi realizada em 200mL meio LB e induzida com IPTG na concentração final de 1mM no meio de cultivo, sendo o instante de indução na fase exponencial de crescimento microbiano em tempos de 1, 2, 3 e 4h sob agitação a 37°C. A expressão das proteínas recombinantes foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

Após a indução, as culturas foram centrifugadas por 10min e solubilizadas em 10mL de tampão de lise pH 8.0 (300 mM de NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ e 10 mM de Imidazol). Foi adicionada lisozima 1mg/mL para eficiente lise celular, em incubação por 30min em banho de gelo. A suspensão foi submetida a sonicação para lise mecânica das células, em 12 ciclos de 10 s a 300 W, intercalando 10 s de incubação em gelo. Após a lise, a suspensão foi centrifugada a 10.000xg por 30 min a 4°C. Uma alíquota de 30µL do sobrenadante (fração solúvel) foi analisada por eletroforese *SDS-PAGE* 12%. O sedimento resultante da centrifugação foi solubilizado com 5 mL de tampão

de lise centrifugado novamente, e uma alíquota de 30 µL deste sobrenadante (fração insolúvel) foi igualmente analisada.

3.7.2 Purificação da proteína recombinante fusionada a cauda de histidinas

A fração solúvel foi incubada por 1 h a 2.000 rpm a 4°C com a resina de níquel NI-NTA (Qiagen, Hilden, Germany), a qual foi pré-equilibrada com tampão de lise. Após a incubação, foi realizada lavagem da resina com tampão de lavagem pH 8.0 (300 mM de NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ e 20 mM de imidazol) contendo baixa concentração de imidazol com o objetivo de remover proteínas não aderidas à resina e também ligações inespecíficas. As frações proteicas foram eluídas com tampões contendo diferentes concentrações de imidazol (50 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM) em tampão de eluição pH 8.0 (300mM de NaCl, 50mM NaH₂PO₄).

3.7.3 Análise eletroforética de proteínas em SDS-PAGE

As frações obtidas após purificação foram analisadas em gel SDS-PAGE. Após eletroforese, o gel foi corado com *Coomassie Blue* (1% de *coomasie brilliant blue R-250*, 10% de ácido acético, 50% de metanol) por 16 h em temperatura ambiente.

3.8 Detecção de IgG total por ELISA Indireto

Para o ensaio de Elisa indireto, 10 μ L do soro de cada um dos animais que compunham os 3 diferentes grupos originaram o *pool* do grupo correspondente. Este *pool* foi utilizado para todos os ensaios de ELISA. Inicialmente, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 100ng/ μ L ou 500ng/ μ L do antígeno Cg14-3-3 purificado em cada poço. A etapa de sensibilização foi realizada durante a noite a 4°C. Após essa etapa, as placas foram lavadas com PBS-T 0,05% por três vezes, e bloqueadas com PBS BSA 1% durante 1 h a 37°C. Novas lavagens foram realizadas e os soros dos animais correspondentes a cada grupo foram diluídos numa escala de 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400. Os soros foram adicionados e incubados à 37°C por mais uma hora. Após novas lavagens, adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (20 mg/mL) (Sigma-Aldrich Hilden, Germany) na diluição de 1:2000, seguindo-se uma nova etapa de incubação, nas condições previamente citadas. Após três lavagens com PBS-T 0,05%, foi adicionado 100 μ L da solução de revelação TMB *Single solution* (Invitrogen, Paisley, UK). Após um período de incubação de 15min à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico 2M. As densidades ópticas foram obtidas a 595 nm em espectrofotômetro.

3.9 Considerações Éticas

Este projeto obedece às normativas propostas pelos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences – CIOMS*).

O presente trabalho foi submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, obtendo parecer aprovado em 11/07/2011 sob o registro 19119.

3.10 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As comparações dos grupos experimentais foram realizadas por Análise de Variância (*ANOVA*) de uma via ou por uma *ANOVA* de medidas repetidas, conforme a necessidade. O software utilizado para a realização das análises foi o *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)* versão 20.0 e a significância estatística foi de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

11.1 Análises *in silico* da proteína 14-3-3 em *C. gattii*

A busca no banco de dados do genoma de *Cryptococcus gattii* no *Broad Institute* resultou na identificação de um único gene codificador de proteína da família 14-3-3 na linhagem R265 (Altschul *et al.*, 1990) (Tabela 03). A sequência deduzida de aminoácidos correspondente de 256 aminoácidos apresentou massa molecular e ponto isoelétrico de 30 kDa e 5, respectivamente (Tabela 3). As análises revelaram a presença de duas regiões altamente conservadas: a primeira localizada na região N-terminal, representada pelos aminoácidos – RNLLSVAYKNV, e a segunda localizada na região C-terminal da proteína apresentando sequência peptídica – YKDSTLIMQLLRDNLTLWTS (Figura 05).

O índice de antigenicidade para a proteína 14-3-3 de *C. gattii* foi calculado utilizando o índice *Jameson-Wolf* pelo Programa *Protean* 4.0 (DNASTAR – Lasergene) (Figura 06) indicando as regiões da proteína com maiores e menores índices de antigenicidade. A proteína 14-3-3 foi considerada imunogênica através desta predição.

Tabela 03 – Características do gene codificante de 14-3-3 de *C. gattii*

Família Gênica	Número de acesso	Localização	Tamanho (nucleotídeos)	Massa predita (Da)	pI predito
Proteínas 14-3-3	CNBG_5765.2	Supercontig 19: 41782-43015	1234	28994.58	4.78



Figura 05 - Representação dos domínios conservados da proteína 14-3-3 de *C. gattii*. Assinatura de 2 regiões altamente conservadas: Sequência peptídica de 11 aa localizada na região N-terminal – RNLLSVAYKNV, sequência peptídica de 20 aminoácidos localizada na região C-terminal da proteína – YKDSTLIMQLLRDNLTLWTS (azul).

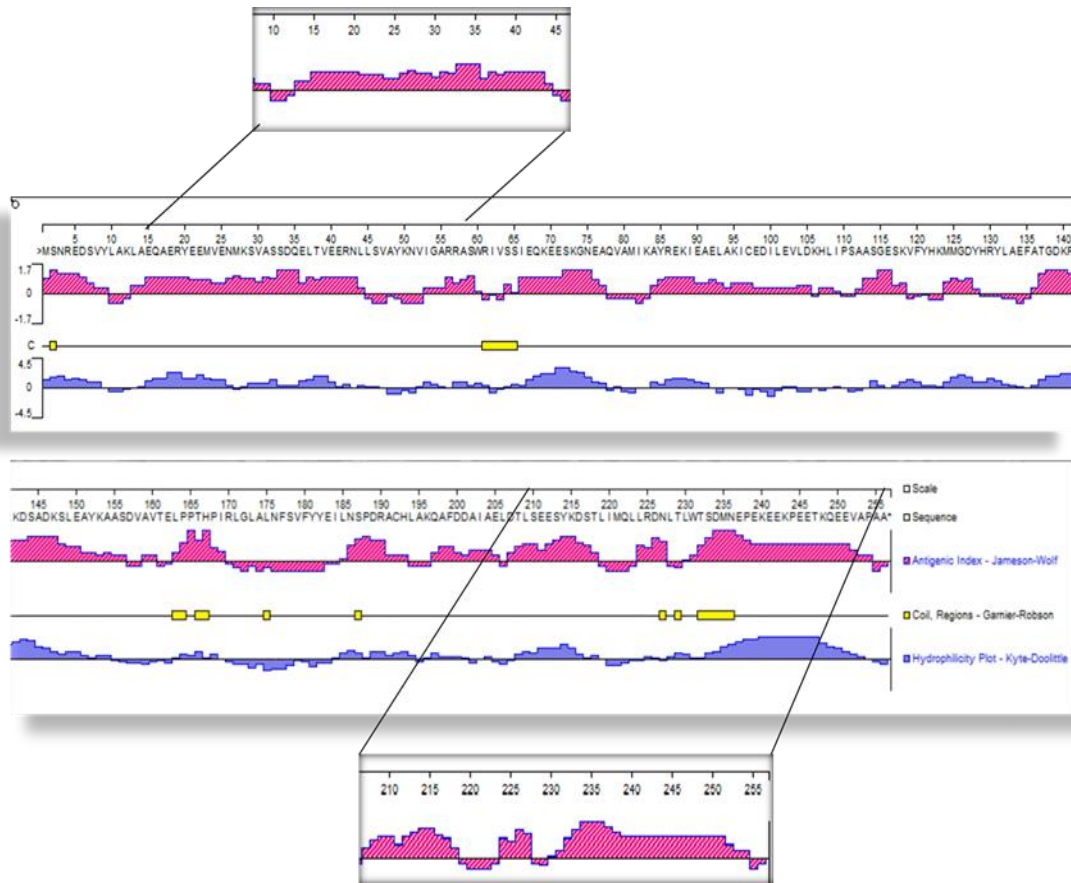


Figura 06- Parâmetros de antigenicidade da proteína 14-3-3 de *C. gattii* gerados pelo programa *Protean 4.0*. Em destaque as porções peptídicas (rosa) apresentando alto grau de antigenicidade.

11.2 Amplificação do gene 14-3-3 de *C. gattii*

A região codificante do gene 14-3-3 de *C. gattii* foi amplificado por PCR gerando um fragmento de aproximadamente 771pb a partir do cDNA previamente isolado, utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene 14-3-3. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1% (Figura 07).

