



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

Número do Processo: BR 10 2018 075672 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 56270217

Fax: 11 56270103

Email: auin@unesp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FORMULAÇÃO VACINAL E USO DA MESMA

Resumo: A presente invenção refere-se a uma formulação vacinal contendo uma enolase recombinante de *Sporothrix schenckii*, a qual é purificada e associada ao adjuvante hidróxido de alumínio para uso na terapia profilática da esporotricose, especialmente contra o fungo *S. brasiliensis*, considerado o mais patogênico dentro do complexo. Adicionalmente, a referida formulação pode ser usada em associação ao tratamento antifúngico convencional e potencial uso em outras micoses sistêmicas auxiliando na medicina veterinária e humana. Isso devido ao fato da formulação induzir altos títulos de anticorpos antígeno específicos contra a proteína alvo (enolase recombinante – rSsEno) e um perfil de resposta imune Th1/Th2/Th17.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Renan Padron Almeida

Numero OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 33778301896

Endereço: Rua Joaquim Antunes 819

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05415012

Telefone: 1156270570

Fax:

Email: renan.padron@unesp.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5

Nome: DEIVYS LEANDRO PORTUONDO FUENTES

CPF: 23502899827

Nacionalidade: Cubana

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Avenida Ibitinga, 406, Vila Bela Vista

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14800-045

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: auin.pi@unesp.br

Inventor 2 de 5

Nome: IRACILDA ZEPPONE CARLOS

CPF: 05403762809

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Avenida Benito Barbieri, 769, Vila Harmonia

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14802-570

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: auin.pi@unesp.br

Inventor 3 de 5

Nome: LUCAS SOUZA FERREIRA

CPF: 01244459186

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Avenida Prudente de Moraes, 1506, Centro

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14801-170

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: auin.pi@unesp.br

Inventor 4 de 5

Nome: DAMIANA TÉLLEZ MARTÍNEZ

CPF: 23721037847

Nacionalidade: Cubana

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Avenida Jorge Haddad, 44, Jd Paulistano

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14810-287

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: auin.pi@unesp.br

Inventor 5 de 5

Nome: ALEXANDER BATISTA DUHARTE

CPF: 23674464829

Nacionalidade: Cubana

Qualificação Física: Médico

Endereço: Avenida Jorge Haddad, 440, Jd Paulistano

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14810-287

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: auin.pi@unesp.br

Documentos anexados

| Tipo Anexo | Nome |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Comprovante de pagamento de GRU 200 | GRU 2 29409161811955427.pdf |
| Comprovante de pagamento de GRU 200 | 2 955427.pdf |
| Procuração | Proc e Posse 07-2018.pdf |
| Documento de Cessão | Termo de Cessão.pdf |
| Declaração Negativa de Acesso | Declaração Negativa de Acesso.pdf |
| Relatório Descritivo | Relatório Descritivo.pdf |
| Reivindicação | Reivindicação.pdf |
| Desenho | Desenhos.pdf |
| Resumo | Resumo.pdf |

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

INSTRUÇÕES:

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento. Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.

Recibo do Pagador

BANCO DO BRASIL | 001-9 | 00190.00009 02940.916188 11955.427171 1 77320000007000

Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO CPF/CNPJ: 48031918000124
RUA QUIRINO DE ANDRADE 215, SAO PAULO -SP CEP:01049010

Sacador/Avalista
Nosso-Número 29409161811955427 Nr. Documento 29409161811955427 Data de Vencimento 08/12/2018 Valor do Documento 70,00 (=) Valor Pago

Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37
RUA MAYRINK VEIGA 9 24 ANDAR ED WHITE MARTINS , RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20090910

Agência/Código do Beneficiário 2234-9 / 333028-1 Autenticação Mecânica

BANCO DO BRASIL | 001-9 | 00190.00009 02940.916188 11955.427171 1 77320000007000

Local de Pagamento **PAGÁVEL EM QUALQUER BANCO ATÉ O VENCIMENTO** Data de Vencimento 08/12/2018

Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37 Agência/Código do Beneficiário 2234-9 / 333028-1

Data do Documento 09/11/2018 Nr. Documento 29409161811955427 Espécie DOC DS Aceite N Data do Processamento 09/11/2018 Nosso-Número 29409161811955427

Uso do Banco 29409161811955427 Carteira 17 Espécie R\$ Quantidade xValor (=) Valor do Documento 70,00

Informações de Responsabilidade do Beneficiário
A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal.
O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo.
Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU n o campo Número de Referência na emissão do pagamento.
Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT
(-) Desconto/Abatimento
(+) Juros/Multa
(-) Valor Cobrado

Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO CPF/CNPJ: 48031918000124
RUA QUIRINO DE ANDRADE 215,
SAO PAULO-SP CEP:01049010

Código de Baixa Autenticação Mecânica - Ficha de Compensação

Sacador/Avalista



FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO DA UNESP Agência: 0239 Conta Corrente: 13-002549-6**DETALHE DO COMPROMISSO**

| | | | |
|--|---|---------------------------------|---------------------------|
| Convênio: | 0033-0239-004900019792 | Conta de Débito: | 0239-000430023105 |
| Tipo de Pagamento: | BLQ Outros | | |
| Código de Barras: | 00190000090294091618811955427171177320000007000 | | |
| No. compromisso banco: | 1029098000100002 | No. compromisso cliente: | 955427/DS1 1011 |
| Instituição Financeira Favorecida: | 001 - BANCO DO BRASIL S.A. | | |
| Nome/Razão Social do Beneficiário Original: | INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST | | |
| CPF/CNPJ do Beneficiário Original: | 42.521.088/0001-37 | | |
| Nome/Razão Social do Pagador Original: | UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE | | |
| CPF/CNPJ do Pagador Original: | 48.031.918/0001-24 | | |
| Nome/Razão Social do Pagador Efetivo: | FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENT | | |
| CPF/CNPJ do Pagador Efetivo: | 57.394.652/0001-75 | | |
| Valor Nominal: | 70,00 | | |
| Desc./Abat.: | 0,00 | Juros: | 0,00 |
| Data de Vencimento: | 08/12/2018 | | |
| Data de Pagamento: | 21/11/2018 | | |
| Situação: | Efetivado | | |
| No. Lista de Débito: | | No. Protocolo: | PGTFORNB21112018900133693 |
| Autenticação: | 11CBC4E087DAACC8099EE39 | | |

Valor a Pagar: 70,00[retornar](#)**Central de Atendimento
Santander Empresarial**4004-2125 (Regiões Metropolitanas)
0800 726 2125 (Demais Localidades)**SAC 0800 762 7777
Ouvidoria 0800 726 0322**[imprimir](#)

PROCURAÇÃO

Pelo presente instrumento,

a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01.049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente UNESP, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, ou quem legalmente o substitua,

nomeia e constitui seu procurador, **RENAN PADRON ALMEIDA**, brasileiro, portador do RG nº 43.746.608-5, SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 337.783.018/96,

outorgando-lhe poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Intelectual – INPI e outras instituições competentes, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de

invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópias, termos de cessão de direitos, termos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade intelectual, incluindo, mas não se limitando, aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou de licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado

Agência UNESP de Inovação

Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro

CEP. 01049-010, São Paulo/SP - Brasil

Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br

todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

São Paulo, 16 de julho de 2018.



Srg Roberto Nobre

UNESP

pl Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Reitor

SERGIO ROBERTO NOBRE
VICE-REITOR NO EXERCÍCIO DA REITORIA

9.º TABELIÃO DE NOTAS

Rua Marconi, 12 - 9.º andar - CEP 01047-000 - São Paulo
Telefone: (11) 3258-2011 - Fax: (11) 2174-6858
www.nopcartorio.com.br

Reconheço a 1 firma com valor econômico por semelhança de SERGIO ROBERTO NOBRE, do que dou fé.

