



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015001503-8 A2

(22) Data do Depósito: 23/01/2015

(43) Data da Publicação: 23/08/2016



\* B R 1 0 2 0 1 5 0 0 1 5 0 3 A

(54) **Título:** PEPTÍDEOS ANTIADESÃO DE PARACOCCIDIOIDES SPP. E USO DOS MESMOS

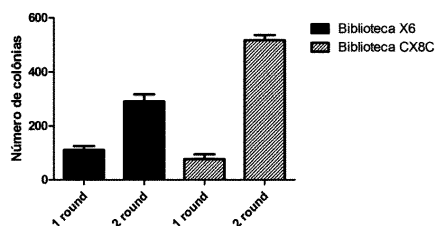
(51) **Int. Cl.:** C07K 7/06; A61K 38/08; A61P 31/10; C12N 15/11; C40B 30/06; (...)

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) **Inventor(es):** ANA MARISA FUSCO ALMEIDA, HAROLDO CESAR DE OLIVEIRA, MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI, RICARDO JOSÉ GIORDANO, JUSSARA MICHALOSKI

(74) **Procurador(es):** FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** PEPTÍDEOS ANTIADESÃO DE PARACOCCIDIOIDES SPP. E USO DOS MESMOS. A presente invenção refere-se a peptídeos antiadesão de Paracoccidiodides spp. e uso dos mesmos na terapia profilática da micose sistêmica paracoccidiodomocose ou na associação com drogas antifúngicas para melhorar a seletividade destas drogas ao alvo. A identificação de adesinas e moléculas alvo utilizadas pelo patógeno durante sua interação com estruturas do hospedeiro nas diferentes espécies de Paracoccidiodides foi realizada utilizando a técnica de Phage Display. Para tal propósito, uma biblioteca de fagos apresentando grande diversidade de peptídeos foi utilizada para a seleção de peptídeos capazes de se ligarem a células de Paracoccidiodides utilizando a técnica Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands (BRASIL) através de três rodadas de seleção. Através desta técnica 4 peptídeos foram selecionados por sua capacidade de ligação às células de Paracoccidiodides (Pep1: LVGRVV? Pep2: LDFVVG? Pep3: CSVSALGGAC? Pep4: VVAGSV), e quando ligados a diferentes isolados do fungo foram capazes de inibir em até 60% a adesão do patógeno a quatro diferentes c (...)



**PEPTÍDEOS ANTIADESÃO DE *PARACOCCIDIOIDES SPP.* E USO DOS  
MESMOS**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo de aplicação da Química, Farmácia, Microbiologia, Medicina e, mais especificamente, na área de biotecnologia uma vez que se refere a peptídeos antiadesão de *Paracoccidioides spp.* e uso dos mesmos na terapia profilática da micose sistêmica paracoccidioidomicose ou na associação com drogas antifúngicas para melhorar a seletividade destas drogas ao alvo.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] *Paracoccidioides spp.* são fungos dimórficos, agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica que atinge a América Latina, sendo o Brasil, o país que possui o maior número de áreas endêmicas para essa doença no mundo.

[003] Nas áreas endêmicas da doença a incidência estimada é de, aproximadamente, um a três casos clínicos para cada 100.000 habitantes por ano. A PCM atinge preferencialmente trabalhadores rurais do sexo masculino, entre 30 a 60 anos de idade. O trabalho com solo e plantações em área rural é fator ocupacional predisponente para a aquisição da PCM. A maioria dos indivíduos expostos a propágulos do fungo desenvolve uma infecção assintomática, com lesões granulomatosas estabelecidas nos pulmões e linfonodos. Em alguns indivíduos, o fungo pode permanecer no estado latente e após pode ocorrer disseminação para outros órgãos e tecidos, por meio das vias hematogênica e linfática.

[004] Os agentes de micoses sistêmicas possuem alguns fatores que permitem o seu crescimento nas condições adversas proporcionadas pelo hospedeiro, que podem contribuir para o desenvolvimento da doença. Assim, o complexo *Paracoccidioides* possui mecanismos que o capacitam a aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro, sintetizando várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasita-hospedeiro. O sucesso de colonização dos tecidos do hospedeiro pelo fungo é, portanto, um evento complexo, geralmente envolvendo um ligante codificado pelo patógeno e um receptor da célula. O microrganismo tem como opção três tipos de componentes do hospedeiro, com os quais pode interagir: produtos secretados pela célula, superfícies da célula hospedeira ou as proteínas da matriz extracelular (MEC), como os colágenos tipos I e IV, fibronectina e laminina. O entendimento e identificação de moléculas envolvidas na adesão de microrganismos a diferentes substratos no hospedeiro é um dos caminhos a serem seguidos na descoberta de tratamentos eficientes para as micoses sistêmicas.

[005] A adesão é conferida por uma classe de proteínas especial presentes na parede celular denominadas de adesinas. O conhecimento da composição da parede celular e dos componentes exocelulares dos fungos contribui para a identificação de ligantes na superfície celular de patógenos. Estes componentes podem funcionar como adesinas capazes de mediar interações do fungo com tecidos do hospedeiro durante a infecção. Além do seu papel na fixação da célula hospedeira e também no acasalamento, adesinas

fúngicas são implicadas em várias outras funções como agregação social, formação de biofilme sobre os tecidos, em prótese médica e cateteres e nas interações com outros micróbios. A formação de biofilme contribui para a resistência às drogas e aumento da persistência da infecção. Diferenças na adesão são responsáveis pela maior virulência/patogenicidade de um isolado em relação às outras. A variabilidade fenotípica e a plasticidade de adesinas as colocam como um mecanismo de defesa dos fungos que lhes permitem alterar as suas propriedades de adesão, em resposta a diferentes ambientes.

[006] Adesinas e adesina-like proteínas são componentes da superfície celular e/ou do metabolismo que conferem aos microrganismos capacidade de fixação as células, tecidos e/ou superfícies abióticas. Adesinas correspondem às primeiras moléculas de contato do patógeno para posterior invasão da célula hospedeira e, portanto, indispensável determinante de sua virulência. Devido à sua importância na invasão da célula hospedeira, adesinas são intensamente investigadas por se constituírem também em potencial alvo para intervenção terapêutica (fármacos e/ou vacinas).

[007] Os fungos do gênero *Paracoccidioides* possuem uma grande diversidade de moléculas, das mais distintas origens e funções, que atuam como moléculas de vital importância para a sobrevivência do fungo quando em contato com o hospedeiro, permitindo assim que o fungo se proteja e se defenda do ambiente hostil que deve enfrentar para se estabelecer e se disseminar pelo organismo do hospedeiro. Por conta desta grande variedade, distintas moléculas

usadas pelo fungo durante essa interação, ainda são pouco conhecidas e esforços na caracterização de novas moléculas devem ser realizados a fim de conhecer todo o arsenal utilizado pelo patógeno e delinear novas terapêuticas e melhorar o diagnóstico. Esta problemática se agrava com as recentes descobertas acerca do gênero *Paracoccidioides* que agora é composto por duas espécies, divididas em quatro espécies filogenéticas, sendo que essa diversidade também se reflete nas estratégias adotadas pelo patógeno para o estabelecimento da infecção.

[008] Reconhecimento da diversidade molecular de proteínas de superfície celular em diferentes doenças é essencial para o desenvolvimento de terapias específicas. Progressos na terapêutica orientada requerem o estabelecimento de estratégias eficazes para a identificação de marcadores de superfície clinicamente relevantes. Durante a última década, uma série de estratégias foi desenvolvida para a identificação de receptor-ligantes que podem servir como alvos terapêuticos e marcadores no diagnóstico da doença. A tecnologia de bibliotecas de peptídeos apresentadas em fagos, conhecida como *Phage Display*, tem sido extremamente importante para a identificação e caracterização de novos ligantes de alta afinidade e seus receptores em diversas doenças. A possibilidade de expressão de uma proteína de fusão no capsídeo de fagos, de maneira acessível ao reconhecimento por um ligante, demonstrada por Smith (1985), abriu o caminho para a construção de bibliotecas combinatórias apresentadas na superfície destas partículas virais. *Phage Display* é uma técnica eficiente para identificar peptídeos

ou proteínas que se ligam a outras moléculas com diversas finalidades. A tecnologia é baseada no princípio de que polipeptídios podem ser expressos na superfície de fagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA exógeno no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou proteína expressa fica exposto na superfície da partícula fusionado a outra proteína endógena.

[009] A tecnologia de *Phage Display* é atualmente bastante utilizada no estudo de grande diversidade de patógenos humanos sendo responsável pela identificação de importantes moléculas com diversas aplicabilidades, desde marcadores diagnósticos até possíveis moléculas a serem utilizadas no tratamento de pacientes acometidos por infecções com diferentes microrganismos.

[010] No estudo da PCM esta técnica já foi utilizada e duas importantes moléculas foram analisadas: um peptídeo (chamado de p04) que se liga especificamente a isolados bastante virulentos de *P. brasiliensis* foi isolado, sendo este peptídeo capaz de matar o fungo quando este é inoculado em camundongos infectados com *P. brasiliensis*, além disso, por sua seletividade a isolados virulentos, este peptídeo também foi proposto como um biomarcador de virulência de diferentes isolados do fungo; e um peptídeo (chamado de P2) que se liga ao anticorpo anti-gp75 foi isolado, que se mostrou eficiente como molécula para o diagnóstico sorológico da doença, já que este peptídeo é fortemente reconhecido no soro de pacientes com PCM e não demonstra nenhuma reatividade em pacientes não infectados e infectados com diferentes micoses como aspergilose e candidemias.