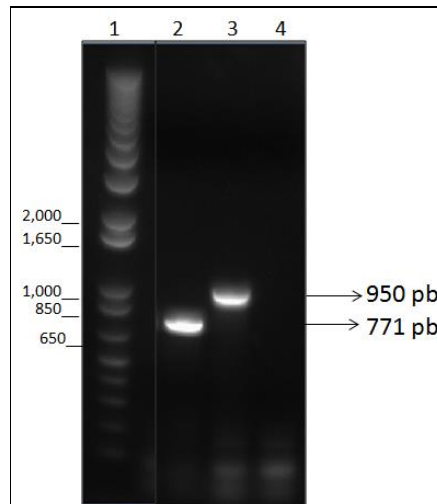


Figura 07 – Análise do produto de PCR para amplificação das sequências codificadoras da proteína 14-3-3 de *C. gattii* utilizando os iniciadores 14-3-3_pcDNA3.1(+)*F* e 14-3-3_pcDNA3.1(+)*R*. (1) Marcador de tamanho molecular 1kb *DNA ladder* (Invitrogen); (2) Produto de amplificação referente a região codificadora com tamanho esperado de 771pb; (3) Controle positivo da reação amplificado a partir de DNA genômico de *C. gattii*; (4) Controle negativo da reação (sem adição de DNA).

O produto de amplificação correspondente ao fragmento de DNA de 771pb foi purificado do gel utilizando-se o *Kit Illustra GFX PCR DNA*, o DNA obtido foi quantificado utilizando o sistema Qubit™ e armazenado para posterior clonagem.

11.3 Clonagem da região codificadora de 14-3-3 em vetor pUC18 e pcDNA 3.1 (+)

Com o intuito de confirmar a inserção do gene 14-3-3 em vetor de clonagem e em vetor de expressão eucariótico foram realizadas clivagens com

endonucleases de restrição. A clivagem dos plasmídeos recombinantes com as enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI* possibilitou a seleção de um clone recombinante em vetor pUC18 (Figura 08A) e em pcDNA3.1 (+) (Figura 08B) .

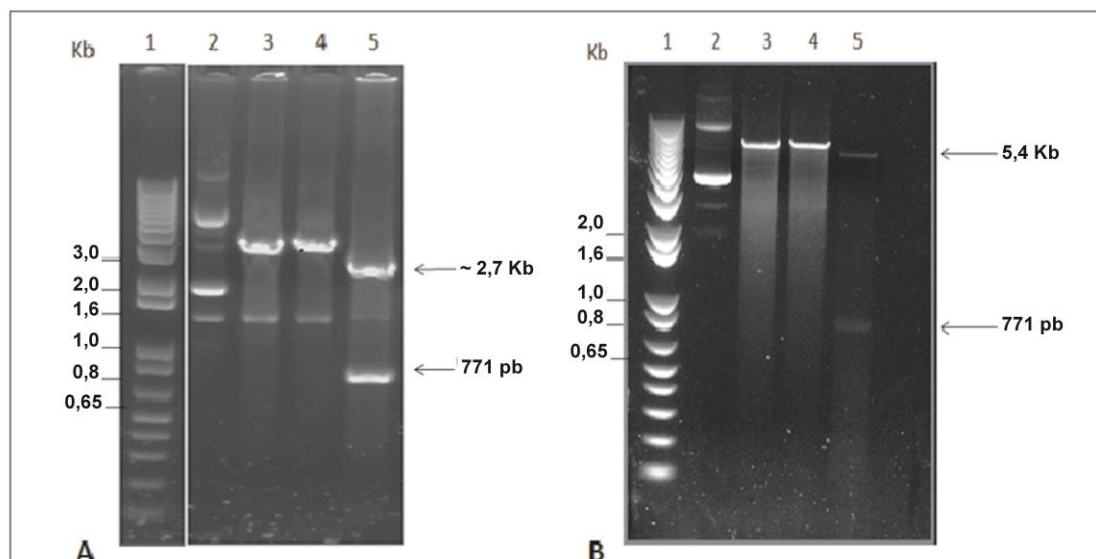


Figura 08 – Análise dos produtos das clivagens para confirmação do clone recombinante. (A) Clone (pUC18 + 14-3-3); (B) (pcDNA3.1(+) + 14-3-3) (1) Marcador de tamanho molecular 1kb *DNA ladder* (GE); (2) DNA plasmidial íntegro; (3) DNA plasmidial clivado com *XhoI*; (4) DNA plasmidial clivado com *BamHI*; (5) DNA plasmidial clivado com ambas endonucleases.

Para determinar a funcionalidade do vetor recombinante, foram realizados experimentos de transfecção em linhagem epitelial de Adenocarcinoma alveolar (A549). A funcionalidade do vetor recombinante pcDNA3.1(+) + 14-3-3 foi confirmada através da RT-PCR (Figura 09A). A

amplificação do transcrito correspondente a β -actina foi usado como controle (Figura 09B).

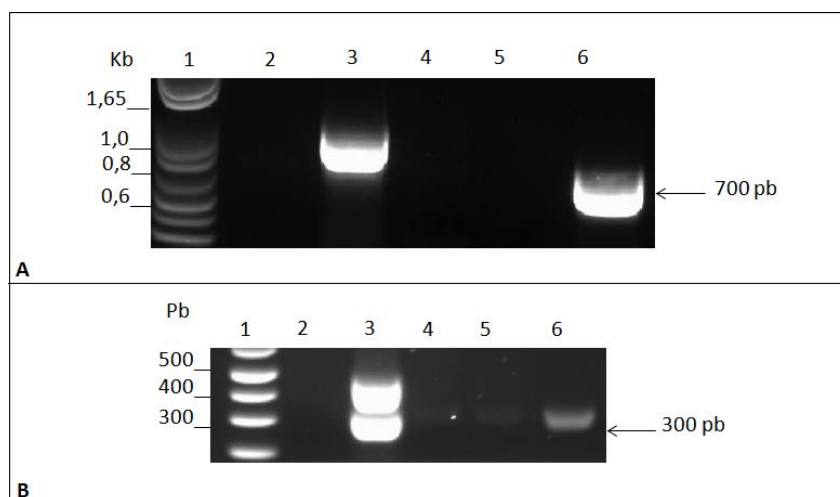


Figura 09 – Expressão transiente da vacina de DNA contendo o gene 14-3-3 de *C. gattii*. A (1) Marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder (GE); (2) Controle negativo; (3) Controle positivo (DNA genômico) (4) cDNA de A549 (5) cDNA de A549 transfectada com vetor vazio; (6) cDNA de A549 transfectada com vetor pcDNA3.1(+) + 14-3-3; (B) RT-PCR utilizando primers específicos para amplificação do transcrito correspondente a β -actina foi utilizado como controle.

11.4 Avaliação da funcionalidade do vetor recombinante pcDNA3.1(+)+14-3-3

Através de experimento de *imunoblot*, foi analisada a especificidade do anticorpo anti-14-3-3 de *E. granulosus* no reconhecimento de 14-3-3 endógena de *C. gattii*, a partir de extrato bruto total de proteínas (Figura 10A). Essa avaliação foi necessária para utilizarmos este anticorpo na detecção da proteína 14-3-3 de *C. gattii* em células A549 transfectadas com a vacina de

DNA (Figura 10B). Foi realizada análise da expressão da proteína 14-3-3 em células A549 transfectadas com o plasmídeo recombinante após 24h. Verificou-se um aumento na expressão da proteína 14-3-3 em células transfectadas com o vetor recombinante contendo a região codificadora de 14-3-3 (Figura 10B).

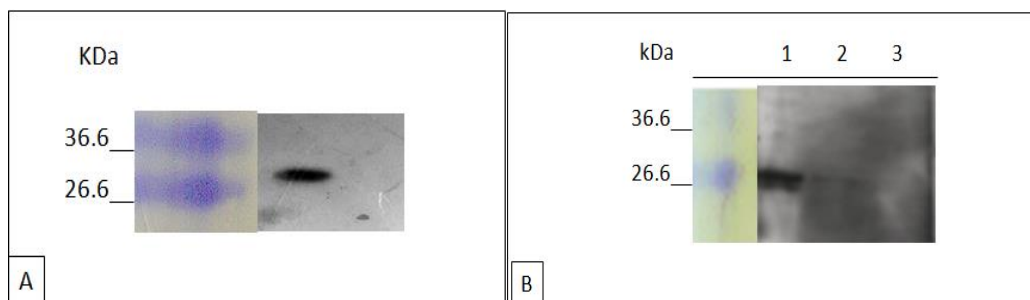


Figura 10 – Análise da especificidade do anticorpo anti- ϵ 214-3-3 de *E. granulosus* na detecção da proteína 14-3-3 de *C. gattii*. (A) Detecção da proteína 14-3-3 a partir de extrato bruto de *C. gattii*, apresentando massa molecular em torno de 30 kDa. (B) Detecção da proteína 14-3-3 a partir de células A549 transfectadas com o vetor recombinante pcDNA3.1(+) + 14-3-3 por *Western blot*; 1- A549 transfectada com pcDNA3.1(+) + 14-3-3; 2- A549 transfectada com pcDNA3.1(+); 3- A549 sem transfecção.

11.5 Localização da proteína 14-3-3 em *C. gattii*

As proteínas 14-3-3 foram marcadas com o anticorpo primário anti- ϵ 214-3-3 e anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC em células de *C. gattii* por um período de 2h. Os resultados obtidos da imunofluorescência revelaram a presença pontual da proteína 14-3-3 associada à parede celular das células fúngicas (Figura 11).