Em tesº da verdade. ANDREI BARRETO DA SILVA -
São Paulo/Capital, 24 de julho de 2018. Valor recebido R\$ 9,25
Válido somente com selo de autenticidade. Selos pagos por verba



Termo de Posse e Compromisso do Professor Doutor Sandro Roberto Valentini como Reitor da UNESP

Nos dezesseis dias do mês de janeiro de dois mil e dezessete, às catorze horas e trinta minutos, no Teatro Santander, São Paulo, em sessão pública e solene do Conselho Universitário, o Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, por este ato, toma posse na função de Reitor da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com mandato de quatro anos, a contar de 15 de janeiro de 2017, conforme Decreto de nomeação de 28.11.2016, do excelentíssimo senhor Geraldo Alckmin, Governador do Estado de São Paulo, publicado no Diário Oficial do Estado de 29 de novembro de 2016 e retificado conforme publicação de 22 de dezembro de 2016. Na oportunidade, o empossado assume o compromisso de cumprir e fazer cumprir o Estatuto, o Regimento Geral e a legislação da UNESP, bem como as leis maiores do ensino no país. Para constar, foi elaborado o presente termo, assinado pelo Professor Doutor Julio Cezar Durigan, magnífico Reitor da UNESP, e pelo Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, ora empossado, São Paulo, 16 de janeiro de 2017.

[Handwritten signatures and scribbles]

9.º TFE
9.º TFE
9.º TFE

9.º TABELIÃO DE NOTAS
Rua Marconi, 124 - 1.º no 6.º andar - CEP 01047-000 - São Paulo
Telefone: (11) 3259-2611 - Fax: (11) 2174-6858
www.nonoartorio.com.br

Reconheço as 3 firmas sem valor econômico por semelhança de JULIO CEZAR DURIGAN, SANDRO ROBERTO VALENTINI, MARIA DALVA SILVA PAGOTTO. do que dou fé.

Em tes. da verdade. GUSTAVO FONTANA ANDOLPHO - São Paulo/Capital, 16 de janeiro de 2017. Valor recebido R\$ 17,10
"Válido somente com selo de autenticidade. Selos pagos por verba"

COLEGIO NOTARIAL DO BRASIL
113787
FIRMA 2
1020AA0191660

COLEGIO NOTARIAL DO BRASIL
113787
FIRMA 1
1020AA0622948

S. Paulo, 06 MAR 2017

COLEGIO NOTARIAL DO BRASIL
113787
AUTENTICACAO
1020A20395514

Artigo 1º - É declarada de utilidade pública a Associação Maestro Cuzábio Possidônio Martins, com sede em Apiaí.

Atos do Governador

DECRETO(S)

DECRETOS DE 28-11-2016

Dispensando, a pedido e a partir de 25-11-2016, João Batista Moraes de Andrade, RG 3.704.467-9, da Função de Diretor Presidente da Fundação Memorial da América Latina...

DESPACHOS DO GOVERNADOR

DESPACHOS DO GOVERNADOR, DE 28-11-2016

No processo SE-542-2016 (SG-118.809-16), sobre restabelecimento de débito: "Diante dos elementos de instrução constantes dos autos, em especial da representação do Secretário da Educação e da Cota 255-2016, da Assessoria Jurídica do Gabinete do Procurador Geral do Estado, autorizo que o restabelecimento do débito do Município de Itópolis para com o Estado, decorrente da não aprovação de contas dos adiantamentos feitos ao Convênio celebrado em 2-7-2011, exercícios 2012, 2013 e 2015, faça-se em 24 parcelas mensais e consecutivas, observadas as normas legais e regulamentares atinentes à espécie e às recomendações assinaladas no pronunciamento do órgão jurídico-consultivo."

Casa Civil

GABINETE DO SECRETÁRIO

Despacho do Secretário, de 23-11-2016. No processo CC 34660-2016, em que é interessada Casa Civil, sobre pagamento por indenização à Empresa Armazen Turístico e Eventos-ME, devido a fornecimento de refeições não constantes em contrato inicialmente celebrado.

Governo

FUNDO SOCIAL DE SOLIDARIEDADE DO ESTADO DE SÃO PAULO

CHEFIA DE GABINETE

Extrato de 2º Termo de Aditamento ao Convênio Convênio FUSSESP 216/2014 - Processo FUSSESP 37236/2014. Partícipes: Fundo Social de Solidariedade do Estado de São Paulo e o Município de Burtama, por meio de seu Fundo Social de Solidariedade.

avença ora aditada, ficando restabelecido, assim, o número de turnos previsto no instrumento original de ajuste. Parágrafo Primeiro - A vista do conteúdo no "caput" desta cláusula fica retificada a cláusula primeira do aludido 1º termo de aditamento para constar que será transferido ao CONVENIEN-TE, no total, a quantia de R\$ 7.320,00. Parágrafo Segundo - Os recursos financeiros remanescentes sob a responsabilidade do FUSSESP serão transferidos ao CONVENIEN-TE de acordo com o Plano de Trabalho que integra o presente termo de aditamento, plano esse juntado às fls. 220 a 228 dos autos do Processo FUSSESP 37236/2014.

CASA MILITAR

Resolução CMIL 17-610 - CedeC, de 28-11-2016. Edita o Plano Preventivo de Defesa Civil para erosão costeira, inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanográficos extremos como ressacas do mar e marés altas. Considerando as atribuições legais consubstanciadas nos Decretos Estaduais nº 40.151, de 16-06-95 e nº 48.526, de 04-03-04, deste Secretário Chefe da Casa Militar e Coordenador Estadual de Defesa Civil.

Artigo 2º - O Plano Preventivo de Defesa Civil (PPDC) para erosão costeira, inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanográficos extremos (ressacas do mar e marés altas) tem a seguinte composição: I - Órgão Central: a Casa Militar, representada pela Coordenadoria Estadual de Defesa Civil (CEDEC); II - Órgãos Regionais: as Coordenadorias Regionais de Defesa Civil de Registro (REDECR-1), Baixada Santista (REDECR-2) e São José dos Campos e Litoral Norte (REDECR-3); III - Órgãos Setoriais: a Marinha do Brasil; o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET); o Instituto Oceanográfico (IO) da Universidade de São Paulo; o Instituto Geológico (IG); Centro de Pesquisa de Tempo e Estudos Climáticos (CPTCE); o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT); o Departamento de Ciências do Mar da Universidade Federal de São Paulo; o Centro de Estudo e Pesquisas sobre Desastres (CEPED/USP); o Corpo de Bombeiros e a Polícia Ambiental do Estado de São Paulo.

Artigo 3º - Para efeito desta resolução, seguem as seguintes considerações e conceitos: I - Eventos Meteorológicos-Oceanográficos Extremos: Marés Meteorológicos Positivos e Ressacas do Mar. Eventos associados à influência de fatores meteorológicos (ciclones extratropicais, frentes frias), oceanográficos (sobreelevação do nível do mar e ondas energéticas), astronômicos (marés de sizígia e de equinócio) e sazonais (efeito estereótipo devido ao aquecimento do oceano durante o verão). Quanto maior o número de fatores associados e os prejuízos na zona costeira, s principais perigos gerados por esses eventos na costa são: erosão costeira, inundações costeiras, enchentes e alagamentos.

Artigo 4º - O período de vigência desse plano será ininterrupto, devendo suas ações serem deflagradas conforme avisos e boletins emitidos pelos órgãos setoriais. ANEXO I Normas e procedimentos do Plano Preventivo de Defesa Civil (PPDC) para erosão costeira, inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanográficos extremos (ressacas do mar e marés altas) TÍTULO I Disposições Preliminares Artigo 1º - O Plano Preventivo de Defesa Civil (PPDC) para erosão costeira, inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanográficos extremos (ressacas do mar e marés altas), tem como objetivo principal apoiar as ações das Coordenadorias Regionais e Municipais de Defesa Civil na minimização dos efeitos desses eventos no âmbito dos quatro setores costeiros do Estado de São Paulo. Artigo 2º - O plano se baseia na adoção de medidas para conhecimento antecipado das ocorrências de eventos extremos especificados no artigo anterior, nas ações dos órgãos de defesa civil e nas edificações de Planos de Contingência para os municípios sujeitos a esses eventos.