[011] O *Phage Display* já foi bastante utilizado para identificar moléculas que atuam como adesinas em diferentes microrganismos. A presente invenção envolve a utilização da técnica de *Phage Display* para selecionar peptídeos que interajam com moléculas e receptores envolvidos na interação de *P. brasiliensis*-hospedeiro. A técnica de *Phage Display* permite expressar pequenos peptídeos com 5 a 15 aminoácidos que são apresentados numa das proteínas do capsídeo de bacteriófagos. Uma biblioteca de *Phage Display* pode conter mais de  $10^9$  diferentes peptídeos o que resulta em ligantes para virtualmente qualquer alvo biológico. Uma característica importante do *Phage Display* é que os peptídeos selecionados frequentemente apresentam atividade biológica relacionada com a natureza da molécula em estudo. Por exemplo, no caso de enzimas, o peptídeo frequentemente mimetiza o substrato, ligando-se ao sítio ativo ou alostérico, inibindo ou ativando a enzima, no caso de receptores de superfície, o peptídeo se assemelha a uma proteína ligante do receptor, competindo pela ativação do mesmo. Essa característica do *Phage Display* permite identificar alvos terapêuticos e marcadores de diagnóstico relevantes aos diversos processos biológicos de um organismo e, ao mesmo tempo, isolar e caracterizar peptídeos antagonistas ou agonistas dos alvos identificados. Esses peptídeos podem ser então explorados para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. Portanto, *Phage Display* é uma técnica que encontra múltiplas aplicações, tais como, desenho racional de fármacos, terapias direcionadas, terapias gênicas, produção de vacinas, métodos diagnósticos, entre outras aplicações.

#### ESTADO DA TÉCNICA

[012] A presente invenção identificou 4 peptídeos que têm a capacidade de inibir a adesão de *Paracoccidioides spp.* impedindo assim esse importante passo no processo de infecção do fungo.

[013] Na literatura já foi descrito um processo e a produção de proteína recombinante para diagnóstico de PCM, mas não é citado uso para tratamento e prevenção, tampouco os peptídeos identificados. Além disso, compostos para tratamento de diversas doenças, inclusive infecção por *P. brasiliensis* já foram descritos como: moléculas Cdc42 GTPase; emulsão de cetoconazol; compostos aromáticos; peptídeo contendo entre 3 e 200 aminoácidos de lisina; nistatina; nucleosídeos 3'-deoxipurina; derivado de adenosina; nicomicina; e isoindol, porém os peptídeos descritos na presente invenção não foram antes relatados no estado da técnica.

#### OBJETIVOS E VANTAGENS DA INVENÇÃO

[014] A presente invenção refere-se a peptídeos antiadesão de *Paracoccidioides spp.* e uso dos mesmos na terapia profilática da micose sistêmica paracoccidioidomicose ou na associação com drogas antifúngicas para melhorar a seletividade destas drogas ao alvo.

[015] A possibilidade do uso de substâncias que impeçam essa etapa crucial durante a interação *Paracoccidioides*-hospedeiro são de grande importância para evitar a infecção por *Paracoccidioides*. Nesse sentido, os peptídeos apresentados na presente invenção possuem essa característica que no futuro poderá ser utilizado como uma



possível vacina e também, em associação com drogas antifúngicas já conhecidas e melhorar a seletividade do alvo, reduzindo assim a toxicidade destas drogas.

#### BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[016] A presente invenção refere-se a peptídeos antiadesão de *Paracoccidioides spp.* e uso dos mesmos na terapia profilática da micose sistêmica paracoccidioidomicose ou na associação com drogas antifúngicas para melhorar a seletividade destas drogas ao alvo. A identificação de adesinas e moléculas alvo utilizadas pelo patógeno durante sua interação com estruturas do hospedeiro nas diferentes espécies de *Paracoccidioides* foi realizada utilizando a técnica de *Phage Display*. Para tal propósito, uma biblioteca de fagos apresentando grande diversidade de peptídeos foi utilizada para a seleção de peptídeos capazes de se ligarem a células de *Paracoccidioides* utilizando a técnica "*Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands (BRASIL)*" através de três rodadas de seleção. Através desta técnica 4 peptídeos foram selecionados por sua capacidade de ligação às células de *Paracoccidioides* (Pep1: LVGRVV; Pep2: LDFVVG; Pep3: CSVSALGGAC; Pep4: VVAGSV), e quando ligados a diferentes isolados do fungo foram capazes de inibir em até 60% a adesão do patógeno a quatro diferentes componentes da matriz extracelular (laminina, fibronectina e colágenos tipo I e IV) e à cultura de pneumócitos A549. Esses peptídeos não apresentam atividade citotóxica em duas linhagens celulares, A549 e HepG2. Os resultados obtidos demonstram a potencialidade destes quatro peptídeos como moléculas importantes na profilaxia e na terapia da PCM.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[017] A Figura 1 representa graficamente o número de unidades transdutoras após a segunda rodada do *Phage Display*.

[018] A Figura 2 representa graficamente o número de unidades transdutoras após a terceira rodada do *Phage Display*.

[019] A Figura 3 representa graficamente o enriquecimento das bibliotecas X6 e CX8C após as 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> rodadas do *Phage Display*.

[020] A Figura 4 mostra o gel representativo dos resultados da PCR das colônias.

[021] A Figura 5 representa graficamente o ensaio de ligação do Pep1 aos diferentes isolados de *S. cerevisiae* e *Paracoccidioides* spp. Fd) Fago selvagem. \* diferença estatística em relação à ligação do fago selvagem Fd <sup>Δ</sup> diferença estatística em relação á ligação do peptídeo à *S. cerevisiae*.

[022] A Figura 6 representa graficamente o ensaio de ligação do Pep2 aos diferentes isolados de *S. cerevisiae* e *Paracoccidioides* spp. Fd) Fago selvagem. \* diferença estatística em relação à ligação do fago selvagem Fd <sup>Δ</sup> diferença estatística em relação á ligação do peptídeo à *S. cerevisiae*.

[023] A Figura 7 representa graficamente o ensaio de ligação do Pep3 aos diferentes isolados de *S. cerevisiae* e *Paracoccidioides* spp. Fd) Fago selvagem. \* diferença estatística em relação à ligação do fago selvagem Fd <sup>Δ</sup> diferença estatística em relação á ligação do peptídeo à *S. cerevisiae*.

[024] A Figura 8 representa graficamente o ensaio de ligação do Pep4 aos diferentes isolados de *S. cerevisiae* e *Paracoccidioides* spp. Fd) Fago selvagem. \* diferença estatística em relação à ligação do fago selvagem Fd <sup>Δ</sup> diferença estatística em relação á ligação do peptídeo à *S. cerevisiae*.

[025] A Figura 9 representa graficamente o ensaio de inibição da adesão pelo Pep1 dos diferentes isolados *Paracoccidioides* spp. frente aos componentes da MEC, determinado pelo método de inib-ELISA. Lm-laminina; Fn-fibronectina; CI-colágeno I; CIV-colágeno IV.

[026] A Figura 10 representa graficamente o ensaio de inibição da adesão pelo Pep2 dos diferentes isolados *Paracoccidioides* spp. frente aos componentes da MEC, determinado pelo método de inib-ELISA. Lm-laminina; Fn-fibronectina; CI-colágeno I; CIV-colágeno IV.

[027] A Figura 11 representa graficamente o ensaio de inibição da adesão pelo Pep3 dos diferentes isolados *Paracoccidioides* spp. frente aos componentes da MEC, determinado pelo método de inib-ELISA. Lm-laminina; Fn-fibronectina; CI-colágeno I; CIV-colágeno IV.

[028] A Figura 12 representa graficamente o ensaio de inibição da adesão pelo Pep4 dos diferentes isolados *Paracoccidioides* spp. frente aos componentes da MEC, determinado pelo método de inib-ELISA. Lm-laminina; Fn-fibronectina; CI-colágeno I; CIV-colágeno IV.

[029] A Figura 13 representa graficamente o ensaio de inibição da adesão de *Paracoccidioides* spp. à cultura de pneumócitos A549 pelo método inib-ELISA - A) Inibição da adesão pelo Pep1; B) Inibição da adesão pelo Pep2; C)

Inibição da adesão pelo Pep3; e D) Inibição da adesão pelo Pep4.

[030] A Figura 14 representa graficamente a viabilidade celular após tratamento de pneumócitos A549 com os peptídeos selecionados em diferentes concentrações variando de 25 a 100 µg; controle positivo = \*p<0,01.

[031] A Figura 15 representa graficamente a viabilidade celular após tratamento da linhagem HepG2 com os peptídeos selecionados em diferentes concentrações variando de 25 a 100 µg; controle positivo = \*p<0,01.

[032] A Figura 16 representa graficamente a sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com o isolado Pb01 (*P. lutzii*) após tratamento com os diferentes peptídeos selecionados por 3 horas - (A) Pep1; (B) Pep2; (C) Pep3; e (D) Pep4.

[033] A Figura 17 representa graficamente a sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com o isolado Pb01 (*P. lutzii*) após tratamento com os diferentes peptídeos selecionados por 24 horas - (A) Pep1; (B) Pep2; (C) Pep3; e (D) Pep4.

[034] A Figura 18 representa graficamente a densidade hemocitária após tratamento das larvas por (A) 3 e (B) 24 horas com os peptídeos selecionados.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[035] A presente invenção descreve o isolamento e a caracterização dos peptídeos antiadesão de *Paracoccidioides spp.*: Pep1: LVGRVV; Pep2: LDFVVG; Pep3: CSVSALGGAC; Pep4: VVAGSV, representados nas SEQ ID NO 1 a 4, respectivamente.

[036] Tais peptídeos podem ser usados na terapia

profilática da micose sistêmica paracoccidioidomicose ou na associação com drogas antifúngicas para melhorar a seletividade destas drogas ao alvo.

#### PROCEDIMENTOS

[037] Os experimentos foram realizados com diferentes isolados pertencentes às duas espécies do gênero *Paracoccidioides*, *P. brasiliensis* (isolados Pb18 e Pb02) e *P. lutzii* (isolado Pb01).

[038] O isolamento e a caracterização de adesinas nas diferentes espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* foi realizada por *Phage Display*. Para tal propósito, uma biblioteca de fagos apresentando grande diversidade de peptídeos foi utilizada para a seleção de peptídeos capazes de se ligarem a células de *Paracoccidioides*, utilizando a técnica "*Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands (BRASIL)*" através de três rodadas de seleção.