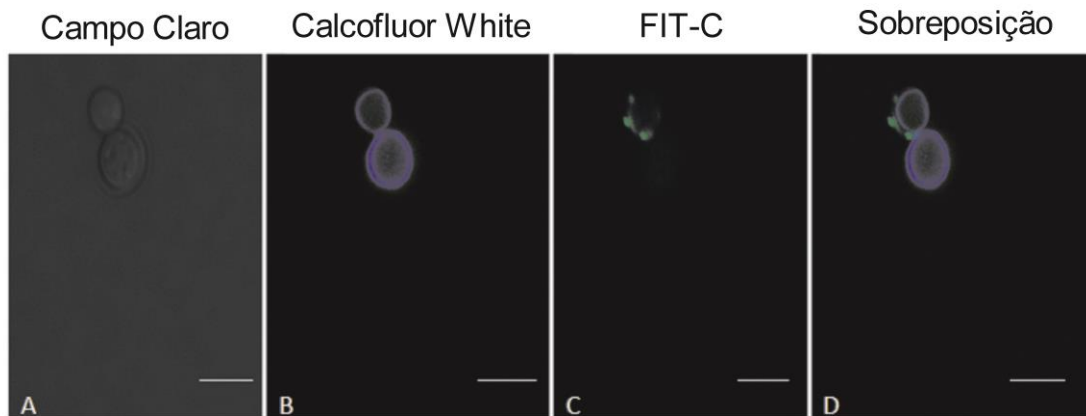


Figura 11 – Análise da localização das proteínas 14-3-3 em células *C. gattii*. (A) Contraste de fase; (B) Parede celular marcada com calcofluor white; (C) Detecção da proteína Cg14-3-3 com anticorpo anti-ε214-3-3; (D) Sobreposição das marcações.

11.6 Amplificação e Clonagem da região codificadora do gene 14-3-3 no vetor pET-23d

A sequência codificadora da proteína 14-3-3 foi amplificada por PCR e gerou um fragmento de 771 pb que foi utilizado para clonagem por recombinação *in vivo*. A confirmação do clone foi realizada através da clivagem do DNA plasmidial com as enzimas de restrição específicas (Figura 12).

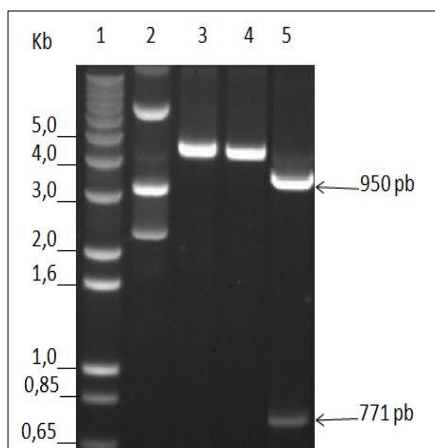


Figura 12 - Confirmação do clone contendo o plasmídeo pET23-d + 14-3-3.

Os plasmídeos foram extraídos por midipreparação e clivados pelas enzimas de restrição *HindIII*, *NcoI* e *HindIII* + *NcoI*. (1) Plasmídeo pET23-d íntegro; (2) plasmídeo linearizado com *HindIII*; (3) Plasmídeo linearizado com *NcoI*; (4) Liberação do fragmento 14-3-3 através da clivagem dupla.

11.7 Expressão heteróloga da proteína 14-3-3 em *E. coli*

A produção da proteína recombinante foi realizada inicialmente por meio de indução da expressão por IPTG a 37°C. Passado o período de indução de 4h os extratos proteicos foram analisados (Figura 13A). A proteína recombinante 14-3-3 foi observada principalmente na fração solúvel e apresentou massa molecular em torno de 30 kDa (Figura 13B).

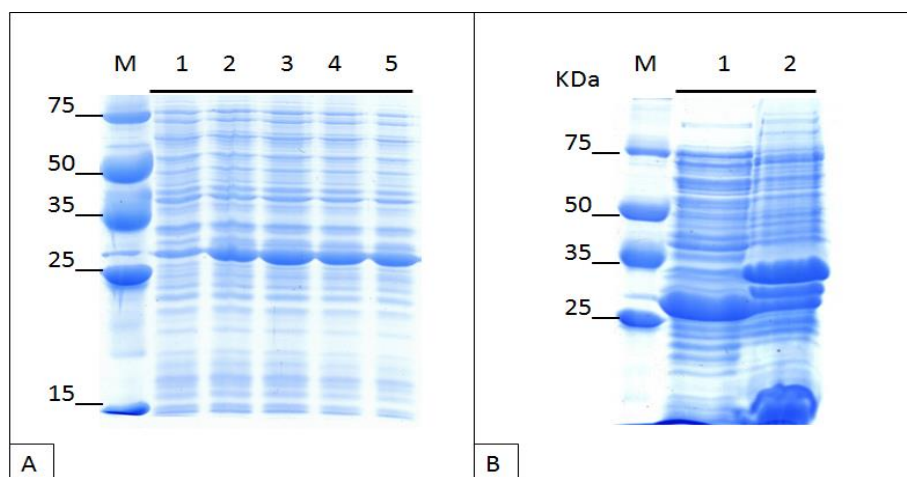


Figura 13 – Análise da expressão da proteína 14-3-3 (30 kDa). (A) 1 – Extrato proteico não induzido; 2-5 Extrato de cultura de células de *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* induzido durante 1, 2, 3 e 4h, respectivamente. (B) Extrato de cultura de células, após indução com IPTG, rompimento e centrifugação para separação das frações solúveis e insolúveis. 1-Frações solúveis; 2- Frações insolúveis. M- marcador de massa molecular (kDa).

11.8 Purificação da proteína 14-3-3 e análise preliminar da resposta imune humoral

Alíquotas das eluições, recolhidas das colunas de cromatografia com a proteína recombinante, foram resolvidas por *SDS-PAGE*, para análise da expressão da proteína 14-3-3 fusionada a cauda de histidina (Figura 14). O rendimento obtido foi de aproximadamente 2,5mg por 250mL de cultura. A proteína purificada foi utilizada em ensaios de ELISA.

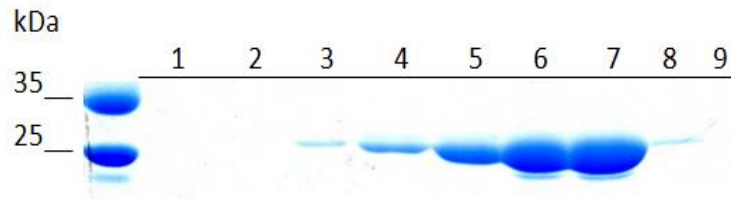


Figura 14: Purificação da proteína recombinante Cg14-3-3. 1- Alíquota fração não retida; 2-3 Eluição com 50mM Imidazol, 4-5 Eluição com 100mM de Imidazol; 6-7 Eluição com 250mM de Imidazol; 8-9 Eluição com 500mM de Imidazol.

Afim de verificar se a vacina de DNA que produzimos era imunogênica, realizamos experimento de imunização em modelo animal. Os animais foram imunizados com o vetor recombinante pcDNA 3.1 (+) + 14-3-3, ou PBS ou vetor vazio. O sangue foi estocado posterior a cada imunização e utilizado em ensaio de ELISA para detecção de anticorpos específicos.

Em relação aos resultados referentes às análises de detecção de imunoglobulinas (IgG) por experimentos de ELISA, as comparações nos níveis detectados em relação aos padrões de diluição dos soros dos animais imunizados (1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400) estão expressas como média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

A Análise de Variância (ANOVA) de uma via para as diluições 1:800 ($p=0,123$), 1:1600 ($p=0,180$), 1:3200 ($p=0,202$) e 1:6400 ($p=0,621$) não apresentou diferenças significativas nos níveis de imunoglobulinas após 15 dias de imunização com a vacina de DNA contendo a região codificadora de 14-3-3 de *C. gattii* (Figura 15).

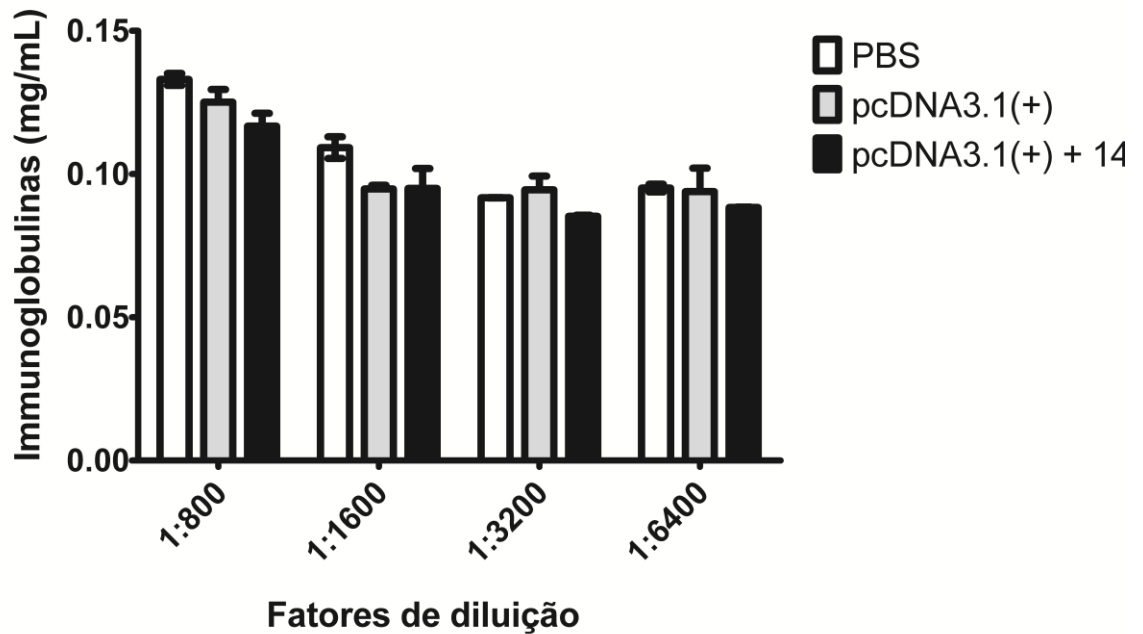


Figura 15. Níveis de imunoglobulinas (IgG) detectadas em amostras sorológicas de camundongos imunizados com o plasmídeo recombinante contendo o gene 14-3-3 de *C. gattii* após 15 dias de imunização. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. nas diferentes diluições. Fatores de diluições: 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400. PBS: Grupo controle. Grupo pcDNA3.1(+): Grupo inoculado com vetor vazio. Grupo pcDNA3.1(+) + 1433: Grupo inoculado com a vacina de DNA. $p > 0,05$.