III - Erosão costeira O resultado do conjunto de processos sedimentares que atuam na praia pode ser medido por meio do seu balanço sedimentar que, em outras palavras, a relação entre as perdas/saídas e os ganhos/entradas de sedimentos nessa praia. Quando o balanço sedimentar da praia for negativo, ou seja, quando a saída/perda de sedimentos for maior do que a entrada/ganho de sedimentos, haverá déficit sedimentar, predeterminando assim o processo erosivo. IV - Inundação costeira Submersão temporária de terrenos marginais à linha de costa oceânica e estuarina/lagunar, causada pela ocorrência de marés altas anômalas e ressacas. V - Enchentes associadas a marés altas anômalas e ressacas Submersão temporária de áreas marginais a cursos de água doce ou salobra na planície costeira, associada ao transbordamento anal fluvial/aluvial devido à ocorrência de precipitação intensa e à incapacidade de escoamento das águas para o estuário/laguna, ou o canal de maré ou a praia, pelo efeito do empilhamento de água na costa/maré alta anômala. VI - Alagamentos associados a marés altas anômalas e ressacas Alagamentos associados a marés altas anômalas e ressacas de natureza de água em ruas, calçadas ou outras infraestruturas urbanas devido à elevação da capacidade de escoamento de sistemas de drenagem urbana, em decorrência de precipitação intensa, maré alta anômala e ressaca (por galgamento sobre estruturas urbanas em áreas com erosão costeira acelerada).

VII - Vento Previsto do Quadrante Sul Durante os eventos meteorológicos-oceanográficos extremos ocorridos no quadrante sul, apresentando direções SW, SSW, S e SSE. VIII - Altura e Direção de Ondas Significativas A altura de uma onda marinha é definida como a diferença de nível entre a sua crista e o seu cavado. Como as alturas das ondas podem variar bastante, para se medir o estado do mar é utilizada a altura significativa das ondas, que corresponde à média do terço superior das ondas com maior altura registradas durante um período de tempo. TÍTULO II Do Funcionamento CAPÍTULO I Das Diretrizes Técnicas Artigo 4º - O Plano Preventivo tem como base fundamental para a erosão costeira: 1. Prevenção de condições meteorológicas associadas à elevação do nível do mar junto à costa; 2. Elevação do nível do mar prevista (altura das ondas, elevação do mar e maré astronômica); 3. Mapa de risco à erosão costeira. Parágrafo único: Para inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanográficos extremos (ressacas do mar e marés altas), o Plano tem como base: 1. Prevenção de condições meteorológicas associadas à elevação do nível do mar junto à costa; 2. Elevação do nível do mar prevista (altura das ondas, elevação do mar e maré astronômica); 3. Mapa de risco a inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por marés altas e ressacas. Artigo 5º - O Plano Preventivo para os perigos costeiros tratados nesta resolução está estruturado em 3 (três) níveis, indicando, progressivamente, a possibilidade de ocorrências de ressacas e marés altas, a saber: I - Observação: Vento previsto do quadrante sul (SSW a SSE) até 60 km/h, ondas de quadrante sul (SSW a SSE) com altura significativa inferior a 2,0 metros e elevação de maré (astronômica mais meteorológica) prevista até 1,8 metros; II - Atenção: Vento previsto do quadrante sul (SSW a SSE) entre 60 e 80 km/h, ondas de quadrante sul (SSW a SSE) com altura significativa de 2,0 a 3,0 metros ou elevação de maré (astronômica mais meteorológica) prevista entre 1,8 a 2,0 metros; III - Alerta: Vento previsto do quadrante sul (SSW a SSE) acima de 80 km/h, ondas de quadrante sul (SSW a SSE) com altura significativa acima de 3,0 metros ou elevação de maré (astronômica mais meteorológica) prevista acima de 2,0 metros. § 1º - Para cada nível estão previstos procedimentos operacionais, que visam à minimização das consequências desses eventos. CAPÍTULO II Dos Procedimentos Operacionais Artigo 6º - Os procedimentos operacionais de contingência previstos para os diferentes níveis, segundo o artigo 5º, são os seguintes: I - Nível de Observação 1) Coordenadoria Estadual de Defesa Civil (CEDEC): a) monitorar os critérios de vento e ondas do quadrante sul e elevação da maré; b) acompanhar, através das REDECS, as Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDEC) na operação dos Planos de Contingência; c) convocar, quando necessário, os órgãos envolvidos para avaliação da operação do Plano; d) emitir informações meteorológico-oceanográficas às REDECS e COMDECS. 2) Coordenadoria Regional de Defesa Civil (REDEC): a) atender à convocação da CEDEC, para reunião dos órgãos envolvidos; b) acompanhar as Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDEC) na operação dos Planos de Contingência; c) acompanhar as previsões, avisos e alertas emitidos pela CEDEC. 3) Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDECS): a) acompanhar as previsões, avisos e alertas emitidos pela CEDEC; b) elaborar e desenvolver o Plano de Contingência Municipal para os perigos costeiros associados a eventos meteorológico-oceanográficos extremos. II - Nível de Atenção 1) Coordenadoria Estadual de Defesa Civil (CEDEC) a) proceder a totalidade dos itens definidos para o nível de observação; b) convocar reunião dos órgãos envolvidos, quando da mudança do nível, se for o caso; c) registrar as informações acerca das vistas de campo efetuadas pelas Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDECS); d) comunicar o evento ao REDEC, COMDEC e órgãos de apoio, por meio de SMS e boletim meteorológico; e) comunicar ao REDEC e COMDEC, por meio de SMS a mudança de nível do Plano. 2) Coordenadoria Regional de Defesa Civil (REDEC) a) proceder a totalidade dos itens definidos para o nível de observação; b) informar à CEDEC as vistas de campo realizadas pelas COMDECS; c) proceder a totalidade dos itens definidos para o nível de observação; d) enviar alertas para a população e veículos de comunicação; e) adotar as medidas previstas nos respectivos planos de contingência municipal. III - Nível de Alerta 1) Coordenadoria Estadual de Defesa Civil (CEDEC) a) proceder a totalidade dos itens definidos para o nível de atenção; b) viabilizar os meios logísticos e operacionais suplementares às COMDEC, quando solicitados; c) comunicar ao REDEC, COMDEC e órgãos de apoio, por meio de SMS a mudança de nível do Plano. 2) Coordenadoria Regional de Defesa Civil (REDEC)

a) proceder a totalidade dos itens definidos para o nível de atenção. 3) Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDEC) a) proceder a totalidade dos itens definidos para o nível de atenção e adotar as medidas previstas nos respectivos planos de contingência municipal. TÍTULO IV Disposições Gerais Artigo 7º - O Plano Preventivo encontra-se em condições de operacionalidade e sua implantação permite às Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDEC) a adoção de ações preventivas que visam minimizar ou até eliminar as consequências advindas da ocorrência de eventos. ANEXO II Procedimentos para a elaboração do Plano de Contingência Municipal para erosão costeira, inundações costeiras e alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanográficos extremos (ressacas do mar e marés altas). Para a edição dos Planos de Contingência de erosão costeira, inundações costeiras e alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanográficos extremos (ressacas do mar e marés altas), deverão ser consideradas as seguintes ações de forma a contemplar os aspectos locais/municipais e suas peculiaridades: 1. Mapear e monitorar as áreas sujeitas aos perigos costeiros citados nesta resolução; 2. Divulgar os alertas e boletins da CEDEC para a população municipal; 3. Deslocar agentes públicos para pontos estratégicos ou de interesse, suscetíveis aos eventos dessa resolução; 4. Mobilizar as equipes de serviços públicos para locais, reparos e desobstruções; 5. Determinar a evacuação de moradores dos imóveis; 6. Definir abrigos provisórios para a população afetada; 7. Determinar o isolamento de ruas e avenidas sujeitas a inundações costeiras e enchentes/alagamentos; 8. Atualizar os dados e informações dos órgãos que compõem o sistema de contingência municipal; 9. Solicitar o apoio suplementar da CEDEC.