[039] As bibliotecas construídas foram do tipo X6 e CX8C (X representa qualquer aminoácido e C=cisteínas que permite criar bibliotecas cíclicas). O uso de bibliotecas lineares e cíclicas, e de diferentes tamanhos, foi empregado para aumentar a diversidade de peptídeos disponíveis para os estudos.

[040] Após todas as rodadas da técnica BRASIL, a infectividade da bactéria K91 foi testada utilizando-se para isso o fago Fd selvagem (sem inserto de peptídeo), controles negativos nos ensaios.

[041] Os peptídeos identificados foram então priorizados para: a) identificar o seu respectivo receptor; b) para validar a interação do peptídeo com os receptores

identificados. Inicialmente, os peptídeos isolados foram analisados por métodos de bioinformática, utilizando softwares disponíveis, em busca de motivos de aminoácidos presentes em mais de um dos peptídeos isolados. Os motivos identificados foram então utilizados para procurar em bancos de dados (Genbank, Embl), peptídeos com similaridade significativa com proteínas conhecidas (similaridade com a estrutura primária).

### RESULTADOS

#### Testes de Infectividade da Bactéria *E. coli* K91

[042] Antes do início dos experimentos, foram realizadas titulações em diferentes pontos de coleta para assim testar a infectividade da bactéria *E. coli* (K91) em diferentes tempos de crescimento, sendo realizados 10 pontos de coletas distantes em 30 minutos cada, sendo o primeiro em 1h30min e o último em 6h de crescimento. Os resultados estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Teste de infectividade da bactéria K91.

Amostra (tempo)	DO	TU
1h30min	0,41	$8,6 \times 10^9$
2h00min	0,71	$2,0 \times 10^{10}$
2h30min	1,16	$1,0 \times 10^{10}$
3h00min	1,52	$6,7 \times 10^9$
3h30min	1,96	$1,7 \times 10^{10}$
4h00min	2,50	$2,2 \times 10^{10}$
4h30min	2,67	$1,2 \times 10^{10}$
5h00min	3,02	$7,7 \times 10^9$
5h30min	3,37	$5,3 \times 10^9$
6h00min	3,57	$8,2 \times 10^9$

[043] Pode-se observar que a partir de 3h00min, a bactéria se encontra em ótimas condições de infectividade com as unidades transdutoras (TU) variando entre  $10^9$  e  $10^{10}$  e com a DO no valor esperado entre 1.5 e 2.0. Estes testes demonstraram que a bactéria K91 após 3 horas de crescimento já apresenta as características necessárias para a realização da técnica de *Phage Display*.

Técnica BRASIL aplicada à *Paracoccidioides brasiliensis* Pbl8

Contagem das TUs após 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> rodadas da técnica BRASIL

[044] Após as 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> rodadas, os fagos ligantes de *P. brasiliensis* foram utilizados para infectar culturas da bactéria K91 e então plaqueadas para a contagem das unidades transdutoras de colônias. Os resultados estão representados graficamente nas Figuras 1 e 2 para a 2<sup>a</sup> e a 3<sup>a</sup> rodada.

[045] As colônias resultantes destes plaqueamentos foram coletadas e armazenadas em 100 uL de PBS/Glicerol e então congeladas à -20 °C. Para cada biblioteca foram coletadas 96 colônias.

Enriquecimento das bibliotecas após as rodadas

[046] Após a terceira rodada pôde-se observar um enriquecimento das bibliotecas quando comparadas com a segunda rodada (2,3 vezes para a biblioteca X6 e 5 vezes para a biblioteca CX8C), o que era esperado para o experimento, conforme mostrado na Figura 3.

Identificação dos fagos ligantes de *P. brasiliensis*

[047] A identificação dos peptídeos expressos pelos fagos foi realizada pelo sequenciamento dos insertos

dos fagos, para tanto uma PCR foi realizada. Após a PCR, o amplicon então foi verificado em gel de agarose 2% corado com GelRed sendo possível a visualização de bandas correspondentes ao tamanho esperado, de aproximadamente 300 pb (Figura 4).

Sequenciamento e processamento dos peptídeos ligantes de *P. brasiliensis*

[048] Os produtos da PCR foram então sequenciados e para isso, primeiramente um teste para diferentes diluições das amostras foi realizado para se determinar a melhor quantidade de produto a ser usado na reação de sequenciamento, sendo que as amostras correspondentes ao amplicon sem diluição a amostras diluídas de 1:2 a 1:256 foram estudadas e os melhores resultados foram obtidos nas diluições de 1:4 a 1:64.

[049] A análise das sequências mostrou que a diluição de 1:64 foi a que apresentou melhor resultado, apresentando uma sequência de ótima qualidade. Após o teste, 96 amostras da terceira rodada da técnica BRASIL de cada biblioteca foram então diluídas e sequenciadas.

[050] Estas sequências foram primeiramente analisadas por um software, verificando assim a qualidade destas pela análise direta dos eletroferogramas gerados pelo aparelho. As sequências foram então processadas gerando-se o reverso complemento de cada uma utilizando-se o software *Reverse Complement* seguida pela tradução da sequência alvo em peptídeos para posteriores análises pelo software *Reverse Translate*.

Caracterização dos peptídeos identificados e seus receptores



[051] As sequências de peptídeos ligantes de *P. brasiliensis* foram então alinhadas utilizando-se o software *ClustalW* para então identificar sequências ou motivos dentro das sequências que se repetem sendo estas consideradas boas candidatas de moléculas com alta afinidade à parede de *P. brasiliensis*.

[052] Após esta análise quatro peptídeos foram selecionados, sendo três peptídeos provenientes da biblioteca X6 e 1 peptídeo de CX8C: Pep1, Pep2, Pep3 e Pep4 representados pela SEQ ID NO 1 a 4, respectivamente.

[053] Estas sequências candidatas foram então analisadas pelo software *Blast* identificando então possíveis proteínas às quais estas fazem parte, revelando assim possíveis novos alvos para drogas ou então alvos utilizados pelo fungo durante a interação com o hospedeiro. As análises no *Blast* foram realizadas alinhando estas sequências com o genoma humano (Tabela 2) buscando assim alvos onde o fungo pode se ligar durante a interação com o hospedeiro.

Tabela 2. Alinhamento das sequências dos peptídeos frente ao genoma humano.

Peptídeo	Resultado BLAST frente ao genoma humano	Número de acesso	Identidade
Pep1	Desmocolina 2	ABM88171.1	100%
	Cinesina 7	AAI04045.1	100%
	Transglutaminase tissular	AAB36379.1	100%
Pep2	Colágeno tipo IV, alpha 3, isoforma CRA_c	EAW71105.1	100%
	Tirosina quinase de Leucócitos, isoforma CRA_g	EAW92501.1	100%
	Tioredoxina redutase 3	AAD39929.1	100%

Pep3	Subunidade 6 do complexo proteico da membrana do retículo endoplasmático (ER membrane protein complex subunit 6)	NP_112588.1	88%
	Proteína Zinc finger 185 isoforma 6	NP_001171581.1	100%
	Dinamina	AAA02806.1	100%
Pep4	Proteína transmembrana 141	NP_116317.1	100%
	Ferroportina	AAH35893.1]	100%
	Molécula de adesão seletiva de célula endotelial	AAK51065.1	83%
	Peptidase MBTPS1	NP_003782.1	100%

[054] Quando se estudou para o alinhamento das sequências peptídicas frente ao genoma humano, pode-se ver que estes podem ser sequências presentes em algumas proteínas interessantes durante a interação *Paracoccidioides*-hospedeiro e outros patógenos. Um exemplo é o colágeno tipo IV (Pep2), como constituinte da matriz extracelular. Essa proteína é de extrema importância para a infecção de *Paracoccidioides* já que a maioria das adesinas conhecidas para este fungo é ligante de proteínas da MEC. Adesinas conhecidas de *Paracoccidioides* spp. como enolase e malato sintase são adesinas ligantes de colágeno tipo IV.

[055] Pode-se observar o alinhamento do Pep1 com a sequência de uma proteína com domínio transmembrana denominada desmocolina que pode ser um possível alvo ao qual o fungo adere antes de invadir a célula hospedeira. As desmocolinas são moléculas de adesão caderina-like dos desmossomos que atravessam as membranas plasmáticas e atingem espaço entre as células onde se associam mantendo

assim as células firmemente unidas nos tecidos, além disso, no interior das células essas proteínas associam-se aos filamentos de queratina do citoesqueleto, promovendo o firme ancoramento do desmossomo em toda a estrutura celular. A invasão de *Paracoccidioides* afeta a estrutura do citoesqueleto das células epiteliais, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina. Dados da literatura demonstram que durante a interação de *Paracoccidioides* com essas células ocorre o desarranjo dos filamentos de actina o que pode facilitar a internalização do fungo na célula hospedeira. A invasão celular pode ocorrer, uma vez que muitos microrganismos patogênicos têm a capacidade de induzir a sua internalização em células epiteliais, ativando mecanismos de fagocitose forçada, onde sinais extracelulares específicos podem estimular o rearranjo do seu citoesqueleto (actina, microtúbulos e citoqueratina), no sítio de contato com o microrganismo. Como a desmocolina é uma das proteínas com domínio transmembrana e com interação direta com a actina da célula esta pode ser uma proteína importante para o fungo se associar, causando assim um desarranjo do citoesqueleto celular facilitando assim a infecção. Ainda olhando para a estrutura do citoesqueleto da célula hospedeira, outra possível proteína identificada pelo alinhamento é a quinesina (Pepl) que é uma proteína que promove o transporte de organelas e complexos proteicos através dos microtúbulos do citoesqueleto celular e estudos recentes mostram essa proteína durante a interação parasita-hospedeiro já que uma toxina produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, denominada ExoS, se liga à quinesina de células

epiteliais *in vitro* induzindo assim a citotoxicidade, contribuindo para o sucesso do hospedeiro no processo infeccioso.