Similarmente, a ANOVA de uma via para as diluições 1:800 ($p=0,852$), 1:1600 ($p=0,259$), 1:3200 ($p=0,722$) e 1:6400 ($p=0,505$) não apresentou diferenças estatísticas significativas nos níveis de imunoglobulinas após 45 dias de imunização com o plasmídeo recombinante contendo o gene 14-3-3 de *C. gattii* (Figura 16).

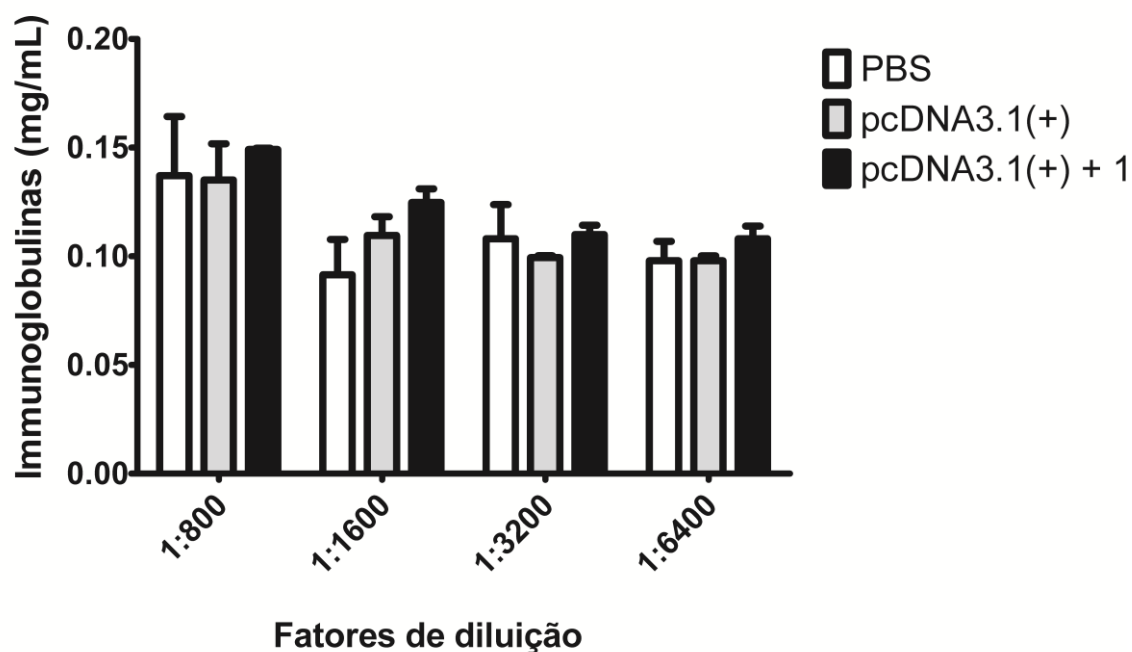


Figura 16. Níveis de imunoglobulinas (IgG) detectadas em amostras sorológicas de camundongos imunizados com o plasmídeo recombinante contendo o gene 14-3-3 de *C. gattii* após 45 dias de imunização. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. nas diferentes diluições. Fatores de diluições: 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400. PBS: Grupo controle. Grupo pcDNA3.1(+): Grupo inoculado com vetor vazio. Grupo pcDNA3.1(+)+1433: Grupo inoculado com a vacina de DNA. $p > 0,05$.

As comparações entre os diferentes dias de imunização (15 e 45 dias), em relação ao mesmo padrão de diluição e aos grupos experimentais foram realizadas utilizando o teste de ANOVA de duas vias. Os resultados para as diluições 1:800 ($p=0,931$), 1:1600 ($p=0,600$), 1:3200 ($p=0,909$) e 3:200 ($p=0,920$) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 17).

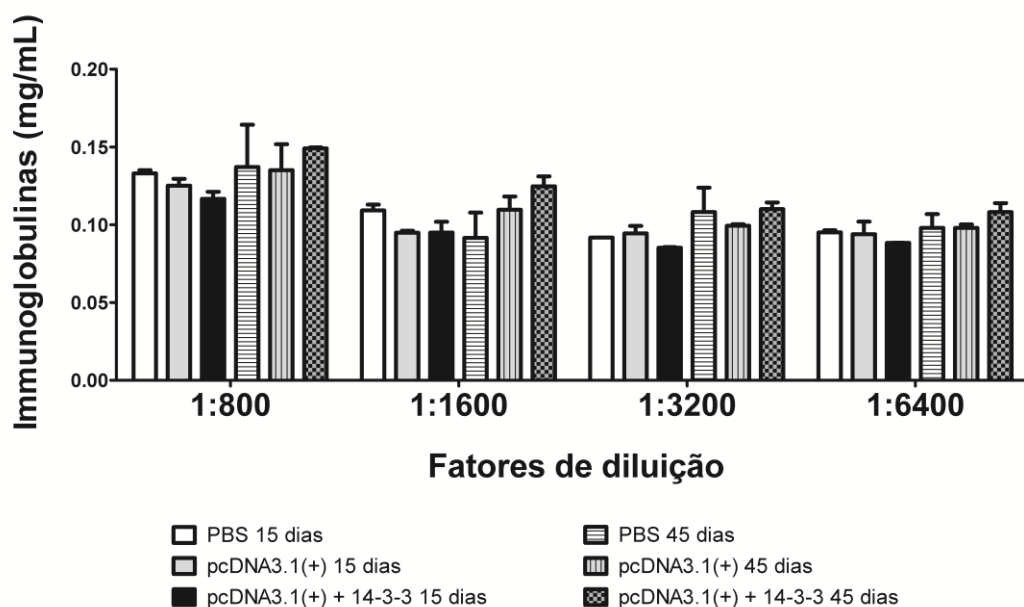


Figura 17. Níveis de imunoglobulinas detectadas em amostras sorológicas de camundongos imunizados com o plasmídeo recombinante contendo o gene 14-3-3 de *C. gattii* após 15 e 45 dias de imunização. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. nas diferentes diluições. Fatores de diluições: 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400. PBS: Grupo controle. pcDNA3.1(+): Grupo inoculado com vetor vazio. pcDNA3.1(+)+14-3-3: Grupo inoculado com vacina de DNA. $p > 0,05$.

A ANOVA de uma via indicou não haver diferenças estatísticas significativas nas medidas de imunoglobulinas sorológicas, em ambos os dias analisados e nos diferentes padrões de concentrações da proteína recombinante utilizadas 100ng/ μ L e 500ng/ μ L (dados não apresentados).

5. DISCUSSÃO

Apesar do tratamento anti-retroviral para o HIV ter diminuído o número de casos de criptococose, nos últimos anos essa infecção fúngica foi responsável por cerca de 1 milhão de mortes anuais ao redor do mundo (Park *et al.*, 2009). Embora a criptococose clássica desenvolva o quadro de micose oportunista afetando pacientes com sistema imune debilitado, em alguns casos, essas leveduras também afetam indivíduos imunocompetentes. Essa heterogeneidade de populações que *C. neoformans* e *C. gattii* acometem causa dificuldades para estabelecer um tratamento efetivo (Pappas, 2013). A imunidade mediada por célula tem papel determinante na defesa do hospedeiro contra criptococose, porém pouco se sabe sobre antígenos de *Cryptococcus* capazes de induzir tal resposta. A caracterização de antígenos proteicos é importante para selecionar candidatos para o desenvolvimento de vacinas no controle da criptococose (Jobbins *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2009). Neste trabalho, foi realizada a construção de uma vacina de DNA utilizando o gene 14-3-3 de *C. gattii* como estratégia profilática contra a criptococose. Dentre as principais metas deste trabalho estavam à construção da vacina e caracterização da sua funcionalidade, a imunização em modelo animal e a análise preliminar da resposta imune humoral.

As proteínas 14-3-3 além de suas funções clássicas na transdução de sinal no citoplasma de células eucarióticas podem atuar em mecanismos de interação entre patógeno e hospedeiro (da Silva *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2008). Várias estratégias desenvolvidas pelo patógeno como a apresentação

de diferentes moléculas ao hospedeiro promovem vantagem adaptativa para o fungo dentro do hospedeiro. Em destaque, as proteínas 14-3-3 têm sido envolvidas em processos como adesão em *Paracoccidoides brasiliensis* (da Silva *et al.*, 2013) e evasão da resposta imune celular, inibindo a produção de óxido nítrico por macrófagos em *Echinococcus multilocularis* (Andrade *et al.*, 2004). Da mesma forma essas proteínas podem estar envolvidas em processos como evasão da resposta imune, atuando no influxo de células dendríticas quando sensibilizados por antígenos do parasita *E. multilocularis* (Margos *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). As proteínas também já foram encontradas em vesículas contendo produtos de secreção relacionados à patogênese em *C. neoformans* e *E. granulosus* (Rodrigues *et al.*, 2008; Virginio *et al.*, 2012) e determinadas como proteínas imunodominantes para *Cryptococcus* em estudos de proteômica (Jobbins *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2009).