Planejamento e Gestão

GABINETE DO SECRETÁRIO

Extrato do 3º Termo Aditivo PROCESSO SPDR 2274/2012 CONTRATO 032/2012 - GS LOCADOR: SECRETARIA DE PLANEJAMENTO E GESTÃO LOCADOR: YUNES - PARTICIPAÇÃO, ADMINISTRAÇÃO E NEGÓCIOS LTDA. CNPJ: 03.479.283/0001-94. CLÁUSULA PRIMEIRA - DA PRORROGAÇÃO O prazo de vigência do contrato fica prorrogado por mais 01 (um) mês, de 13-11-2016 a 12-12-2016. CLÁUSULA SEGUNDA - DO VALOR E RECURSOS ORÇAMENTÁRIOS O valor total estimado do presente contrato passa a ser de R\$ 420.344,80 para o período de 01 (um) mês, para o presente exercício, onerando a classificação orçamentária 04.122.2909.5515.0000, Natureza de Despesa 33.90.39-91, Unidade de Despesa 25.01.01. CLÁUSULA TERCEIRA - DA RATIFICAÇÃO Permanecem em vigor as demais cláusulas e condições contratuais não alteradas pelo presente instrumento e que não se revelarem com o mesmo conteúdo. E, por estarem assim, justas e acertadas, firmam as partes o presente instrumento na presença de duas testemunhas, que também assinam para todos os fins e efeitos de direito. ASSINATURA: 13-11-2016

UNIDADE CENTRAL DE RECURSOS HUMANOS

Instrução Conjunta UCRH/SPPREV 04, de 25-11-2016. A Unidade Central de Recursos Humanos - UCRH, da Secretaria de Planejamento e Gestão e a São Paulo Previdência - SPPREV, em razão da edição da Lei Complementar 669, de 20-12-1991 que institui o Adicional de Local de Exercício para os servidores do Quadro do Magistério - OM, com alterações posteriores, e Lei Complementar 687, de 7 de outubro de 1992 que institui o Adicional de local de Exercício para os Servidores do Quadro de Apoio Escolar - QAE e alterações posteriores, as quais abrangem servidores inativos, expedem a presente instrução conjunta: 1 - ADICIONAL DE LOCAL DE EXERCÍCIO - QUADRO DO MAGISTÉRIO - INATIVO - Para fins de demonstração dos valores percebidos pelos servidores a título de Adicional de Local de Exercício fica estabelecido o formulário INFORMATIVO, conforme Anexo integrante dessa Instrução. 1.1 - Do formulário INFORMATIVO - ARTIGO 1º DA LC 669/91, deverão constar: 1.1.1 - Dados do órgão e unidade do servidor (Campo [1]); 1.1.2 - Dados de identificação do servidor (Campo [2]); 1.1.3 - Período(s) de recebimento da vantagem (Campo [3]); 1.1.4 - Total (em dias) correspondente ao recebimento da vantagem (Campo [4]); 1.1.5 - Coeficiente da Jornada/Carga Horária multiplicado pela UBV (Campo [5]); 1.1.6 - Valor total (Campo [6]) = Total de [4] multiplicado pelo total de [5]; 1.1.7 - Total do tempo de contribuição para a aposentadoria (em dias, conforme exemplo no rodapé do formulário) (Campo [7]); 1.1.8 - Valor total dividido pelo tempo de contribuição (Campo [8]) = Total de [6] dividido pelo total de [7]; 1.1.9 - Encargamento (Campo [9]). Deve ser preenchido com a data na qual o documento foi elaborado e a assinatura e carimbo do CHRD/R. 2 - ADICIONAL DE LOCAL DE EXERCÍCIO - QUADRO DE APOIO ESCOLAR - INATIVO - Para fins de demonstração dos valores percebidos pelos servidores a título de Adicional de Local de Exercício fica estabelecido o formulário INFORMATIVO, conforme Anexo integrante dessa instrução. 2.1 - Do formulário INFORMATIVO - ARTIGO 1º DA LC 687/92, deverão constar: 2.1.1 - Dados do órgão e unidade de servidor (Campo [1]); 2.1.2 - Dados de identificação do servidor (Campo [2]); 2.1.3 - Período(s) de recebimento da vantagem (Campo [3]); 2.1.4 - Total (em dias) correspondente ao recebimento da vantagem (Campo [4]); 2.1.5 - Coeficiente multiplicado pela UBV (Campo [5]); 2.1.6 - Valor total (Campo [6]) = Total de [4] multiplicado pelo total de [5]; 2.1.7 - Total do tempo de contribuição para a aposentadoria (em dias, conforme exemplo no rodapé do formulário) (Campo [7]); 2.1.8 - Valor total dividido pelo tempo de contribuição (Campo [8]) = Total de [6] multiplicado pelo total de [7]; 2.1.9 - Encargamento (Campo [9]). Deve ser preenchido com a data na qual o documento foi elaborado e a assinatura e carimbo do CHRD/R. 3 - Esta instrução entra em vigor na data de sua publicação, retroagindo seus efeitos à vigência das respectivas Leis Complementares. UCRH/SPPREV em 25-11-2016



TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS SOBRE PROPRIEDADE INTELECTUAL

CEDENTES: **1) Deivys Leandro Portuondo Fuentes**, cubano, divorciado, biólogo, inscrito no CPF/MF sob o nº 235.028.998-27, portador do nº de passaporte: I107493, residente na Avenida Ibitinga, 406 Casa A, Vila Bela Vista, Araraquara – SP, Cep 14800-045; **2) Iracilda Zeppone Carlos**, brasileira, casada, farmacêutica, inscrito no CPF/MF sob o nº 054.037.628-09, portador do documento de identidade RG nº 9.472.247-X-SSP, residente na Av. Benito Barbieri, nº 769, Vila Harmonia, Araraquara – SP, Cep 14802-570; **3) Lucas Souza Ferreira**, brasileiro, solteiro, farmacêutico, inscrito no CPF/MF sob o nº 012.444.591-86, portador do documento de identidade RG nº 4.685.526, residente na Av. Prudente de Moraes, nº 1506, Centro, Araraquara – SP, Cep 14801-170; **4) Damiana Téllez Martínez**, cubana, casada, engenheira química, inscrito no CPF/MF sob o nº 2.372.100.378-47, portador do documento de identidade RG nº RNE: G031341-8, residente na Avenida Jorge Haddad 44, Jardim Paulistano, Araraquara – SP, Cep 14810-287; **5) Alexander Batista Duharte**, cubano, casado, médico, inscrito no CPF/MF sob o nº 236.744.648-29, portador do documento de identidade RG nº RNE: V975198-J, residente na Avenida Jorge Haddad, n/ 440, Jardim Paulistano, Araraquara – SP, Cep 14810-287.

CESSIONÁRIA(S): 1) UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP, autarquia estadual de regime especial, criada

pela Lei nº 952 de 30 de janeiro de 1976, devidamente inscrita no CNPJ/MF sob o nº 48.031.918/0001-24, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, São Paulo (SP), CEP 01.049-010;

Pelo presente instrumento, nesta e na melhor forma de direito, os Cedentes autorizam a(s) Cessionária(s) a depositar o pedido de patente intitulado "FORMULAÇÃO VACINAL E USO DA MESMA" junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, cedendo todos os direitos patrimoniais a ele relativos na forma e para os fins do disposto na Lei 9.279 de 14 de maio de 1996 e Lei 8.666 de 21 de junho de 1993, Artigo 111, a título gratuito, sem qualquer restrição quanto à forma, tempo ou lugar, desde já ficando autorizadas quaisquer alterações que venham a ser consubstanciadas em futuras atualizações, modificações ou derivações tecnológicas.

Por ser a expressão da verdade, este documento é firmado na presença de duas testemunhas que também o assinam.

São Paulo, 29 de novembro de 2018.




Deivys Leandro Portuondo Fuentes




Iracilda Zeppone Carlos



Lucas Souza Ferreira



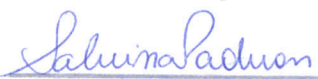
Damiana Téllez Martínez




UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA
FILHO" – UNESP
Cessionária



Alexander Batista Duharte



Testemunha
Nome: SABRINA PADUAN



Testemunha
Nome: Keyla Jantoe Bento

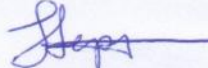
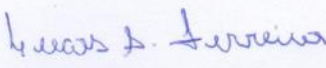




DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: FORMULAÇÃO VACINAL E USO DA MESMA
Titular: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Inventores: Deivys Leandro Portuondo Fuentes; Iracilda Zeppone Carlos; Lucas Souza Ferreira; Damiana Téllez Martínez e Alexander Batista Duharte

Nós, inventores abaixo assinados, declaramos que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

São Paulo, 29 de novembro de 2018.

| | |
|---|---|
|  Deivys Leandro Portuondo Fuentes |  Iracilda Zeppone Carlos |
|  Lucas Souza Ferreira |  Damiana Téllez Martínez |
|  Alexander Batista Duharte | |