[056] Outra proteína que também possui a sequência dos peptídeos encontradas no alinhamento foi a dinamina (Pep3). Avanços recentes no estudo da interação *Paracoccidioides*-hospedeiro, demonstram que durante essa interação o fungo acaba desencadeando a ativação da via endocítica na célula hospedeira através de proteínas que o fungo tem na sua parede o que acaba levando também ao aumento da expressão de proteínas envolvidas no transporte de vesículas que podem estar carreando para dentro da célula proteínas secretadas pelo fungo que facilitariam sua "estadia" no interior da célula hospedeira. A dinamina possui papel crítico na fissão da membrana durante o processo de endocitose mediada por clatrininas. Durante a interação de espécies de *Candida* com o hospedeiro o fungo é capaz de induzir a endocitose mediada por clatrininas sendo essa indução realizada através da expressão de invasinas que quando liberadas pelo fungo estimulam o recrutamento de dinamina, além de clatrininas e coractinas para o sítio onde a *Candida* invade as células epiteliais. Igualmente em *P.brasiliensis* verificou-se que a clatrina pode ter papel fundamental no início da infecção.

[057] *Paracoccidioides* spp. são considerados fungos intracelulares facultativos e por isso a adesão torna-se muito importante, sendo que o fungo além de expressar as adesinas deve se ligar a estruturas e proteínas da célula hospedeira que confirmam certa estabilidade para o fungo. Uma das possíveis proteínas que

o fungo pode se ligar também evidenciada pelo alinhamento é a transglutaminase tissular (Pep1). Essa proteína pode ser encontrada tanto no meio intra quanto no meio extracelular sendo que no meio extracelular ela se liga a proteínas da MEC, se ligando fortemente a fibronectina contribuindo para a estabilização da MEC, o que a torna uma proteína interessante para o fungo se ligar durante o processo infectivo, já que, além disso, é uma proteína resistente à proteólise por enzimas presentes no meio extracelular.

[058] Para que ocorra uma colonização bem sucedida do hospedeiro os microrganismos devem inicialmente aderir a tecidos alvos e concomitantemente obter nutrientes essenciais para o seu crescimento, como o ferro, que é requerido para a sobrevivência dos organismos. Dentre os possíveis alvos de ligação do fungo ao hospedeiro encontrado nesse alinhamento pode-se encontrar a proteína *Solute carrier family 40* (transportador regulado por ferro), *member 1* ou Ferroportina (Pep4), que é uma proteína transmembrana que transporta o ferro do meio intra- para o meio extracelular. A infecção por diferentes patógenos como *Leishmania*, *Salmonella enterica*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Aspergillus fumigatus*, leva a uma diminuição dos níveis de expressão da ferroportina pelo hospedeiro garantindo assim que ao invadi-lo, o parasita tenha a quantidade necessária de ferro para normalmente se desenvolver e causar a infecção, já que, em macrófagos, o aumento da expressão de ferroportina é uma estratégia para diminuir os teores de ferro intracelular fazendo com que o parasita não obtenha os níveis necessários de ferro para sua manutenção e assim dificultar o desenvolvimento do fungo conseguindo

assim matar o parasita e evitar a infecção. A possibilidade de *Paracoccidioides* se ligar a essa proteína na membrana do hospedeiro pode indicar a tentativa do parasita em obter o ferro exportado do interior da célula do hospedeiro e também a tentativa de degradar essa proteína para que os níveis de ferro no interior das células do hospedeiro sejam mantidos e assim, ao invadir as células obter o ferro necessário para sua manutenção e assim causar infecção generalizada.

[059] A análise realizada mostra potenciais alvos ao qual o fungo *Paracoccidioides* se liga durante a interação com o hospedeiro, porém estes potenciais alvos devem ser mais bem estudados.

#### Ensaio de ligação

[060] Os ensaios de ligação foram realizados para confirmar a capacidade de interação dos peptídeos selecionados a *P. brasiliensis* Pb18 (S1). Ainda este ensaio também foi realizado com outros isolados pertencentes a diferentes espécies filogenéticas, Pb02 (PS2) e Pb01 (Pb01-like). Além disso, o ensaio de ligação foi realizado com fago selvagem Fd frente a Pb18 e também com os peptídeos selecionados frente a *S. cerevisiae* que foi utilizado para fazer o *pré-clearing* das bibliotecas. A Figura 5 mostra o ensaio de ligação do Pep1 frente aos diferentes isolados. Pode-se observar que o Pep1 ligou-se com alta eficiência aos isolados Pb18 e Pb01, também se ligou ao isolado Pb02, porém em menor eficiência. Além disso, os resultados demonstraram uma ligação muito menor do Pep1 à *S. cerevisiae* sendo detectada diferença significativa entre a ligação do controle e dos testes.

[061] A Figura 6 mostra o ensaio de ligação do Pep2 frente aos diferentes isolados. Pode-se observar que o Pep2 se ligou a todos os isolados, porém com alta eficiência ao isolado Pb01. Neste caso também foi observada uma menor ligação à *S. cerevisiae*.

[062] A Figura 7 mostra o ensaio de ligação do Pep3 frente aos diferentes isolados. Pode-se observar que o Pep3 se ligou a todos os isolados, porém com alta eficiência ao isolado Pb18. Diferente dos Pep 1 e 2, o Pep3 também se ligou com alta eficiência ao isolado Pb02 e com menor, apesar de alta, eficiência ao isolado Pb01. Neste caso também foi observada uma menor ligação à *S. cerevisiae*.

[063] A Figura 8 mostra o ensaio de ligação do Pep4 frente aos diferentes isolados. Pode-se observar que o Pep4 se ligou a todos os isolados, porém com alta eficiência ao isolado Pb18, seguido pelo isolado Pb01. Apesar de se ligar com menor eficiência, também se ligou fortemente ao isolado Pb02. Neste caso também foi observada uma menor ligação à *S. cerevisiae*.

[064] Os resultados obtidos no ensaio de ligação mostram que a técnica de *Phage Display* resultou na seleção de quatro peptídeos que possuem uma eficiência muito grande a parede não só do isolado Pb18, porém também dos isolados Pb02 e Pb01. A técnica se mostrou de grande valia para o uso na prospecção de ligantes da superfície de diferentes espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides*.

Ensaio de inibição da adesão de *Paracoccidioides* aos componentes da matriz extracelular através do teste de inib-ELISA

[065] Os ensaios de inibição foram realizados para avaliar a capacidade dos peptídeos selecionados de inibir a adesão de *Paracoccidioides* aos componentes da MEC. Os ensaios foram realizados para quatro diferentes componentes da MEC (laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV) e os resultados estão demonstrados nas Figuras 9 a 12 que representam a capacidade de inibição da adesão dos peptídeos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

[066] A Figura 9 mostra a inibição da adesão aos componentes da MEC pelo Pep1 por ELISA de inibição. Os resultados demonstram que este peptídeo inibiu a adesão a todos os componentes da MEC. Pode-se destacar a inibição à ligação de todos os isolados a fibronectina e para os isolados Pb01 e Pb02 houve grande inibição da adesão também à laminina sendo que as taxas de inibição foram superiores a 50%.

[067] A Figura 10 mostra a inibição da adesão aos componentes da MEC pelo Pep2. Os resultados demonstram que este peptídeo também inibiu a adesão a todos os componentes da MEC. Pode-se destacar a inibição à ligação de todos os isolados a fibronectina e colágeno tipo I. As taxas de inibição foram superiores a 25% sendo maior que 30% para o isolado Pb18 frente ao colágeno tipo I.

[068] A Figura 11 mostra a inibição da adesão aos componentes da MEC pelo Pep3. Os resultados demonstram que este peptídeo também inibiu a adesão a todos os componentes da MEC, porém pode-se destacar a inibição à ligação de todos os isolados a laminina que foi maior que 35%.

[069] A Figura 12 mostra a inibição da adesão aos componentes da MEC pelo Pep4. Os resultados demonstram que



este peptídeo também inibiu a adesão a todos os componentes da MEC, porém pode-se destacar a inibição à ligação de todos os isolados a laminina que foi maior que 50% para o isolado Pb18 e cerca de 40% para os outros isolados.

Ensaio de inibição da adesão de *Paracoccidioides* à pneumócitos A549

[070] Estes ensaios foram realizados para avaliar a capacidade dos peptídeos selecionados de inibir a adesão de *Paracoccidioides* a pneumócitos A549 e os resultados mostraram que os quatro peptídeos selecionados foram capazes de inibir a adesão dos fungos do gênero *Paracoccidioides*, com valores de inibição acima de 40% (Figura 13).

[071] O desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas tem se tornado cada vez mais desafiador principalmente pela problemática da sempre crescente resistência, o que leva a uma busca por novos agentes antimicrobianos que possuam mecanismos diferentes dos conhecidos que possam efetivamente combater infecções e não contribuir para a resistência dos patógenos dificultando assim a terapia. Como já discutido anteriormente, o primeiro passo na infecção por *Paracoccidioides* é a adesão do fungo à célula hospedeira sendo que a habilidade do patógeno em colonizar e invadir os tecidos do hospedeiro é estritamente dependente deste primeiro passo. Neste sentido o uso de moléculas que interferem na adesão dos patógenos, denominada terapia antiadesão, surge como uma maneira eficiente para prevenir infecções. Os mecanismos destes potenciais agentes terapêuticos incluem a inibição das adesinas e de seus receptores no hospedeiro, vacinação com

adesinas ou análogos, uso de probióticos e suplementos alimentares que interferem na interação receptor-adesina e manipulação de interações hidrofóbicas.