Neste trabalho foi realizado a construção da vacina de DNA através da clonagem da porção codificante do gene 14-3-3 em vetor de expressão em células eucarióticas, pcDNA3.1(+), por inserção direcional nos sítios *BamHI* e *XhoI* resultando no plasmídeo recombinante pcDNA3.1(+) + 14-3-3. Essa metodologia já foi utilizada com êxito em outros trabalhos como no estudo da vacina de DNA utilizando o peptídeo P10 derivado de uma glicoproteína diagnosticado como maior antígeno de *P. brasiliensis* (Rittner *et al.*, 2012) e utilizada com eficiência nos estudos de vacinas de DNA contra toxoplasmose (Cui *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010).

Também neste trabalho foi realizada com sucesso a avaliação da funcionalidade da vacina de DNA realizado por ensaios *in vitro* de transfecção

da vacina em células de epitélio pulmonar. Nós mensuramos o nível de expressão do gene 14-3-3 por RT-PCR, em células A459 transfectadas com o plasmídeo recombinante, pcDNA3.1(+) + 14-3-3, a imunogenicidade foi determinada por gel *SDS-PAGE* e *Western blot*. Esta mesma estratégia metodológica foi utilizada em outros trabalhos na construção de um vetor recombinante utilizando a proteína *Hsp70* (Li *et al.*, 2012) e no trabalho que construiu uma vacina de DNA expressando ureB e IL-12 de *H. pylori* com o mesmo objetivo de avaliar a imunogenicidade das vacinas (Xu *et al.*, 2007).

Os resultados da imunolocalização de 14-3-3 de *C. gattii* demonstram que a proteína tem distribuição pontual na superfície externa da levedura em concordância com os trabalhos publicados por Wang (Wang *et al.*, 2012). A falta de sinal de exportação nesta proteína já relatada em outros trabalhos nos reforça a ideia de que essas moléculas podem ser secretadas em fusão com seus inúmeros ligantes por vias de secreção. Essas proteínas chaves em processos celulares têm sido encontradas em vesículas de secreção ou na superfície externa de alguns patógenos possivelmente por apresentarem funções relacionadas a interação patógeno-hospedeiro (Rodrigues *et al.*, 2008; Virginio *et al.*, 2012).

A proteína 14-3-3 de *C. gattii* apresentou altos índices de antigenicidade na predição realizada pelo programa *Protean* (DNASTAR – Lasergene), porém esta proteína não demonstrou ser antigênica nos ensaios de ELISA. As análises estatísticas não revelaram diferença nos títulos de anticorpos IgGs totais dosados entre o grupo de camundongos imunizados com a vacina de DNA contendo o gene 14-3-3 e o grupo controle nas diferentes concentrações de soros utilizadas. As diferentes concentrações de proteína 14-3-3

recombinante (100ng/ μ L e 500ng/ μ L) também não alteraram o perfil de imunoglobulinas de forma geral. Isso demonstra a importância da avaliação biológica para a determinação da antigenicidade.

Vários fatores podem alterar e aumentar a eficiência da imunização por vacina de DNA.. Um dos fatores determinantes para o potencial de uma vacina de DNA é o mecanismo de entrega do vetor recombinante dentro das células eucarióticas. A imunização via injeção intramuscular como foi realizado neste trabalho está em concordância com o estudo de vacina de DNA utilizando o gene *Hsp65* contra paracocidiomicose (Ribeiro *et al.*, 2009). Outras metodologias de entrega têm sido aprimoradas como no estudo que retrata o aumento da resposta celular e humoral por imunização via bombardeamento em modelo animal (Cai *et al.*, 2013).

A disponibilidade tecnológica atual tem aprimorado a entrega do plasmídeo vacinal, a metodologia *Needle-Free* tem demonstrado aumento da resposta imune via células T CD8⁺ na imunização de forma mais efetiva (Graham *et al.*, 2013). Vacinas de DNA utilizadas em humanos contra o vírus influenza tem demonstrado eficácia por ambas as rotas de entrega da vacina, intramuscular ou intradérmica (Ledgerwood *et al.*, 2012).

A imunização por entrega através de partículas apresenta resultados satisfatórios principalmente através de parâmetros como velocidade e distribuição espacial da entrega da vacina em modelo animal via administração de partículas de ouro contendo DNA imobilizado (Dean *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2003). Sendo assim a seleção de uma nova técnica de

entrega da vacina de DNA pcDNA3.1(+)+ 14-3-3 poderia aumentar a eficiência da vacinação.

Em relação à administração de adjuvantes, estudos têm mostrado resultados promissores no aumento da efetividade das vacinas, por estimulação da resposta imune mais vigorosa conferindo proteção contra determinada doença. Essas adjuvantes compreendem CpG oligodeoxinucleotídeos, citocinas como IL-1 e IL-2, adjuvantes derivados do alumínio, carboidratos que podem atuar como complexos imunomoduladores, reforço na apresentação do antígeno, indução e citotoxicidade por células T (Gupta *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2013).

A escolha e manipulação do antígeno também é fator determinante na indução da resposta imune. Estudos recentes têm demonstrado bons resultados no ramo da vacinação moderna através da manipulação estrutural de antígenos para conferir proteção, a predição de epítomos mais imunogênicos que induzem anticorpos mais especificamente estão sendo catalogados através de predições por bioinformática estrutural (Kulp e Schief, 2013; Thomas *et al.*, 2011).

As vacinas de DNA são mais seguras e estáveis que metodologias convencionais como a utilização de patógenos atenuados, apresentam baixos riscos de integração no DNA genômico (Wang *et al.*, 2004), porém o melhoramento contínuo da efetividade da vacinação por DNA deve ser investigado continuamente, através da variação e manipulação dos fatores já mencionados.

6. CONCLUSÕES

- A proteína 14-3-3 está possivelmente associada à parede celular de *C. gattii*.
- A vacina de DNA contendo a região codificante do gene 14-3-3 de *C. gattii* não foi capaz de induzir resposta imune humoral em modelo animal.
- Este trabalho contribuiu para o estudo da imunogenicidade da proteína 14-3-3 de *C. gattii* fornecendo subsídio para estudos com outros modelos animais utilizando a mesma estratégia profilática.

7. PERSPECTIVAS

Dentre as perspectivas para este estudo estão à determinação de citocinas como IL-10, TNF- α , IFN- γ , o mapeamento dos epítomos com maior potencial imunogênico da proteína 14-3-3 por análise estrutural da proteína. Outra perspectiva deste trabalho é realizar a avaliação da resposta imune humoral utilizando a vacina de DNA no contexto terapêutico através de imunizações seguido de infecção por *C. gattii*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abegg, M. A., F. L. Cella, J. Faganello, P. Valente, A. Schrank e M. H. Vainstein. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia*, v.161, n.2, Feb, p.83-91. 2006.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers e D. J. Lipman. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, v.215, n.3, Oct 5, p.403-10. 1990.

Andrade, M. A., M. Siles-Lucas, E. Espinoza, J. L. Perez Arellano, B. Gottstein e A. Muro. *Echinococcus multilocularis* laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages in vitro. *Nitric Oxide*, v.10, n.3, May, p.150-5. 2004.

Antachopoulos, C. e T. J. Walsh. Immunotherapy of *Cryptococcus* infections. *Clin Microbiol Infect*, v.18, n.2, Feb, p.126-33. 2012.

Arora, S. e G. B. Huffnagle. Immune regulation during allergic bronchopulmonary mycosis: lessons taught by two fungi. *Immunol Res*, v.33, n.1, p.53-68. 2005.

Bridges, D. e G. B. Moorhead. 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE*, v.2005, n.296, Aug 9, p.re10. 2005.

Byrnes, E. J., 3rd, K. H. Bartlett, J. R. Perfect e J. Heitman. Cryptococcus gattii: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. Microbes Infect, v.13, n.11, Oct, p.895-907. 2011.

Byrnes, E. J., 3rd, R. J. Bildfell, S. A. Frank, T. G. Mitchell, K. A. Marr e J. Heitman. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of Cryptococcus gattii infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. J Infect Dis, v.199, n.7, Apr 1, p.1081-6. 2009.

Byrnes, E. J., 3rd, W. Li, Y. Lewit, H. Ma, K. Voelz, P. Ren, D. A. Carter, V. Chaturvedi, R. J. Bildfell, R. C. May e J. Heitman. Emergence and pathogenicity of highly virulent Cryptococcus gattii genotypes in the northwest United States. PLoS Pathog, v.6, n.4, Apr, p.e1000850. 2010.

Cai, M. S., S. X. Deng e M. L. Li. Comparison of the immune responses in BALB/c mice following immunization with DNA-based and live attenuated vaccines delivered via different routes. Vaccine, v.31, n.9, Feb 18, p.1353-6. 2013.

Casadevall, A. e L. A. Pirofski. Feasibility and prospects for a vaccine to prevent cryptococcosis. Med Mycol, v.43, n.8, Dec, p.667-80. 2005.

Casali, A. K., L. Goulart, L. K. Rosa E Silva, A. M. Ribeiro, A. A. Amaral, S. H. Alves, A. Schrank, W. Meyer e M. H. Vainstein. Molecular typing of clinical and environmental Cryptococcus neoformans isolates in the Brazilian state Rio

Grande do Sul. FEMS Yeast Res, v.3, n.4, Jun, p.405-15. 2003.

Chaturvedi, A. K., S. T. Weintraub, J. L. Lopez-Ribot e F. L. Wormley, Jr. Identification and characterization of *Cryptococcus neoformans* protein fractions that induce protective immune responses. Proteomics, v.13, n.23-24, Dec, p.3429-41. 2013.

Chayakulkeeree, M. e J. R. Perfect. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am, v.20, n.3, Sep, p.507-44, v-vi. 2006.

Chen, L. C., D. L. Goldman, T. L. Doering, L. Pirofski e A. Casadevall. Antibody response to *Cryptococcus neoformans* proteins in rodents and humans. Infect Immun, v.67, n.5, May, p.2218-24. 1999.

Cogliati, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica (Cairo), v.2013, p.675213. 2013.