FORMULAÇÃO VACINAL E USO DA MESMA**CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção se insere no campo da biotecnologia e descreve uma formulação vacinal compreendendo uma enolase recombinante de *Sporothrix schenckii*, a qual é purificada e associada ao adjuvante hidróxido de alumínio para uso na terapia profilática da esporotricose, especialmente contra o fungo *S. brasiliensis*, considerado o mais patogênico dentro do complexo. A referida formulação induz altos títulos de anticorpos antígeno específicos contra a proteína alvo, enolase recombinante (rSsEno) e um perfil de resposta imune Th1/Th2/Th17.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A esporotricose é uma micose de evolução subaguda e crônica de lesões nodulares cutâneas ou subcutâneas e, com menor frequência disseminada em pessoas com comprometimento imunológico (Barros *et al.*, 2011). O agente causal é um fungo dimórfico chamado *Sporothrix schenckii* o qual faz parte de um complexo de diferentes espécies (Marimon *et al.*, 2006; 2007; 2008). Casos de esporotricose têm sido reportados em todos os continentes, porém as regiões tropicais e subtropicais com alta temperatura e umidade exibem a maior incidência, principalmente na América Latina, Japão, Índia, África do Sul, China e Malásia (Tang *et al.*, 2012; Carrada-Bravo e Olveras-Macias, 2013; Zhao *et al.*, 2015). No Brasil, algumas regiões do sudeste e sul têm elevada taxa de incidência dessa micose, que é uma importante zoonose (Chakrabarti *et al.*, 2015). A infecção tanto no ser humano quanto em animais está geralmente associada à inoculação acidental na pele de

materiais contaminados com o fungo, como solo, vegetais, espinhos ou outros (Barros *et al.*, 2011; Cruz, 2013). Em 1898, Benjamin Schenck, um estudante de medicina no Hospital Johns Hopkins em Baltimore, Estados Unidos, isolou uma amostra desse fungo pela primeira vez de lesões cutâneas de um paciente de 36 anos de idade e mais tarde, o micologista Erwin F. Smith classificou-a como uma espécie relacionada ao gênero *Sporotricum* (Schenck, 1898). Dois anos depois, Hektoen e Perkins também isolaram esse agente etiológico de lesões cutâneas de outro paciente e por meio de estudos morfológicos foi classificado como *Sporothrix schenckii* (Hektoen e Perkins, 1900; Bonifaz e Vázquez, 2010).

[003] No Brasil, o primeiro caso de esporotricose em humanos foi descrito em 1907 por Lutz e Splendore e desde então um aumento considerável de casos clínicos, em particular, nos últimos 15 anos tem se evidenciado fundamentalmente no Rio de Janeiro onde a doença tem assumido proporções epidêmicas alarmantes (Rodrigues *et al.*, 2013), acometendo regiões com dificuldades socioeconômicas e ambientais (Barros *et al.*, 2010). Nesse estado brasileiro, o risco de contrair a infecção é ainda maior devido ao fato de que o gato ser a principal fonte de infecção do fungo, estando vinculado aproximadamente a 91% dos casos de esporotricose em humanos (Cruz, 2013; Freitas *et al.*, 2010, 2014). Entre os anos 1998 e 2009 o IPEC/Fiocruz diagnosticou a esporotricose em aproximadamente 2200 seres humanos e 3244 gatos. Mais recentemente a Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro analisando o banco de Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN/RJ), confirmou 830 novos casos só entre os anos 2013 e 2014, o que evidencia o aumento

progressivo da incidência (Ministério da Saúde, 2014). A Clínica Labovet, com sede no Rio de Janeiro, no período 2005 a 2012 analisando por meio de citologia e cultivo, 741 materiais coletados da superfície de lesões cutâneas ulceradas de gatos, identificou a presença de *S. schenckii* em 325 amostras, perfazendo 43,86 % do total (Cruz, 2013). Reis e colaboradores (2009) demonstraram a existência de uma semelhança genética entre cepas de *S. schenckii* isoladas das lesões cutâneas, cavidades nasais e unhas de gatos infectados e as obtidas de seus donos com a micose, confirmando que o gato é o principal transmissor da esporotricose no estado do Rio de Janeiro. Realmente a esporotricose é uma micose negligenciada e representa um problema de Saúde Pública no Brasil (Martin, 2014; Pereira et al., 2014); a grande incidência desta micose no Rio de Janeiro levou a Secretaria Estadual de Saúde deste estado a incluir a esporotricose na lista de doenças de notificação compulsória (publicado no Diário oficial da União em 16 de julho de 2013), no entanto até o momento não é possível conhecer a real incidência ou dimensionar a endemia desta doença nesse estado (Martin, 2014).

[004] A esporotricose também tem sido encontrada em Minas Gerais (de Souza Barros et al., 2013) e no estado do Rio Grande do Sul (Madrid et al., 2007), porém em menor proporção. Atualmente esta doença é a micose subcutânea mais importante que afeta os animais no estado de São Paulo. Em um estudo retrospectivo realizado no Serviço de Dermatologia de um hospital veterinário do estado de São Paulo entre janeiro de 1993 e dezembro de 2011 foi constatado que o gato, a exceção dos cães, foram os responsáveis por 45,9% da

infecção nos humanos e animais que com ele coabitavam (Rossi *et al.*, 2013). Em outro estudo mais recente, entre o mês de março de 2011 a abril de 2014 foi identificado um aumento considerável de casos de esporotricose felina nas cidades de Itaquera e Itaim Paulista, com 83 e 56 casos respectivamente (Montenegro *et al.*, 2014). Estes mesmos autores descreveram a presença de um número menor de gatos com esporotricose em outras cidades como Diadema (10 casos) e Guarulhos (17 casos), indicando a propagação da epidemia, a qual pode aumentar o risco da transmissão zoonótica nas regiões metropolitanas no estado de São Paulo.

[005] As espécies do gênero *Sporothrix*, pertencem à Divisão Ascomycota, classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales e família Ophiostomataceae (Romeo e Criseo, 2013). O fungo *S. schenckii* habita regiões tropicais, com uma temperatura média entre 20 e 25°C e umidade relativa acima de 90% (Bonifaz e Velázquez, 2010), podendo ser encontrado no solo, plantas, arbustos e materiais sob condições ambientais adequadas de temperatura e umidade (Morris-Jones, 2002). É um fungo termodimórfico que em vida saprofítica ou cultivada em ágar Sabouraud a 25°C, apresenta-se na forma filamentosa, com hifas delgadas, septadas e ramificadas com 1 a 2 µm de diâmetro e aglomerados de conídios, em forma de margarida ou crisântemo (Barros *et al.*, 2011). Em parasitismo ou quando cultivado a 37°C em meios ricos, tais como ágar infusão cérebro-coração, cresce como levedura unicelular ovalada, globosa e em forma de charuto, com 2 a 6 µm de diâmetro podendo apresentar um ou mais brotamentos (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2011).

[006] Por muito tempo pensou-se que o fungo *S. schenckii* era o único agente etiológico desta doença (Barros *et al.*, 2011; Carrada-Bravo *et al.*, 2013), porém sobre a base de estudos de sequenciamento do gene da calmodulina, características nutricionais (como assimilação de diferentes fontes de carbono) e fenotípicas (como diâmetro das colônias e morfologia dos conídios) em distintos meios de cultura e velocidade de crescimento a diferentes temperaturas, a espécie *S. schenckii* passou a ser reconhecida como um complexo de espécies crípticas, das quais *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. schenckii* *sensu stricto* são as únicas de interesse clínico (Marimon *et al.*, 2006; 2007; 2008); sendo que *S. lurei* e *S. pallida* têm sido identificadas, mas estão menos relacionadas à ocorrência de doença (Oliveira *et al.*, 2014). Essas espécies estão hoje organizadas em diferentes grupos ou Clades, a saber *S. brasiliensis* (Clade I), *S. schenckii* *sensu stricto* (Clade IIa e Clade IIb), *S. globosa* (Clade III), e *S. luriei* (Clade VI), *S. mexicana* (Clade IV) e *S. pallida* (Clade V) (Rodrigues *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014).

[007] De modo geral, a rota de infecção, a virulência da cepa e fundamentalmente o estado imunológico do hospedeiro, influenciam no aparecimento das manifestações clínicas identificadas na esporotricose (Arenas, 2005; Kong *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2013). Uma vez que o fungo penetra no organismo, ele pode permanecer restrito ao local da inoculação gerando a formação de nódulos pequenos que podem ulcerar dando origem à forma cutânea fixa (Roldán-Marín *et al.*, 2009), ou ainda pode se disseminar pelos linfonodos adjacentes desenvolvendo diferentes nódulos ao

longo dos canais linfáticos, podendo supurar, ulcerar e drenar pus correspondendo à forma linfocutânea (Vasquez-del-Mercado *et al.*, 2012), a qual é responsável por 70-80 % dos casos cutâneos de esporotricose (Vikram *et al.*, 2014).