[072] Os peptídeos selecionados através do *Phage Display* (Pep1, Pep2, Pep3 e Pep4) promoveram a inibição da ligação de *Paracoccidioides* (todos os isolados testados) aos diferentes componentes da MEC (laminina, fibronectina, colágeno I e colágeno IV) e a pneumócitos A549. Esses resultados são bastante promissores, pois, através da sequência desses peptídeos, pode-se direcionar o estudo para um melhor entendimento da interação patógeno hospedeiro, uma vez que conhecendo as peculiaridades do bloqueio de ligação a cada componente da MEC e a pneumócitos em diferentes isolados de *Paracoccidioides* podem-se rastrear moléculas semelhantes aplicáveis à profilaxia e terapêutica da PCM. Até recentemente, tecnologias baseadas na metodologia de *Phage Display* foram usadas principalmente para produzir anticorpos monoclonais dirigidos contra diferentes alvos, principalmente, com atividade antineoplásica e anti-inflamatória. Hoje, porém, esta ferramenta mostra-se poderosa para a seleção de novos peptídeos e desenvolvimento de anticorpos que se pode ligar a uma grande variedade de antígenos e se constitui em uma nova ferramenta para descoberta de moléculas anti-infecciosas.

#### Determinação da atividade antifúngica dos peptídeos selecionados

[073] O potencial como antifúngico dos 4 peptídeos selecionados foi avaliado através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados

demonstraram que os peptídeos selecionados não têm a capacidade de matar ou de inibir o crescimento dos diferentes isolados de *Paracoccidioides* spp. avaliados (Tabela 3).

Tabela 3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos desenvolvidos a partir da metodologia de Phage Display frente a *Paracoccidioides* spp.

Peptídeos	CIM para os diferentes isolados de <i>Paracoccidioides</i>		
	Pb18	Pb01	Pb02
<b>Pep1</b>	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)
<b>Pep2</b>	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)
<b>Pep3</b>	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)
<b>Pep4</b>	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)

Determinação da atividade citotóxica dos peptídeos selecionados por teste de sensibilidade do MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo)

[074] O teste de viabilidade foi realizado para analisar se os peptídeos selecionados têm atividade citotóxica em duas diferentes linhagens celulares: pneumócitos A549 e HepG2 e os resultados estão demonstrados nas Figuras 14 e 15, e podemos observar que os peptídeos selecionados têm pouca atividade citotóxica, sendo que a porcentagem de células viáveis se manteve acima de 60% em todas as concentrações testadas.

Ensaio preliminares in vivo usando *Galleria mellonella* como modelo

[075] Estes ensaios foram realizados com o objetivo de avaliar a capacidade dos peptídeos selecionados em evitar a infecção de *Paracoccidioides* spp. em larvas de *Galleria mellonella*.

[076] As larvas de *G. mellonella* estão sendo crescentemente usadas como um modelo de infecção para o estudo de fatores de virulência e patogênese de muitos patógenos fúngicos e bacterianos.

[077] A hemolinfa de *Galleria* é formada por diferentes tipos de hemócitos que atuam na defesa contra patógenos fúngicos. A densidade hemocitária e a sobrevivência de *Galleria* são indicadores de patogenicidade, sendo que fungos não patogênicos resultam em altos níveis de hemócitos, enquanto patogênicos resultam na redução dos níveis de hemócitos, mostrando um efeito semelhante a uma imunossupressão importante dos fungos patogênicos.

#### Toxicidade dos peptídeos selecionados em *Galleria mellonella*

[078] A toxicidade dos peptídeos selecionados foi avaliada também nas larvas de *Galleria mellonella*, sendo testadas diferentes concentrações dos peptídeos (2, 8, 50, 100, 200 e 400 ug/larva). Após o tratamento a sobrevivência das larvas foi observada por 07 dias e pôde-se observar que nas concentrações testadas, nenhuma larva morreu, demonstrando que os peptídeos não foram tóxicos para as larvas, dando a segurança necessária para a interpretação dos resultados a serem obtidos com o objetivo de avaliar a capacidade destes peptídeos em evitar a infecção de *Paracoccidioides* spp. nas larvas. Além disso, esses

resultados somam-se aos testes *in vitro* onde também se observou que os peptídeos apresentaram baixa toxicidade para duas linhagens celulares testadas, A549 e HepG2.

Capacidade dos peptídeos selecionados de evitar a infecção por *Paracoccidioides spp.*

[079] Com a constatação de que os peptídeos não eram tóxicos para as larvas de *G. mellonella* passou-se a avaliação da capacidade dos peptídeos evitarem a infecção das larvas por *Paracoccidioides*. Para tanto, as larvas foram tratadas com 100 µg de cada peptídeo separadamente por 03 e 24 horas, seguido da inoculação dos isolados Pb01 (*P. lutzii*) em uma concentração de inóculo de  $5 \times 10^6$  céls/mL e então a sobrevivência das larvas observadas durante 07 dias (Figuras 16 e 17).

[080] Para o tratamento da PCM sugere-se o itraconazol como a opção terapêutica que permitiria o controle das formas leves e moderadas da doença em menor período de tempo, também a combinação sulfametoxazol-trimetoprim é a alternativa mais utilizada na terapêutica ambulatorial dos pacientes com PCM. Pacientes com formas graves, necessitando internação hospitalar, devem receber anfotericina B ou associação sulfametoxazol-trimetoprim por via intravenosa. A duração do tratamento relaciona-se à gravidade da doença e ao tipo de droga utilizada. Usualmente, o tratamento é de longa duração, para permitir o controle das manifestações clínicas da micose e evitar as recaídas, porém as recaídas são comuns na PCM. Além disso, sabe-se da importância na busca por novos agentes antifúngicos desde que o arsenal disponível ainda é limitado e a maioria possui alta toxicidade.

[081] Neste sentido, a busca por novos agentes que inovem o mecanismo de ação são de extrema importância e urgência para o tratamento da PCM assim como para o tratamento das demais micoses sistêmicas.

[082] Como discutido anteriormente, a adesão é um processo de extrema importância para o estabelecimento de *Paracoccidioides* no hospedeiro e em termos inovadores, dificultar a adesão do fungo às células hospedeiras pode ser uma forma eficiente no auxílio ao combate da infecção, sendo que, impossibilitado de aderir, o fungo ficará impedido de colonizar diferentes tecidos do hospedeiro, a aquisição de nutrientes será dificultada, o que consequentemente resultará numa maior facilidade do sistema imune do hospedeiro combater essa infecção. Esse tipo de terapia, denominada terapia antiadesão, pode ser uma forma eficiente de aumentar a eficácia do tratamento da PCM.

[083] Para o isolado Pb01 de *P. lutzii* pôde-se observar que quando as larvas foram tratadas com todos os peptídeos, tanto por 03 como 24 horas, a curva de sobrevivência sofreu uma modificação, alterando, de forma significativa o tempo em que as larvas levaram para morrer. Porém quando foi realizado o tratamento por 3 horas antes da infecção pôde-se observar que a morte das larvas começa a ocorrer no quarto dia de infecção, enquanto o tratamento realizado 24 horas antes da infecção começou a observar a morte das larvas no terceiro dia de infecção. Acredita-se que isso ocorra, pois, provavelmente, a disponibilidade destes peptídeos para se ligarem ao fungo durante a infecção deve ser maior quando inoculados 03 horas antes da infecção, e com isso, estes peptídeos livres na larva se

ligam à parede do fungo dificultando assim a adesão às células do hospedeiro, o que pode refletir na capacidade deste fungo em causar infecção e levar as larvas à morte, evidenciando assim que estes peptídeos têm potencial como agentes de terapia antiadesão e esta relação peptídeos-fungo-hospedeiro deve ser mais bem investigada. Deve-se destacar o Pep4, que após 03 horas de tratamento apresentou a taxa de sobrevivência de 60% indicando que para esta espécie este peptídeo tem a capacidade de evitar eficazmente a infecção, protegendo assim o hospedeiro.

[084] Apesar do tempo de sobrevivência ser menor nas larvas tratadas com os peptídeos por 24 horas, pode-se observar que há uma diferença significativa na taxa de sobrevivência quando comparada com o controle sem tratamento, indicando que, após as 24 horas de tratamento os peptídeos estão agindo dificultando assim a infecção do fungo.

[085] O uso das larvas de *G. mellonella* demonstra uma segurança para a realização destes testes em modelos murinos, já que os resultados aqui apresentados, apesar de preliminares, sugerem que estes peptídeos são moléculas com potencial capacidade de interferir na interação *Paracoccidioides*-hospedeiro, sendo de uso potencial em novas terapias antiadesão ou como adjuvantes às terapias já estabelecida para a PCM.

#### Determinação da densidade hemocitária

[086] Como uma forma de entender o efeito dos peptídeos sobre a fisiologia de *G. mellonella* avaliou-se a densidade hemocitária das larvas que representam as células do sistema imune do hospedeiro. Para tanto, após 03 e 24

horas de tratamento das larvas com os peptídeos, a hemolinfa das larvas foi coletada e então o número de células determinado (Figura 18).

[087] A estimulação da resposta imune para evitar efeitos indesejáveis causados pela doença e a redução da carga fúngica são objetivos a serem buscados para um tratamento efetivo de casos severos de PCM.

[088] A cavidade corpórea da larva *G. mellonella* contém hemolinfa, que tem função análoga ao sangue nos mamíferos, transportando nutrientes e moléculas de sinalização, além de participar na respiração. Adicionalmente, a hemolinfa contém células (hemócitos) e peptídeos antimicrobianos capazes de imobilizar e matar microrganismos invasores. Em estudo já realizado, quando larvas foram infectadas com isolados de alta patogenicidade (isolados capazes de matar >80% de larvas infectadas) resultava em uma significativa redução na densidade hemocitária, por outro lado, larvas infectadas com isolados com baixa patogenicidade (isolados capazes de matar <20% de larvas infectadas) resultava em uma pequena flutuação no número de hemócitos, indicando que a densidade hemocitária esta diretamente relacionada com a patogenicidade dos isolados. Esta mesma observação já foi feita para diferentes isolados de *Paracoccidioides*.