Cox, G. J., T. J. Zamb e L. A. Babiuk. Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. J Virol, v.67, n.9, Sep, p.5664-7. 1993.

Cui, X., T. Lei, D. Yang, P. Hao, B. Li e Q. Liu. *Toxoplasma gondii* immune mapped protein-1 (TgIMP1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. Vaccine, v.30, n.13, Mar 16, p.2282-7. 2012.

Cutler, J. E., G. S. Deepe, Jr. e B. S. Klein. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. Nat Rev Microbiol, v.5, n.1, Jan, p.13-28. 2007.

Da Silva Jde, F., H. C. De Oliveira, C. M. Marcos, R. A. Da Silva, T. A. Da Costa, V. L. Calich, A. M. Almeida e M. J. Mendes-Giannini. Paracoccidoides brasiliensis 30 kDa adhesin: identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. PLoS One, v.8, n.4, p.e62533. 2013.

De Arruda, L. B., P. R. Chikhlikar, J. T. August e E. T. Marques. DNA vaccine encoding human immunodeficiency virus-1 Gag, targeted to the major histocompatibility complex II compartment by lysosomal-associated membrane protein, elicits enhanced long-term memory response. Immunology, v.112, n.1, May, p.126-33. 2004.

Dean, H. J., D. Fuller e J. E. Osorio. Powder and particle-mediated approaches for delivery of DNA and protein vaccines into the epidermis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, v.26, n.5-6, Oct, p.373-88. 2003.

Devi, S. J. Preclinical efficacy of a glucuronoxylomannan-tetanus toxoid conjugate vaccine of Cryptococcus neoformans in a murine model. Vaccine, v.14, n.9, Jun, p.841-4. 1996.

Fernandez, I., A. Pena, N. Del Teso, V. Perez e J. Rodriguez-Cuesta. Clinical

biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus. J Am Assoc Lab Anim Sci, v.49, n.2, Mar, p.202-6. 2010.

Ferraro, B., M. P. Morrow, N. A. Hutnick, T. H. Shin, C. E. Lucke e D. B. Weiner. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. Clin Infect Dis, v.53, n.3, Aug 1, p.296-302. 2011.

Ferrera, F., A. La Cava, M. Rizzi, B. H. Hahn, F. Indiveri e G. Filaci. Gene vaccination for the induction of immune tolerance. Ann N Y Acad Sci, v.1110, Sep, p.99-111. 2007.

Fu, H., R. R. Subramanian e S. C. Masters. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.40, p.617-47. 2000.

Gardino, A. K. e M. B. Yaffe. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. Semin Cell Dev Biol, v.22, n.7, Sep, p.688-95. 2011.

Gast, C. E., L. R. Basso, Jr., I. Bruzual e B. Wong. Azole resistance in *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest: Investigation of the role of ERG11. Antimicrob Agents Chemother, v.57, n.11, Nov, p.5478-85. 2013.

Goldman, D. L., H. Khine, J. Abadi, D. J. Lindenberg, L. Pirofski, R. Niang e A. Casadevall. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early

childhood. Pediatrics, v.107, n.5, May, p.E66. 2001.

Goren, M. B. Experimental murine cryptococcosis: effect of hyperimmunization to capsular polysaccharide. J Immunol, v.98, n.5, May, p.914-22. 1967.

Graham, B. S., M. E. Enama, M. C. Nason, I. J. Gordon, S. A. Peel, J. E. Ledgerwood, S. A. Plummer, J. R. Mascola, R. T. Bailer, M. Roederer, R. A. Koup e G. J. Nabel. DNA vaccine delivered by a needle-free injection device improves potency of priming for antibody and CD8+ T-cell responses after rAd5 boost in a randomized clinical trial. PLoS One, v.8, n.4, p.e59340. 2013.

Gullo, F. P., S. A. Rossi, C. Sardi Jde, V. L. Teodoro, M. J. Mendes-Giannini e A. M. Fusco-Almeida. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, v.32, n.11, Nov, p.1377-91. 2013.

Gupta, S., J. M. Termini, S. Kanagavelu e G. W. Stone. Design of vaccine adjuvants incorporating TNF superfamily ligands and TNF superfamily molecular mimics. Immunol Res, v.57, n.1-3, Dec, p.303-10. 2013.

Gurunathan, S., D. M. Klinman e R. A. Seder. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. Annu Rev Immunol, v.18, p.927-74. 2000.

Gurunathan, S., C. Y. Wu, B. L. Freidag e R. A. Seder. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. Curr Opin Immunol, v.12, n.4, Aug, p.442-

7. 2000.

Hardison, S. E., G. Herrera, M. L. Young, C. R. Hole, K. L. Wozniak e F. L. Wormley, Jr. Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. J Immunol, v.189, n.8, Oct 15, p.4060-8. 2012.

Hoag, K. A., M. F. Lipscomb, A. A. Izzo e N. E. Street. IL-12 and IFN-gamma are required for initiating the protective Th1 response to pulmonary cryptococcosis in resistant C.B-17 mice. Am J Respir Cell Mol Biol, v.17, n.6, Dec, p.733-9. 1997.

Horta, J. A., C. C. Staats, A. K. Casali, A. M. Ribeiro, I. S. Schrank, A. Schrank e M. H. Vainstein. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. Med Mycol, v.40, n.6, Dec, p.565-71. 2002.

Huffnagle, G. B. e M. F. Lipscomb. Pulmonary cryptococcosis. Am J Pathol, v.141, n.6, Dec, p.1517-20. 1992.

Jiang, Q., J. Zhang, X. Chen, M. Xia, Y. Lu, W. Qiu, G. Feng, D. Zhao, Y. Li, F. He, G. Peng e Y. Wang. A novel recombinant DNA vaccine encoding *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and FL protects against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice. J Biomed Res, v.27, n.5, Sep, p.406-20. 2013.

Jobbins, S. E., C. J. Hill, J. M. D'souza-Basseal, M. P. Padula, B. R. Herbert e M. B. Krockenberger. Immunoproteomic approach to elucidating the pathogenesis of cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii*. J Proteome Res, v.9, n.8, Aug 6, p.3832-41. 2010.

Kidd, S. E., F. Hagen, R. L. Tschärke, M. Huynh, K. H. Bartlett, M. Fyfe, L. Macdougall, T. Boekhout, K. J. Kwon-Chung e W. Meyer. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.49, Dec 7, p.17258-63. 2004.

Kulp, D. W. e W. R. Schief. Advances in structure-based vaccine design. Curr Opin Virol, v.3, n.3, Jun, p.322-31. 2013.

Ledgerwood, J. E., Z. Hu, I. J. Gordon, G. Yamshchikov, M. E. Enama, S. Plummer, R. Bailer, M. B. Pearce, T. M. Tumpey, R. A. Koup, J. R. Mascola, G. J. Nabel e B. S. Graham. Influenza virus h5 DNA vaccination is immunogenic by intramuscular and intradermal routes in humans. Clin Vaccine Immunol, v.19, n.11, Nov, p.1792-7. 2012.

Li, X. L., Y. X. Zhao, L. R. Sun, J. Yang e H. J. Xu. The preparation of HL-60 cells vaccine expressing BCG heat shock protein 70 and detection of its immunogenicity in vitro. Hum Vaccin Immunother, v.8, n.10, Oct, p.1376-81. 2012.

Lin, X. e J. Heitman. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Annu Rev Microbiol, v.60, p.69-105. 2006.

Liu, Q., L. Shang, H. Jin, F. Wei, X. Q. Zhu e H. Gao. The protective effect of a *Toxoplasma gondii* SAG1 plasmid DNA vaccine in mice is enhanced with IL-18. Res Vet Sci, v.89, n.1, Aug, p.93-7. 2010.

Liu, Y., N. K. Truong, M. A. Kendall e B. J. Bellhouse. Characteristics of a micro-biostic system for murine immunological studies. Biomed Microdevices, v.9, n.4, Aug, p.465-74. 2007.

Louria, D. B. Specific and non-specific immunity in experimental cryptococcosis in mice. J Exp Med, v.111, May 1, p.643-65. 1960.

Lugarini, C., C. S. Goebel, L. A. Condas, M. D. Muro, M. R. De Farias, F. M. Ferreira e M. H. Vainstein. *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Parana, Brazil. Mycopathologia, v.166, n.2, Aug, p.61-9. 2008.

Luo, Z., H. Shi, H. Zhang, M. Li, Y. Zhao, J. Zhang, F. Guo, S. Luo, P. Sun, D. Zhang, Z. Qian e L. Yang. Plasmid DNA containing multiple CpG motifs triggers a strong immune response to hepatitis B surface antigen when combined with incomplete Freund's adjuvant but not aluminum hydroxide. Mol Med Rep, v.6, n.6, Dec, p.1309-14. 2012.

Macdougall, L., S. E. Kidd, E. Galanis, S. Mak, M. J. Leslie, P. R. Cieslak, J. W. Kronstad, M. G. Morshed e K. H. Bartlett. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. Emerg Infect Dis, v.13, n.1, Jan, p.42-50. 2007.

Mak, S., B. Klinkenberg, K. Bartlett e M. Fyfe. Ecological niche modeling of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada. Environ Health Perspect, v.118, n.5, May, p.653-8. 2010.

Mansour, M. K., L. S. Schlesinger e S. M. Levitz. Optimal T cell responses to *Cryptococcus neoformans* mannoprotein are dependent on recognition of conjugated carbohydrates by mannose receptors. J Immunol, v.168, n.6, Mar 15, p.2872-9. 2002.

Mansour, M. K., L. E. Yauch, J. B. Rottman e S. M. Levitz. Protective efficacy of antigenic fractions in mouse models of cryptococcosis. Infect Immun, v.72, n.3, Mar, p.1746-54. 2004.