[008] Ocasionalmente, o fungo pode disseminar-se por via hematogênica, atingindo os ossos e articulações. A doença pulmonar pela inalação de conídios é rara sendo caracterizada por tosse, febre baixa, perda de peso, linfadenite mediastinal, cavitação, fibrose e outros sinais clínicos que lembram a tuberculose (Vikram *et al.*, 2014). As formas mais graves da esporotricose têm sido associadas a pacientes alcoólatras, transplantados de órgãos, indivíduos sob corticoterapia e especialmente em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Yelverton *et al.*, 2006), o que sugere que o *S. schenckii* é um patógeno oportunista emergente (Freitas *et al.*, 2014). Aung e colaboradores (2013) relataram que de um total de 64 casos de esporotricose pulmonar primária e 22 casos de doença multifocal afetando os pulmões, 19 mortes foram reportadas, 14 das quais devidas diretamente a complicações da infecção por *S. schenckii*. Segundo os autores, essa alta taxa de mortalidade poderia estar diretamente vinculada a imunossupressão destes pacientes, à demora no diagnóstico e especialmente à ineficácia do tratamento medicamentoso.

[009] Nos gatos tem-se observado as formas clínicas cutânea, cutânea linfática e disseminada, mas são difíceis de diagnosticar. Na forma cutânea, aparecem lesões ulceradas profundas, geralmente com pus na cabeça, nos membros e na base do rabo (Lloret *et al.*, 2013., Schubach *et al.*, 2004), que costumam se generalizar rapidamente por via hematogênica

ou pela autoinoculação do fungo pelo próprio animal (Rosser *et al.*, 2006). A forma linfática pode ser clinicamente evidente, mas apenas pode ser confirmada por meio do exame histológico (Lloret *et al.*, 2013).

[010] A parede celular dos fungos é uma estrutura dinâmica que mantém o equilíbrio osmótico da célula, a proteção física contra outros microrganismos ou ainda contra a ação fagocítica das células do hospedeiro (Oda *et al.*, 1983; Latgé, 2010). A estrutura e síntese da parede celular do fungo são únicas e, muitos dos seus componentes não estão presentes nas células dos mamíferos, o que faz dela um excelente alvo para o desenvolvimento de fármacos com pouca toxicidade para os seres humanos (Bowman & Free, 2006).

[011] Nos últimos anos, tem-se focado a atenção sobre os componentes da parede celular de *S. schenckii* que possam estar envolvidos na indução da resposta imune e no processo de adesão no tecido do hospedeiro (Fierro *et al.*, 2014). Durante o curso de uma infecção, os microrganismos são capazes de se aderirem às células epiteliais, endoteliais, fatores solúveis do soro, componentes da matriz extracelular e materiais inertes implantados no corpo do hospedeiro. Essa adesão é mediada por componentes presentes na parede celular, reconhecidas como adesinas (Bernal *et al.*, 2009). As adesinas são consideradas importantes fatores de virulência usados pelos patógenos durante o processo de infecção, sendo que estão sendo testadas como potenciais antígenos em várias formulações vacinais contra doenças fúngicas, entre elas, a enolase 2 fosfo-D-glicerato hidrolase de *Candida albicans* (Li *et al.*, 2011), DAB-1 de *Blastomyces dermatitidis* (Wüthrich *et al.*, 2002), e gp43 de

Paracoccidioides brasiliensis (Travassos e Taborda, 2012).

[012] Atualmente o principal componente antigênico presente nessa porção proteica do complexo peptídico-polissacarídeo de *S. schenckii* é a glicoproteína 3-carboximuconato ciclase de 70 kDa, que se une à laminina e fibronectina (Ruiz-Baca *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2009, Castro *et al.*, 2013). Esta adesina pode apresentar-se com peso molecular variando de 55 a 73 kD e ponto isoelétrico de 4.33 a 4.85 (Rodrigues *et al.*, 2015). Recentemente foi demonstrado, que a glicoproteína de 60 kDa, previamente reportada por Ruiz-Baca e colaboradores (2011) como uma proteína imunogênica de *S. schenckii* também presente em *S. brasiliensis* (Fernandes *et al.*, 2013) é uma variante glicosilada da proteína polimórfica gp70 (Rodrigues *et al.*, 2015).

[013] A transferência passiva de um anticorpo monoclonal IgG1 (P6E7) específico contra a gp 70 em camundongos infectados com *S. schenckii* (Nascimento *et al.*, 2005, 2008) e *S. brasiliensis* (de Almeida *et al.*, 2015) gerou proteção em camundongos, confirmada pela diminuição de UFC, no baço e no fígado em relação ao grupo controle. Tal fato tem demonstrado o potencial imunogênico da gp70 e tem estimulado experimentos visando uma terapia no controle da infecção (Almeida, 2012). Visando a função das adesinas na patogênese dos fungos, Teixeira e colaboradores (2014) analisaram o genoma de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* com duas bases de dados: ProFasta (prediz proteínas da superfície celular) e FungalRV (prediz a presença de adesinas), sendo identificadas 68 e 54 proteínas de superfície celular para ambas as espécies respectivamente, e nessa ordem 61 e 63

proteínas provavelmente com funções de adesinas. Porém, outros estudos proteômicos mais aprofundados precisam ser feitos para confirmar a presença e função dessas moléculas de adesão na parede celular de ambas as espécies.

[014] A resposta imune contra os fungos requer uma adequada colaboração entre o sistema imune inato e adaptativo. As células do sistema imune inato, particularmente as células fagocíticas apresentadoras de antígenos (APCs) como dendríticas e macrófagos são capazes de reconhecer estruturas moleculares conservadas na superfície dos patógenos, PAMPs "pathogen - associated molecular patterns" por meio de receptores de reconhecimento de padrão, como os PRR "pattern recognition receptors" presentes nessas células (Abdelsadik e Trad, 2011).

[015] Os PAMPs presentes no fungo, como os carboidratos (β -glucanas), glicoproteínas (mananas), ácidos nucleicos (DNA e RNA), glicolípideos (lipopolissacarídeos), peptidoglicano, lipoproteínas e outros, são reconhecidos pelo menos por um dos receptores presentes dentre as quatro grandes famílias de PRRs, a saber: 1) receptores de lectina C (CLRs), como dectina 1, dectina 2, DC-SIGN, mincle e receptor de manose; 2) receptores semelhantes a NOD (domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeo), como o inflamassomo NALP3; 3) receptores scavenger (CD5 e CD36) e 4) fundamentalmente a família de "toll like receptor" (TLR), considerada a maior classe de reconhecimento inato em vertebrados (Netea *et al.*, 2006; Levitz, 2010, Romani, 2011). Por outro lado as opsoninas, como as imunoglobulinas, colectinas e componentes do complemento (C3bi) aumentam o repertório de reconhecimento antigênico favorecendo a

internalização e morte dos microrganismos pelos macrófagos (Stuart e Ezekowitz, 2005).

[016] De modo geral, a ativação dos PRRs desencadeia uma cascata de eventos intracelulares produzindo a ativação de moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80 e CD86 nas APCs e a produção de citocinas IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12 (Lahiri *et al.*, 2008) e quimiocinas, cuja função é modular a resposta antifúngica (Goodridge e Underhill, 2007).

[017] Alguns dos PRRs implicados no reconhecimento de *S. schenckii* têm sido abordados nos últimos anos identificando-se o papel imunoestimulante dos componentes da parede deste fungo. Por exemplo, Sassá e colaboradores (2009; 2012) utilizando camundongos C3H/HeJ deficientes no receptor TLR-4 avaliaram o papel deste receptor durante 10 semanas de infecção com *S. schenckii*. A produção de óxido nítrico (NO), TNF- α e IL-10 foi diminuída nos camundongos C3H/HeJ, demonstrando que o TLR-4 está envolvido no reconhecimento de frações lipídicas na parede celular do fungo. O receptor TLR-2 também participa no reconhecimento de componentes da parede celular de *S. schenckii*, sendo que Negrini e colaboradores (2013) demonstraram que os macrófagos obtidos de camundongos "knockout" para o receptor TLR-2 (TLR2-/-) apresentaram diminuição tanto na fagocitose como na produção de TNF- α , IL-1 β , IL-2 e IL-10 quando estimulados em cultura com os antígenos solúveis e lipídicos da parede celular do fungo, indicando a importância desse receptor no reconhecimento de *S. schenckii*. O mesmo grupo também demonstrou que a produção de IL-17 foi independente de TLR-2 com os animais TLR-2-/-, apresentando alta produção deste mediador quando comparados aos animais selvagens, portando

o receptor TLR-2 (Negrini *et al.*, 2014).