[089] Os resultados encontrados nos experimentos da presente invenção de avaliação da densidade hemocitária das larvas após o tratamento com os diferentes peptídeos mostram que de alguma forma estes estão modulando o sistema imunológico da larva causando uma resposta na maior produção de hemócitos o que parece provocar um efeito



protetor no hospedeiro, e isso, pode resultar na proteção contra a infecção de *Paracoccidioides spp.* mostrando que estes peptídeos podem além de funcionar como moléculas antiadesão, eles também podem estimular o sistema imune do hospedeiro contra a infecção pelo fungo.

[090] Avanços na terapia da PCM indicam que os resultados preliminares encontrados nessa invenção são animadores e que se deve focar o estudo do papel desses peptídeos na prevenção e tratamento da PCM. Estudos com modelos murinos são necessários para se estabelecer o tipo de resposta que a imunização com estes peptídeos pode causar no hospedeiro e qual curso tomará a infecção em camundongos tratados com os diferentes peptídeos e, além disso, estudos focados nos efeitos da imunização com os peptídeos seguido dos tratamentos conhecidos da doença. O estudo com *G. mellonella* mostra de forma preliminar que é válido o investimento nesses estudos já que estes foram capazes de aumentar a taxa de sobrevivência das larvas e ainda provocar um aumento na quantidade de hemócitos demonstrando assim a modulação do sistema imune da larva após o tratamento.

### **Reivindicações**

1. Peptídeos antiadesão de *Paracoccidioides spp.*  
**CARACTERIZADOS POR** compreenderem as sequências nucleotídicas representadas nas SEQ ID NO 1 a 4.

2. Uso dos peptídeos antiadesão de *Paracoccidioides spp.*, conforme definidos na reivindicação 1, **CARACTERIZADO POR** ser na terapia profilática da micose sistêmica paracoccidioidomicose ou na associação com drogas antifúngicas para melhorar a seletividade destas drogas ao alvo.