Margos, M. C., D. Grandgirard, S. Leib e B. Gottstein. In vitro induction of lymph node cell proliferation by mouse bone marrow dendritic cells following stimulation with different *Echinococcus multilocularis* antigens. J Helminthol, Jan 13, p.1-10. 2011.

Marr, K. A., K. Datta, L. A. Pirofski e R. Barnes. *Cryptococcus gattii* infection in healthy hosts: a sentinel for subclinical immunodeficiency? Clin Infect Dis, v.54,

n.1, Jan 1, p.153-4. 2012.

Martins, L. M., H. M. De Andrade, M. H. Vainstein, B. Wanke, A. Schrank, C. B. Balaguez, P. R. Dos Santos, L. Santi, F. Pires Sda, A. S. Da Silva, J. A. De Castro, R. M. Brandao e S. J. Do Monte. Immunoproteomics and immunoinformatics analysis of *Cryptococcus gattii*: novel candidate antigens for diagnosis. Future Microbiol, v.8, n.4, Apr, p.549-63. 2013.

Martins, L. M., B. Wanke, S. Lazera Mdos, L. Trilles, G. G. Barbosa, R. C. Macedo, A. Cavalcanti Mdo, K. D. Eulalio, J. A. Castro, A. S. Silva, F. F. Nascimento, V. A. Gouveia e S. J. Monte. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piaui (northeastern Brazil). Mem Inst Oswaldo Cruz, v.106, n.6, Sep, p.725-30. 2011.

Mcquiston, T. J. e P. R. Williamson. Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans*. J Infect Chemother, v.18, n.1, Feb, p.1-9. 2012.

Meng, M., S. He, G. Zhao, Y. Bai, H. Zhou, H. Cong, G. Lu, Q. Zhao e X. Q. Zhu. Evaluation of protective immune responses induced by DNA vaccines encoding *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and 14-3-3 protein in BALB/c mice. Parasit Vectors, v.5, p.273. 2012.

Mershon, K. L., A. Vasuthasawat, G. W. Lawson, S. L. Morrison e D. O.

Beenhouwer. Role of complement in protection against *Cryptococcus gattii* infection. Infect Immun, v.77, n.3, Mar, p.1061-70. 2009.

Mershon-Shier, K. L., A. Vasuthasawat, K. Takahashi, S. L. Morrison e D. O. Beenhouwer. In vitro C3 deposition on *Cryptococcus* capsule occurs via multiple complement activation pathways. Mol Immunol, v.48, n.15-16, Sep, p.2009-18. 2011.

Meyer, W., A. Castaneda, S. Jackson, M. Huynh e E. Castaneda. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg Infect Dis, v.9, n.2, Feb, p.189-95. 2003.

Mohan, T., P. Verma e D. N. Rao. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. Indian J Med Res, v.138, n.5, Nov, p.779-95. 2013.

Murphy, J. W., F. Bistoni, G. S. Deepe, R. A. Blackstock, K. Buchanan, R. B. Ashman, L. Romani, A. Mencacci, E. Cenci, C. Fe D'ostiani, G. Del Sero, V. L. Calich e S. S. Kashino. Type 1 and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. Med Mycol, v.36 Suppl 1, p.109-18. 1998.

Murphy, J. W., R. L. Mosley, R. Cherniak, G. H. Reyes, T. R. Kozel e E. Reiss. Serological, electrophoretic, and biological properties of *Cryptococcus neoformans* antigens. Infect Immun, v.56, n.2, Feb, p.424-31. 1988.

Ngamskulrungrroj, P., Y. Chang, E. Sionov e K. J. Kwon-Chung. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. MBio, v.3, n.3. 2012.

Nicola, A. M., E. J. Robertson, P. Albuquerque, S. Derengowski Lda e A. Casadevall. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. MBio, v.2, n.4. 2011.

Nishikawa, M. M., M. S. Lazera, G. G. Barbosa, L. Trilles, B. R. Balassiano, R. C. Macedo, C. C. Bezerra, M. A. Perez, P. Cardarelli e B. Wanke. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. J Clin Microbiol, v.41, n.1, Jan, p.73-7. 2003.

Nooney, L., R. C. Matthews e J. P. Burnie. Evaluation of Mycograb, amphotericin B, caspofungin, and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by checkerboard and time-kill methodologies. Diagn Microbiol Infect Dis, v.51, n.1, Jan, p.19-29. 2005.

Obsil, T. e V. Obsilova. Structural basis of 14-3-3 protein functions. Semin Cell Dev Biol, v.22, n.7, Sep, p.663-72. 2011.

Odom, A., S. Muir, E. Lim, D. L. Toffaletti, J. Perfect e J. Heitman. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. Embo J, v.16, n.10, May 15,

p.2576-89. 1997.

Okagaki, L. H. e K. Nielsen. Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. Eukaryot Cell, v.11, n.6, Jun, p.820-6. 2012.

Oscarson, S., M. Alpe, P. Svahnberg, A. Nakouzi e A. Casadevall. Synthesis and immunological studies of glycoconjugates of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan oligosaccharide structures. Vaccine, v.23, n.30, Jun 10, p.3961-72. 2005.

Pappas, P. G. Cryptococcal infections in non-hiv-infected patients. Trans Am Clin Climatol Assoc, v.124, p.61-79. 2013.

Park, B. J., K. A. Wannemuehler, B. J. Marston, N. Govender, P. G. Pappas e T. M. Chiller. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. Aids, v.23, n.4, Feb 20, p.525-30. 2009.

Perfect, J. R., W. E. Dismukes, F. Dromer, D. L. Goldman, J. R. Graybill, R. J. Hamill, T. S. Harrison, R. A. Larsen, O. Lortholary, M. H. Nguyen, P. G. Pappas, W. G. Powderly, N. Singh, J. D. Sobel e T. C. Sorrell. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. Clin Infect Dis, v.50, n.3, Feb 1, p.291-322. 2010.

Pietrella, D., R. Cherniak, C. Strappini, S. Perito, P. Mosci, F. Bistoni e A. Vecchiarelli. Role of mannoprotein in induction and regulation of immunity to *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, v.69, n.5, May, p.2808-14. 2001.

Qiu, Y., M. J. Davis, J. K. Dayrit, Z. Hadd, D. L. Meister, J. J. Osterholzer, P. R. Williamson e M. A. Olszewski. Immune modulation mediated by cryptococcal laccase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice. PLoS One, v.7, n.10, p.e47853. 2012.

Ribeiro, A. M., A. L. Bocca, A. C. Amaral, L. H. Faccioli, F. C. Galetti, C. R. Zarate-Blades, F. Figueiredo, C. L. Silva e M. S. Felipe. DNAhsp65 vaccination induces protection in mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Vaccine, v.27, n.4, Jan 22, p.606-13. 2009.

Ribeiro, A. M., A. L. Bocca, A. C. Amaral, A. C. Souza, L. H. Faccioli, A. A. Coelho-Castelo, F. Figueiredo, C. L. Silva e M. S. Felipe. HSP65 DNA as therapeutic strategy to treat experimental paracoccidioidomycosis. Vaccine, v.28, n.6, Feb 10, p.1528-34. 2010.

Rittinger, K., J. Budman, J. Xu, S. Volinia, L. C. Cantley, S. J. Smerdon, S. J. Gamblin e M. B. Yaffe. Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. Mol Cell, v.4, n.2, Aug, p.153-66. 1999.

Rittner, G. M., J. E. Munoz, A. F. Marques, J. D. Nosanchuk, C. P. Taborda e L.

R. Travassos. Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis. PLoS Negl Trop Dis, v.6, n.2, p.e1519. 2012.

Rodrigues, M. L., E. S. Nakayasu, D. L. Oliveira, L. Nimrichter, J. D. Nosanchuk, I. C. Almeida e A. Casadevall. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. Eukaryot Cell, v.7, n.1, Jan, p.58-67. 2008.

Rodrigues, M. L., L. Shi, E. Barreto-Bergter, L. Nimrichter, S. E. Farias, E. G. Rodrigues, L. R. Travassos e J. D. Nosanchuk. Monoclonal antibody to fungal glucosylceramide protects mice against lethal *Cryptococcus neoformans* infection. Clin Vaccine Immunol, v.14, n.10, Oct, p.1372-6. 2007.

Romani, L. Immunity to fungal infections. Nat Rev Immunol, v.4, n.1, Jan, p.1-23. 2004.

Sambrook, J. e M. J. Gething. Protein structure. Chaperones, paperones. Nature, v.342, n.6247, Nov 16, p.224-5. 1989.

Schoonheim, P. J., H. Veiga, C. Pereira Dda, G. Friso, K. J. Van Wijk e A. H. De Boer. A comprehensive analysis of the 14-3-3 interactome in barley leaves using a complementary proteomics and two-hybrid approach. Plant Physiol, v.143, n.2, Feb, p.670-83. 2007.

Siles-Lucas, M., M. Merli, U. Mackenstedt e B. Gottstein. The Echinococcus multilocularis 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. Vaccine, v.21, n.5-6, Jan 17, p.431-9. 2003.

Siles-Lucas, M., C. P. Nunes, A. Zaha e M. Breijo. The 14-3-3 protein is secreted by the adult worm of Echinococcus granulosus. Parasite Immunol, v.22, n.10, Oct, p.521-8. 2000.

Sorrell, T. C. Cryptococcus neoformans variety gattii. Med Mycol, v.39, n.2, Apr, p.155-68. 2001.

Sorrell, T. C., A. G. Brownlee, P. Ruma, R. Malik, T. J. Pfeiffer e D. H. Ellis. Natural environmental sources of Cryptococcus neoformans var. gattii. J Clin Microbiol, v.34, n.5, May, p.1261-3. 1996.

Springer, D. J. e V. Chaturvedi. Projecting global occurrence of Cryptococcus gattii. Emerg Infect Dis, v.16, n.1, Jan, p.14-20. 2010.