[018] Os macrófagos, por exemplo, quando ativados em cultura com componentes da parede celular do fungo produzem citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α que estimulam a resposta fagocítica (Carlos *et al.*, 2009) e liberam compostos intermediários do nitrogênio e do oxigênio com função fungicida (Carlos *et al.*, 2003; Sheisa *et al.*, 2012). Fernandes e colaboradores (2008) demonstraram *in vitro* a efetividade do NO na eliminação das leveduras *S. schenckii*, no entanto esse efeito se tornou limitado quando avaliado em modelo de esporotricose murina. Essa supressão da resposta imune contra o fungo foi previamente relatada por Carlos e colaboradores (2003), onde se evidenciou o papel do NO com uma forte participação na eliminação do *S. schenckii* nas primeiras três semanas da infecção, comprovada pela diminuição do crescimento do fungo no fígado e baço. Por outro lado, entre a quarta e sexta semana de infecção, a alta produção do NO, estimulada pelo IFN- γ e IL-12, aumentou a suscetibilidade dos animais à infecção nos mesmos órgãos avaliados (Carlos *et al.*, 2003; Maia *et al.*, 2006).

[019] Atualmente os macrófagos têm sido classificados em dois grupos: a saber, a via clássica ou macrófagos M1, os quais quando ativados pela exposição a IFN- λ , TNF- α ou indutores dessas citocinas como os ligantes de receptores Toll (TLR-2 e TLR-4) (Benoit *et al.*, 2008) e outros ligantes, expressam na superfície celular MHC II, CD86, CD16 e produzem citocinas pro-inflamatória e IL-12, assim como, NO e H₂O₂, polarizando a resposta imune para um perfil Th1 (Correa e López, 2007) e a via alternativa ou M2 que incluem os macrófagos M2a estimulados por IL-4/IL-13

(Mantovani *et al.*, 2007), M2b induzidos por complexos imunes e M2c os quais são ativados por hormônios (Benoit *et al.*, 2008), IL-10 e TGF- β (Correa e López, 2007). Os macrófagos M2 quando ativados produzem citocinas antiinflamatórias como a IL-10 e expressam na sua superfície celular arginina 1, CD206 e receptor da IL-4 (Murray e Wynn, 2011). Alegranci e colaboradores (2013) avaliaram o papel dos macrófagos M1 e M2, durante 8 semanas, em modelo murino de esporotricose experimental, quando estimulados em cultura com um peptídeo-polissacarídeo obtido da parede celular do fungo. Os resultados mostraram predomínio da subpopulação dos macrófagos M1 entre a primeira e quarta semana da infecção, evidenciada pela alta produção de IL-12 e NO, nesse período. A partir da quarta semana e até o final do modelo experimental, houve predomínio da subpopulação de macrófagos M2 sobre a M1, evidenciado pela alta expressão do receptor CD206, da atividade de arginase I e da produção significativa de IL-10 e TGF- β , o que sugere a contribuição de ambas populações no controle da infecção.

[020] Tradicionalmente, a resposta imune Th1, produtora de IFN- γ e IL-12 tem sido considerada essencial para conferir imunidade protetora contra fungos, enquanto que as respostas Th2 mediadas pela IL-4 e IL-5 levam ao aumento da suscetibilidade à infecção por esses patógenos (Antachopoulos e Roilides, 2005). Já foi demonstrado o desenvolvimento de resposta imune celular durante a infecção murina por *S. schenckii* (Carlos *et al.*, 1992) e, posteriormente que as respostas Th1 e Th2 são induzidas de modo antígeno-específico contra componentes da parede celular desse fungo (Maia *et al.*, 2006).

[021] Células com padrão Th17 compreendem um novo subtipo de célula T que possuem um papel emergente na imunidade adaptativa para uma variedade de fungos (Romani, 2011), incluindo *S. schenckii*, conforme demonstrado recentemente em camundongos infectados com este fungo que conseguiram eliminar a infecção no período de 20 dias caracterizada pela alta produção da citocina IL-17 (Ferreira *et al.*, 2015), confirmando o papel relevante deste subtipo celular na defesa contra *S. schenckii*.

[022] A resposta imune humoral, na dependência da quantidade e qualidade dos anticorpos, pode proteger o hospedeiro contra as infecções fúngicas de diferentes formas, seja prevenindo a aderência, a neutralização de toxinas, opsonizando para favorecer o processo de fagocitose ou mediando a citotoxicidade celular dependente do complemento (Pérez *et al.*, 2013). Essas observações têm sido suportadas por diferentes estudos; por exemplo, na identificação de anticorpos protetores e não protetores na infecção induzida por *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, indicando que a resposta imune humoral contra os fungos pode gerar anticorpos de variada eficácia (Blanco e Garcia, 2008; Edwards, 2012). No caso de *S. schenckii* foi demonstrado que animais tratados com um anticorpo monoclonal contra a gp70 antes e depois da infecção com o fungo foram capazes de induzir proteção, evidenciado pela diminuição na carga fúngica no baço e o fígado (Nascimento *et al.*, 2008).

[023] A escolha do tratamento antifúngico para controlar esta doença, está relacionada ao tipo de manifestação clínica desenvolvida pelo paciente. Segundo as recomendações atuais o itraconazol, apesar do seu alto custo,

continua sendo o fármaco de escolha para o tratamento das manifestações clínicas da esporotricose menos severas, como cutâneas fixas e linfocutâneas, onde o tratamento pode durar 4 meses (Kauffman *et al.*, 2007). Porém o itraconazol é metabolizado no fígado pela isoenzima 3A4 do sistema enzimático citocromo P450, uma via enzimática comum para fármacos rotineiramente usados na atenção primária, como digoxina, warfarina, carbamazepina, fenobarbital e outros medicamentos (Francesconi *et al.*, 2011; Vikram *et al.*, 2014).

[024] O iodeto de potássio, o qual tem preço mais acessível e tem sido usado nos países desenvolvidos com grande sucesso nas formas cutâneas da esporotricose, também tem mostrado sérias limitações, atribuídas ao desconhecimento do seu mecanismo de ação e à alta frequência de reações adversas, como alergias, edema pulmonar, angioderma, mialgia, linfadenopatia, urticária, vasculite, psoríase pustular, acidose metabólica e iododerma, lacrimejamento, expectoração abundante, coriza, espirros, insônia e problemas tireoidianos (Silva e Pereira, 2009). O fluconazol, sendo parte do grupo dos azóis como o itraconazol, devido a menor eficácia é utilizado apenas como uma opção terapêutica de segunda linha (Francesconi *et al.*, 2009).

[025] A terbinafina é pertencente ao grupo das alilaminas, outro fármaco alternativo ao itraconazol para o tratamento de formas menos agressivas da esporotricose devido a sua baixa ligação (aproximadamente 5%) com o sistema enzimático P450, diminuindo a probabilidade de interagir com outros fármacos metabolizados por este sistema, como foi explicado anteriormente, no entanto ainda não há consenso

sobre a dose e a duração do tratamento (Chapman *et al.*, 2004, Kauffman *et al.*, 2007; Francesconi *et al.*, 2009). A anfotericina B lipossomal e desoxicolato são os fármacos de escolha junto com o itraconazol para o tratamento de formas graves da esporotricose, tais como a osteoarticular, pulmonar, meningeal e disseminada (Kauffman *et al.*, 2007) que ocorrem geralmente em pacientes HIV positivos. A terapia com as diferentes formas farmacêuticas de anfotericina B nos pacientes imunodeprimidos é difícil devido às reações adversas como a hipocalcemia, hipomagnesemia, anemia normocítica e principalmente nefrotoxicidade (Vikram *et al.*, 2014).