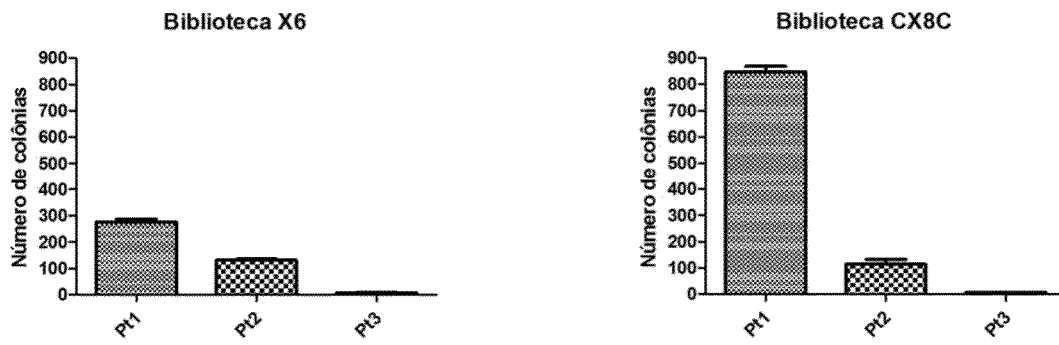


Figura 1

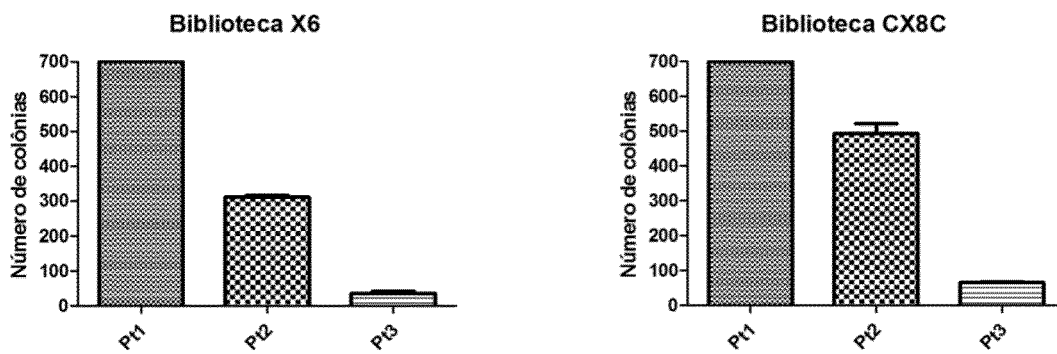


Figura 2

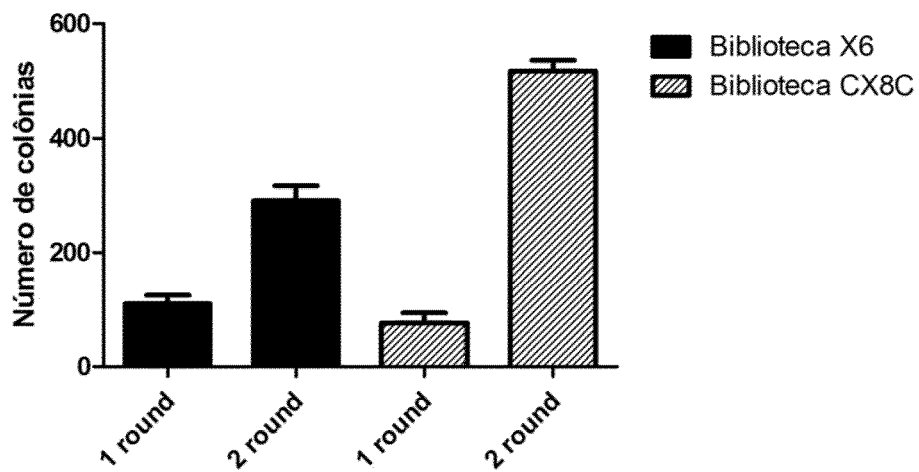


Figura 3

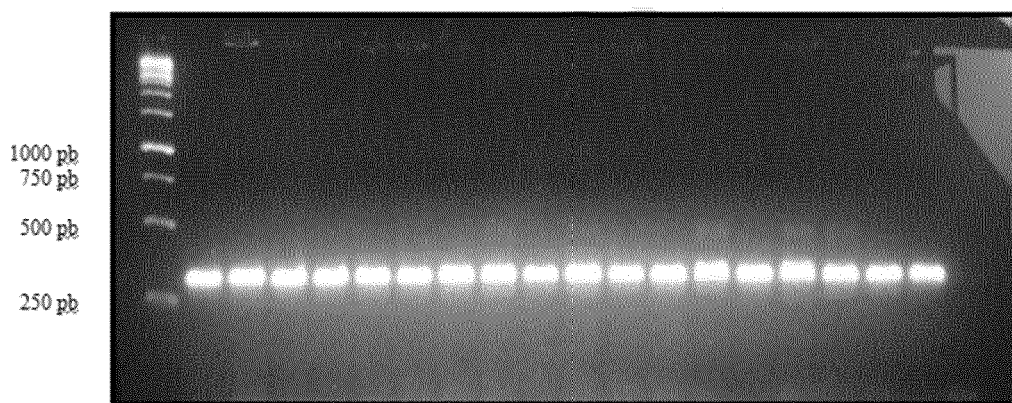


Figura 4

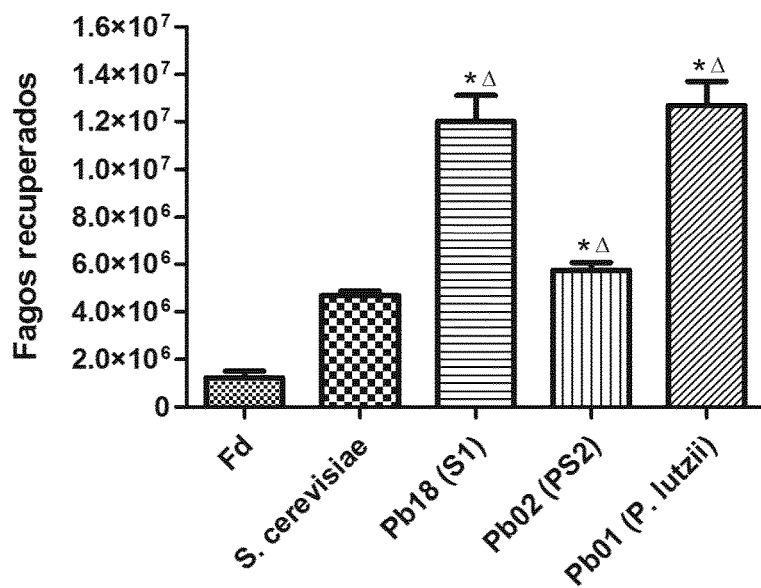


Figura 5

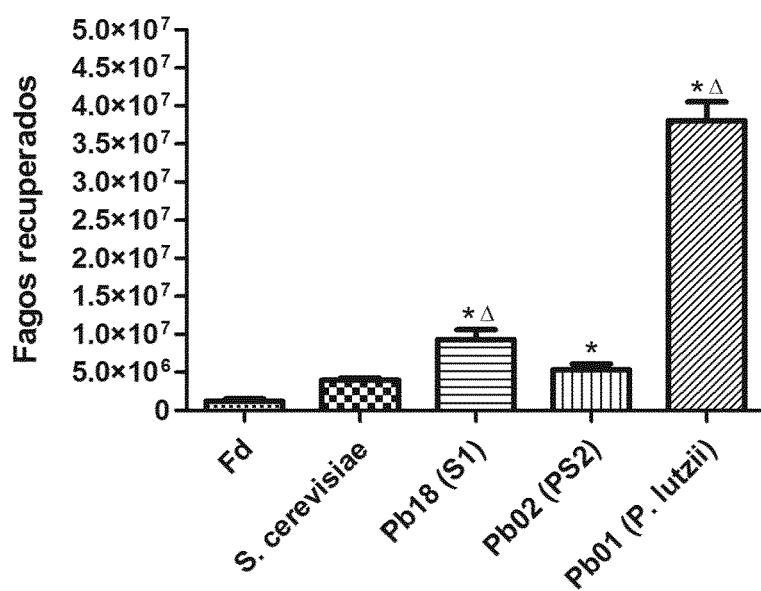


Figura 6

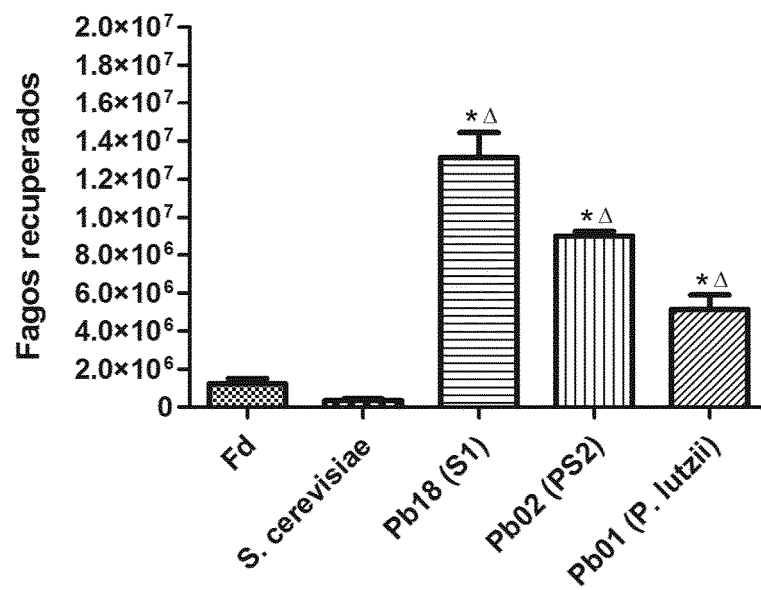


Figura 7

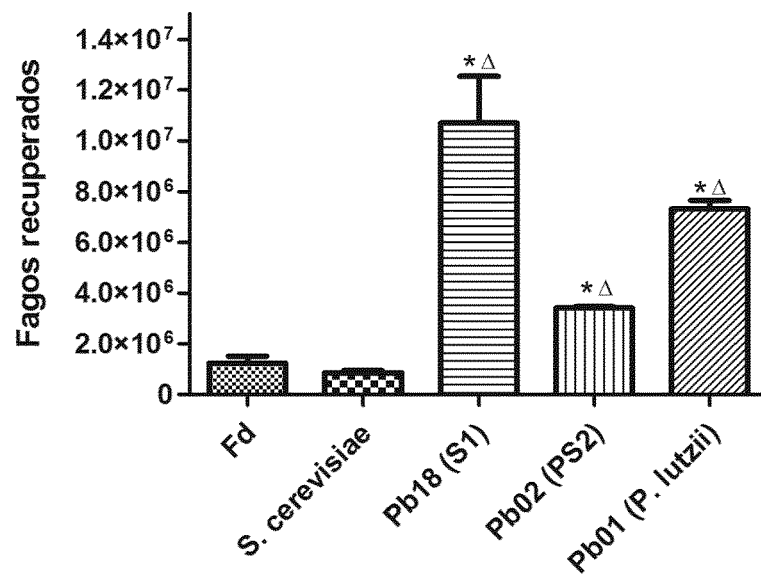


Figura 8

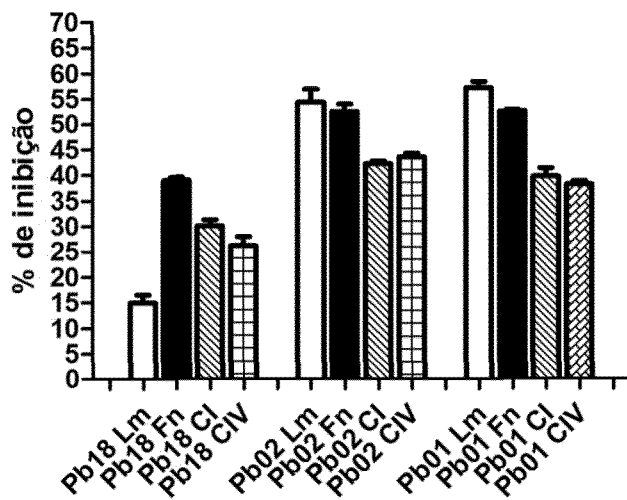


Figura 9

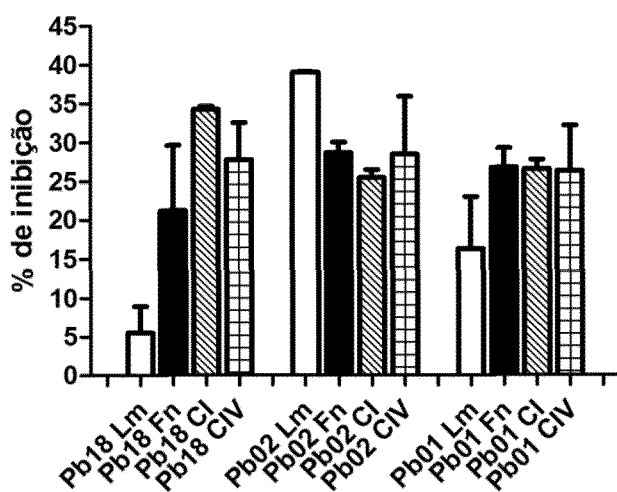


Figura 10

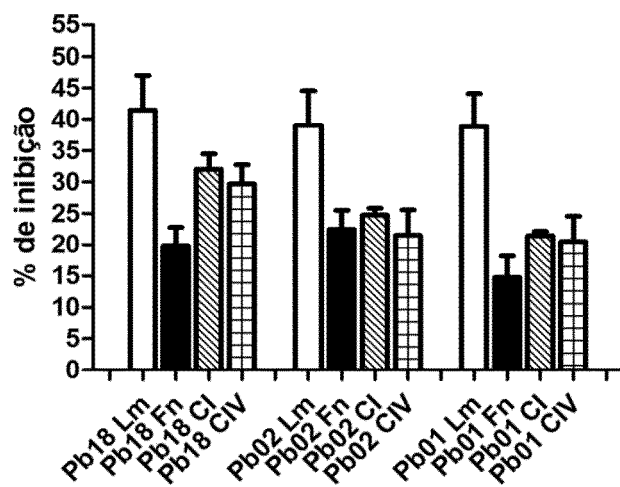


Figura 11

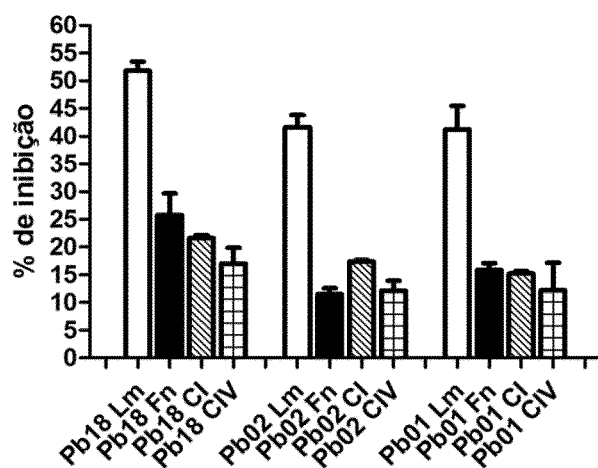


Figura 12



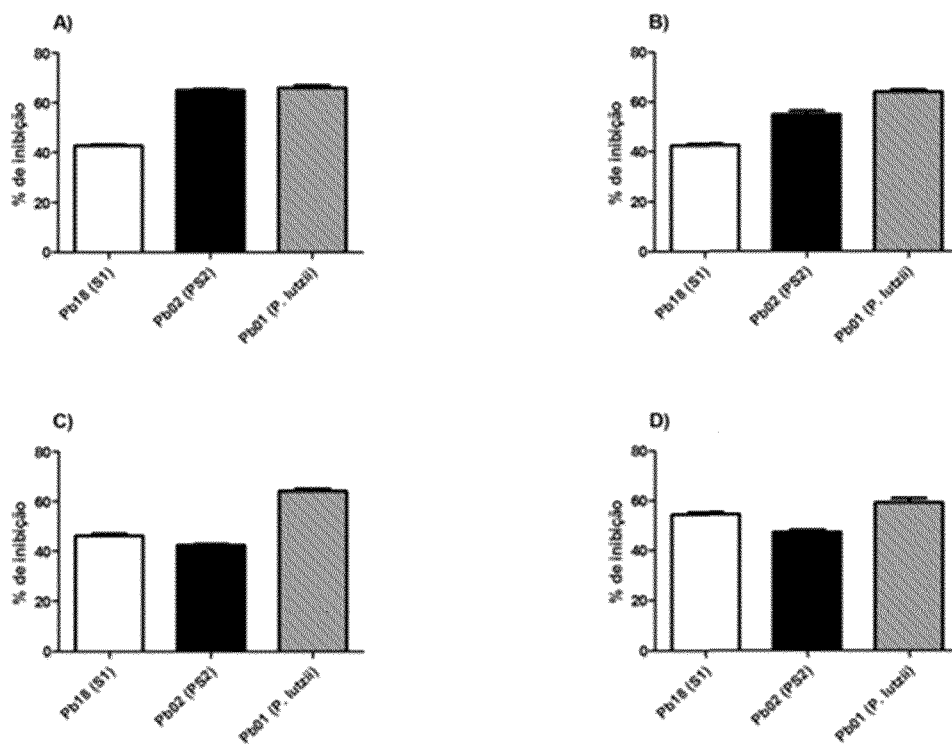


Figura 13

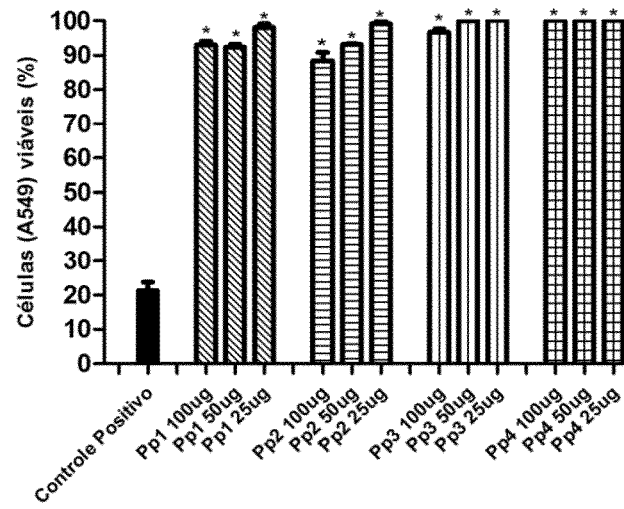


Figura 14

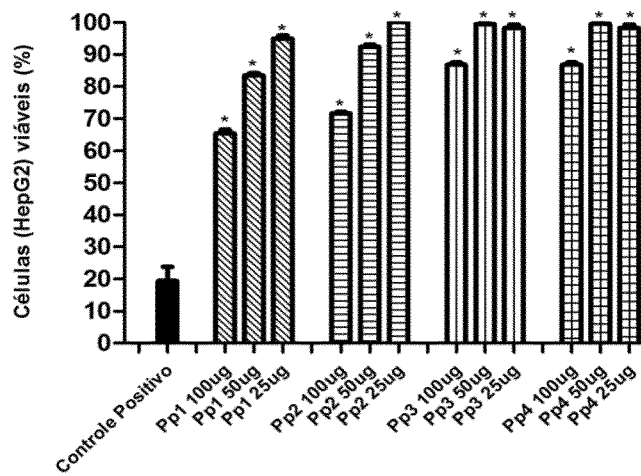


Figura 15

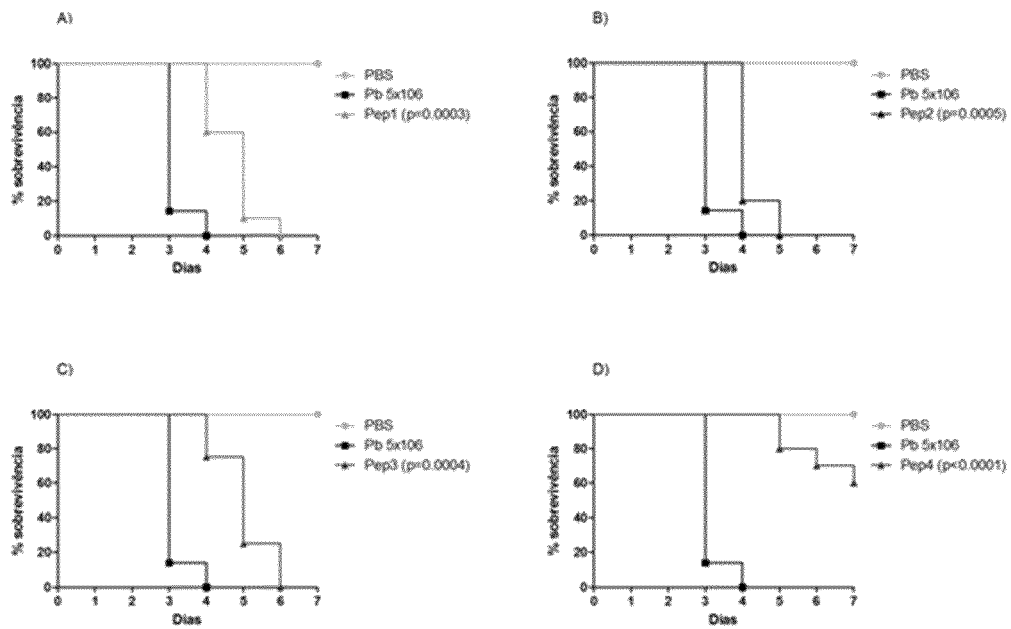


Figura 16

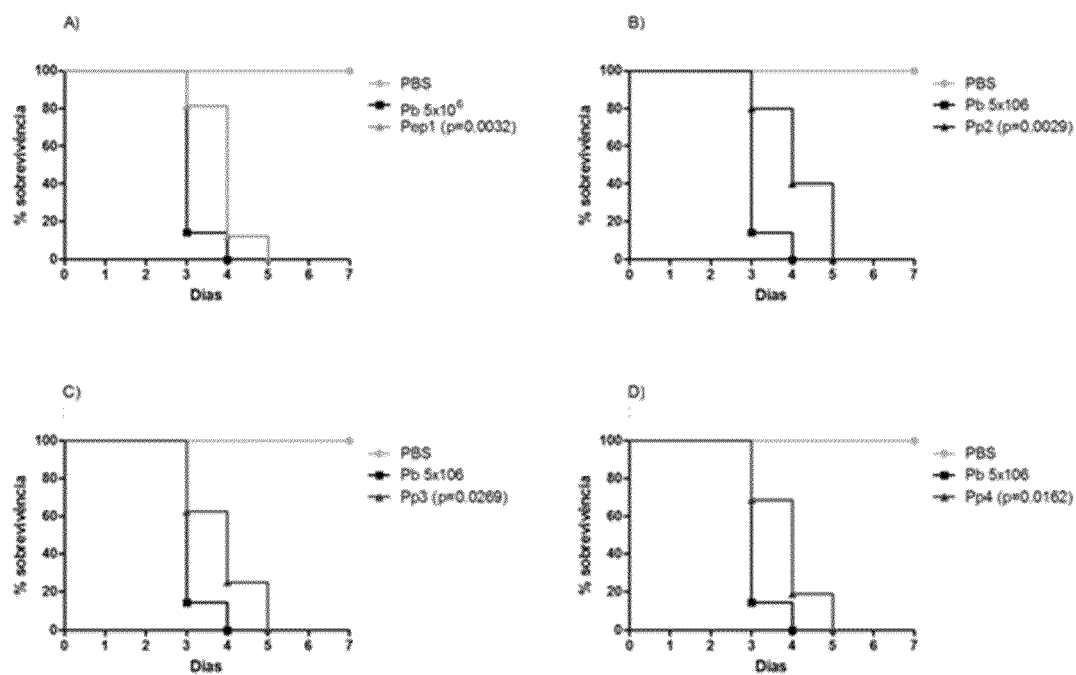


Figura 17

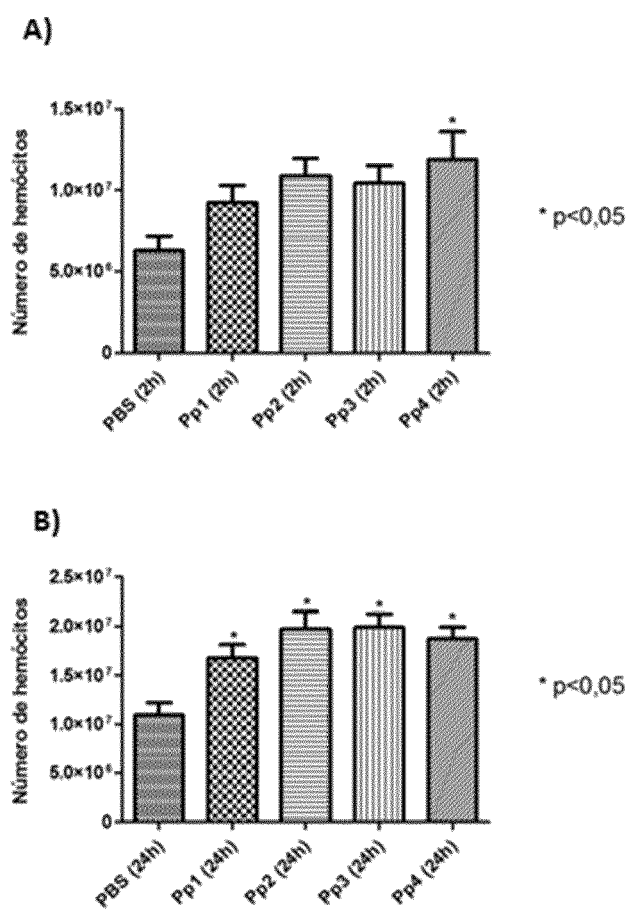


Figura 18

## Resumo

### **PEPTÍDEOS ANTIADESÃO DE *PARACOCCIDIOIDES SPP.* E USO DOS MESMOS**

A presente invenção refere-se a peptídeos antiadesão de *Paracoccidioides spp.* e uso dos mesmos na terapia profilática da micose sistêmica paracoccidioidomicose ou na associação com drogas antifúngicas para melhorar a seletividade destas drogas ao alvo. A identificação de adesinas e moléculas alvo utilizadas pelo patógeno