Stewart, A. J. e P. M. Devlin. The history of the smallpox vaccine. J Infect, v.52, n.5, May, p.329-34. 2006.

Tang, D. C., M. Devit e S. A. Johnston. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. Nature, v.356, n.6365, Mar 12, p.152-4. 1992.

Thomas, S., N. R. Thirumalapura, P. A. Crocquet-Valdes, B. A. Luxon e D. H. Walker. Structure-based vaccines provide protection in a mouse model of ehrlichiosis. PLoS One, v.6, n.11, p.e27981. 2011.

Tzivion, G., M. Dobson e G. Ramakrishnan. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. Biochim Biophys Acta, v.1813, n.11, Nov, p.1938-45. 2011.

Van Heusden, G. P. e H. Y. Steensma. Yeast 14-3-3 proteins. Yeast, v.23, n.3, Feb, p.159-71. 2006.

Virginio, V. G., K. M. Monteiro, F. Drumond, M. O. De Carvalho, D. M. Vargas, A. Zaha e H. B. Ferreira. Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. Mol Biochem Parasitol, v.183, n.1, May, p.15-22. 2012.

Voelz, K. e R. C. May. Cryptococcal interactions with the host immune system. Eukaryot Cell, v.9, n.6, Jun, p.835-46. 2010.

Walzl, G., I. R. Humphreys, B. G. Marshall, L. Edwards, P. J. Openshaw, R. J. Shaw e T. Hussell. Prior exposure to live *Mycobacterium bovis* BCG decreases *Cryptococcus neoformans*-induced lung eosinophilia in a gamma interferon-dependent manner. Infect Immun, v.71, n.6, Jun, p.3384-91. 2003.

Wang, B., J. Boyer, V. Srikantan, L. Coney, R. Carrano, C. Phan, M. Merva, K.

Dang, M. Agadjanan, L. Gilbert e Et Al. DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates. DNA Cell Biol, v.12, n.9, Nov, p.799-805. 1993.

Wang, X., W. Chen, X. Li, C. Zhou, C. Deng, X. Lv, Y. Fan, J. Men, C. Liang e X. Yu. Identification and molecular characterization of a novel signaling molecule 14-3-3 epsilon in *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products. Parasitol Res, v.110, n.4, Apr, p.1411-20. 2012.

Wang, Z., P. J. Troilo, X. Wang, T. G. Griffiths, S. J. Pacchione, A. B. Barnum, L. B. Harper, C. J. Pauley, Z. Niu, L. Denisova, T. T. Follmer, G. Rizzuto, G. Ciliberto, E. Fattori, N. L. Monica, S. Manam e B. J. Ledwith. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. Gene Ther, v.11, n.8, Apr, p.711-21. 2004.

Xu, C., Z. S. Li, Y. Q. Du, Y. F. Gong, H. Yang, B. Sun e J. Jin. Construction of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* DNA vaccine expressing *H pylori ureB* and IL-2. World J Gastroenterol, v.13, n.6, Feb 14, p.939-44. 2007.

Yaffe, M. B. e A. E. Elia. Phosphoserine/threonine-binding domains. Curr Opin Cell Biol, v.13, n.2, Apr, p.131-8. 2001.

Young, M., S. Macias, D. Thomas e F. L. Wormley, Jr. A proteomic-based approach for the identification of immunodominant *Cryptococcus neoformans* proteins. Proteomics, v.9, n.9, May, p.2578-88. 2009.

Zhang, L., G. Widera, S. Blecher, D. A. Zaharoff, B. Mossop e D. Rabussay. Accelerated immune response to DNA vaccines. DNA Cell Biol, v.22, n.12, Dec, p.815-22. 2003.

Zhang, W., H. Wen, J. Li, R. Lin e D. P. Mcmanus. Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. Clin Dev Immunol, v.2012, p.101895. 2012.

Zhou, Q. e W. J. Murphy. Immune response and immunotherapy to Cryptococcus infections. Immunol Res, v.35, n.3, p.191-208. 2006.

9. ANEXOS

Anexo 01:

***Curriculum Vitae* Resumido: Mingori, MR.**

Dados Pessoais:

Nome: Moara Rodrigues Mingori

Nascimento: 08/02/1987 – Pato Branco/PR, Brasil.

Endereço Profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
Centro de Biotecnologia (CBiot). Avenida Bento Gonçalves, 9500. Prédio
434221, Sala: 220. Agronomia, Porto Alegre/RS, Brasil. CEP: 91.501-970

Telefone: (051) 3308-7767.

E-mail: moara.rmingori@gmail.com

Endereço Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2678194017571758>

Formação Acadêmica/Titulação:

2012 – 2014: Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, Brasil. Título: Desenvolvimento de vacina de DNA com o gene 14-3-3 de *Cryptococcus gatii* como estratégia profilática para Criptococose.

Orientadora: Dra. Marilene Henning Vainstein.

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2006 – 2010: Graduação em Ciências Biológicas: Licenciatura na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel/PR, Brasil. Título Super expressão do gene xynB2 que codifica uma β -Xilosidase em *Caulobacter crescentus*.

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Garcia Simão.

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Formação Complementar:

2013: Extensão Universitária em Redação Científica. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre/RS, Brasil.

2011: Aperfeiçoamento em Estágio. Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, Brasil.

Orientadora: Dra. Marilene Henning Vainstein.

Atuação Profissional:

2011 – 2014:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, Brasil.

Vínculo: Pesquisador, Bolsista de Pós-Graduação CAPES.
Enquadramento Funcional: Bolsista de Pós-Graduação CAPES. Carga Horária Semanal: 40 horas.

2006 – 2010:

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel/PR, Brasil.

Vínculo: Pesquisador, Bolsista de Iniciação Científica CAPES.
Enquadramento Funcional: Pesquisador, Iniciação Científica, Monitora da disciplina Biologia Celular e Molecular. Carga Horária Semanal: 20 horas.

Projetos de Pesquisa:

2012 – 2014: O desenvolvimento de uma vacina de DNA com o gene 14-3-3 de *C. gattii* para criptococose. Natureza: Projeto de Pesquisa. Situação: Em andamento. Integrantes: Moara Rodrigues Mingori, Marilene Henning Vainstein

(Responsável). Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, Brasil.

2011 – 2014: Utilização de flagelina como imunomodulador de antígenos recombinantes para profilaxia e terapêutica de criptococose e candidíase. Natureza: Projeto de Pesquisa. Situação: Em andamento. Integrantes: Moara Rodrigues Mingori, Carolina Pereira Silveira, Augusto Schrank, Charley Christian Staats, Carlos Taborda, Livia Kmetzch Rosa e Silva, Marilene Henning Vainstein (Responsável). Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, Brasil.

2010: Superexpressão do gene xynB2 que codifica uma β -Xilosidase em *Caulobacter crescentus*. Natureza: Projeto de Pesquisa. Situação: Concluído. Integrantes: Moara Rodrigues Mingori, Rita de Cássia Garcia Simão (Responsável).

2008 – 2009: Clonagem e caracterização do gene xynB1 de *Caulobacter crescentus*. Natureza: Projeto de Pesquisa. Situação: Concluído. Integrantes: Moara Rodrigues Mingori, Rita de Cássia Garcia Simão (Responsável).

2007 – 2008: Análise de expressão dos genes xynB1 e xynB2 que codificam β -Xilosidases em *Caulobacter crescentus* e seus papéis no aproveitamento de

resíduos agroindustriais. Natureza: Projeto de Pesquisa. Situação: Concluído.
Integrantes: Moara Rodrigues Mingori, Rita de Cássia Garcia Simão
(Responsável).

2005 – 2006: Análise proteômica do estresse hídrico em cafeeiro. Natureza:
Projeto de Pesquisa. Situação: Concluído. Integrantes: Moara Rodrigues
Mingori, Clarice Aoki Osaku, Marina Kimiko Kadowaki, Rinaldo F. Gandra, Rita
de Cássia Garcia Simão, Marcelo Henrique Rocha, Roberto Lui, Vladimir Pavan
Margarido, Fábio de Oliveira Pedrosa (Responsável).

Produção Bibliográfica:

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo):

MINGORI MR, GANDRA RF, KADOWAKI MK, OSAKU CA, SIMAO RCG.
Clonagem e caracterização do promotor do gene xynB2 que codifica β -
xilosidase em *Caulobacter crescentus* In: 3º COSIMP III Simpósio em ciência e
tecnologia de alimentos do Mercosul, 2008, Cascavel. Clonagem e
caracterização do promotor do gene XynB2 que codifica β -xilosidase em
Caulobacter crescentus. 2008.

MINGORI MR, CARDOSO K, OSAKU CA, KADOWAKI MK, GANDRA RF,
SIMAO RCG. Avaliação do potencial biotecnológico de cepas de *Caulobacter*
spp. isoladas de ambientes aquáticos In: II Congresso da Academia Trinacional

de Ciências, 2007, Foz do Iguaçu.

Avaliação do potencial biotecnológico de cepas de *Caulobacter spp.* isoladas de ambientes aquáticos. 2007.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo):

Corrêa JM, MINGORI MR, GANDRA RF, SIMAO RCG.

Depletion of xynB2 gene up-regulates β -xylosidases expression in *C. crescentus* In: 28^a REGEM - Reunião de Genética de Microrganismos, 2012, Foz do Iguaçu. 28^a REGEM - Reunião de Genética de Microrganismos. 2012.

MINGORI MR, SILVEIRA CP, SCHRANK A, VAINSTEIN MH.

The protective effect of proteins 14-3-3 and Enolase in cryptococcosis In: Reunião de Genética de Microrganismos, 2012, Foz do Iguaçu, 28^a REGEM - Reunião de Genética de Microrganismos. MICRO033. 2012.