durante sua interação com estruturas do hospedeiro nas diferentes espécies de *Paracoccidioides* foi realizada utilizando a técnica de *Phage Display*. Para tal propósito, uma biblioteca de fagos apresentando grande diversidade de peptídeos foi utilizada para a seleção de peptídeos capazes de se ligarem a células de *Paracoccidioides* utilizando a técnica "Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands (BRASIL)" através de três rodadas de seleção. Através desta técnica 4 peptídeos foram selecionados por sua capacidade de ligação às células de *Paracoccidioides* (Pep1: LVGRVV; Pep2: LDFVVG; Pep3: CSVSALGGAC; Pep4: VVAGSV), e quando ligados a diferentes isolados do fungo foram capazes de inibir em até 60% a adesão do patógeno a quatro diferentes componentes da matriz extracelular (laminina, fibronectina e colágenos tipo I e IV) e à cultura de pneumócitos A549. Esses peptídeos não apresentam atividade citotóxica em duas linhagens celulares, A549 e HepG2.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

### Código de Controle

#### Campo 1



2E85CE8FA142F6EC

#### Campo 2



681202C3818B0CEE

#### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 14AUIIN038 - ST25-1-1 141222.txt
- Data de Geração do Código: 06-01-2015
- Hora de Geração do Código: 13:39:04
- Código de Controle:
  - Campo 1: 2E85CE8FA142F6EC
  - Campo 2: 681202C3818B0CEE