[026] Resumidamente, as principais limitações das opções terapêuticas são: a longa duração do tratamento associada com um aumento da resistência aos fármacos antifúngicos e toxicidade, as interações com outros fármacos, o custo excessivo do tratamento especialmente em pacientes imunocomprometidos que sofrem a forma disseminada da esporotricose. Tudo isso aponta à necessidade de tratamentos mais eficazes e seguros e a procura de métodos de prevenção principalmente, em populações de alto risco.

[027] A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem considerado as vacinas como uma das intervenções médicas profiláticas mais eficazes para o controle de doenças infecciosas em relação custo-benefício (Pashine *et al.*, 2006). O principal objetivo da vacinação é preparar o sistema imune, tão logo o indivíduo vacinado se torne hospedeiro, para responder mais rápida e eficazmente contra um determinado patógeno, além de induzir uma memória imunológica de longa duração (O'Hagan, 2006).

[028] As vacinas tradicionais utilizam organismos inteiros vivos e/ou mortos. As primeiras são altamente imunogênicas e mais eficazes para a indução de proteção, já que a resposta imunológica a essas vacinas é muito semelhante àquela produzida em resposta à infecção natural, resultando em imunidade humoral (linfócitos B com a produção de anticorpos) e celular (linfócitos TCD4+ e linfócitos T citotóxicos, CTLs), mas seu uso está limitado pela probabilidade potencial de reversão parcial ou total ao fenótipo patogênico e causar doença particularmente em indivíduos imunodeprimidos (Moigeon *et al.*, 2001; Coeshott *et al.*, 2004; Tlaskalová *et al.*, 2004). Enquanto que as vacinas que utilizam organismos mortos são menos imunogênicas e geralmente necessitam de adjuvantes para gerar a resposta imune desejada. Por outro lado, as vacinas de nova geração que contêm componentes antigênicos simples e mais bem definidos do que as vacinas convencionais, por exemplo, peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes são mais seguras quanto ao uso, porém devido a sua baixa imunogenicidade, também precisam de um adjuvante para alcançar o efeito imune desejado (Schijns, 2006).

[029] O termo adjuvante originou-se da palavra latina *adjuvare* que significa ajudar. Neste sentido qualquer substância que possa amplificar ou intensificar a cascata de eventos imunológicos que compõem a resposta imune pode ser classificada como adjuvante (Schijns, 2006). O aumento do interesse em adjuvantes nas últimas décadas ocorreu pela necessidade de estimular a resposta imune frente às vacinas compostas por subunidades simples e seguras, porém pouco imunogênicas.

[030] Até o momento, os avanços mais importantes na vacinologia têm sido obtidos com a prevenção de doenças virais e bacterianas e não contra doenças antiparasitárias e antifúngicas (Portuondo *et al.*, 2015). Durante muito tempo, a falta de compreensão nas interações ausência de visibilidade das infecções fúngicas oportunistas e endêmicas têm dificultado o desenvolvimento de vacinas para fungos (Edwards, 2012). No entanto, a incidência de doenças crônicas associadas a micoses oportunistas como exemplo, candidíase, paracoccidioidomicose, aspergilose, e mais recentemente a esporotricose, têm despertado o interesse no desenvolvimento desta alternativa terapêutica (Cutler *et al.*, 2006; López-Romero *et al.*, 2011; Portuondo *et al.*, 2015).

[031] Os adjuvantes podem ser utilizados para melhorar a resposta imune aos antígenos por diferentes caminhos, incluindo: potencialização da imunogenicidade de imunógenos fracos, aumento da velocidade e duração da resposta imune, modulação da especificidade, isotipo e distribuição das sub-classes de anticorpos, estimulando a resposta de linfócitos T citotóxicos, promovendo a indução da imunidade de mucosa, aumentando a resposta imune de indivíduos imunologicamente imaturos ou senescentes, reduzindo os custos das vacinas pela diminuição das doses dos antígenos e ajudando a controlar a competição de antígenos em vacinas combinadas (Singh e O'Hagan, 2003; Sivakumar *et al.*, 2011). Singh e O'Hagan (2003), classificaram os adjuvantes de vacinas em dois grandes grupos: sistemas de liberação e imunopotencializadores. Os sistemas de liberação, tais como micropartículas, emulsões, complexos imuno estimulantes (ISCOMs), lipossomas,

virossomas e partículas semelhantes a vírus têm dimensões comparáveis aos patógenos e, portanto, são efetivamente capturados em uma forma mais natural pelas células apresentadoras de antígeno, facilitando assim a indução de uma potente resposta imune (Mutwiri *et al.*, 2007, 2011). O efeito imunopotencializador, como monofosforil lipídeo e derivados sintéticos, muramildipetídeo e derivados, sequências CpG, lipopetídeos, entre outros refere-se à ativação direta sobre as células imunes inatas, principalmente através dos receptores Toll e outras famílias de receptores (O'Hagan e Valiante, 2003; Batista- Duharte *et al.*, 2013, 2014).

[032] Muitos desses adjuvantes imunológicos têm demonstrado estimular uma proteção eficaz em modelos murinos, especialmente, contra candidíase, criptococose, coccidioidomicose, blastomicose, histoplasmose, paracoccidioidomicose, infecções causadas por *Pneumocystis* e, mais recentemente para a aspergilose (Torosantucci *et al.*, 2005; Pietrella *et al.*, 2010).

[033] Apesar desses avanços, ainda nenhuma vacina antifúngica tem sido aprovada pelas agências reguladoras para imunização em humanos (Portuondo *et al.*, 2015). Atualmente, apenas existem duas vacinas antifúngicas em fase clínica, a vacina NDV-3 contra *C. albicans* e *Staphylococcus aureus* formuladas com hidróxido de alumínio e a vacina PEV-7 contra a vulvovaginite formulada com o adjuvante virossoma (Portuondo *et al.*, 2015).

[034] Os sais de alumínio, como o fosfato e hidróxido de alumínio, desde a sua criação em 1926 por Glenny, têm sido os adjuvantes mais amplamente utilizados em

seres humanos (EMEA, 2004, 2005; Simon e Edelman, 2006; Aguilar e Rodriguez, 2007). Os sais de alumínio atuam como um sistema de liberação formando um depósito no lugar da inoculação que fornece o recrutamento de células como monócitos CD11c+ e células dendríticas. Existem outras evidências que sugerem que o alumínio produz necrose celular, resultando na produção de ácido úrico, ativando os "NOD like receptor" como o NLRP3 e que este complexo seja importante no efeito imunestimulante do alumínio (Franchi L *et al.*, 2008; Coffman *et al.*, 2010). Muitos adjuvantes, incluindo o hidróxido de alumínio estimulam o sistema imune, induzindo irritação local e necrose (Batista-Duarte *et al.*, 2014). Embora os sais de alumínio sejam amplamente utilizados, sua principal limitação é que induzem uma forte resposta imune Th2, com produção de anticorpos IgE que estão associados às reações de hipersensibilidade, e além disso, a resposta imune é de curto prazo (Garçon *et al.*, 2011).

[035] Dentre os estudos pré-clínicos de vacinas existem diferentes objetivos: 1) garantir uma formulação vacinal eficaz e segura. Para isto é importante a seleção de antígenos apropriados para gerar uma adequada imunogenicidade protetora. 2) a seleção do adjuvante adequado que permita um ótimo balanço na estabilidade, imunopotenciação e baixa toxicidade com os antígenos que são formulados com ele (WHO, 2013).

[036] Conforme a Agência Europeia de Medicamentos (EMEA) a avaliação da formulação antígeno-adjuvante deve ser feita comparativamente na presença ou na ausência do adjuvante (EMEA, 2004). Por exemplo, para as formulações que utilizam o adjuvante hidróxido de alumínio ou adjuvantes de

natureza particulada, recomenda-se avaliar a cinética de adsorção/desorção do complexo antígeno adjuvante (Lindblad, 2004; EMEA, 2004, 2005). Outro objetivo é demonstrar o efeito da vacina sobre a resposta imune utilizando modelos *in vitro* ou *in vivo* (Mastelic *et al.*, 2013). Para isto é importante determinar a estimulação da imunidade inata e específica incluindo estudos de citocinas pro-inflamatórias, resposta Th1/Th2/Th17, os níveis de anticorpos específicos, estudos funcionais associados aos mecanismos de defesa demonstrados contra o microrganismo em questão (Garçon *et al.*, 2011a). Outro objetivo é estudar a segurança da formulação através de estudos *in vitro* para determinar a citotoxicidade direta do candidato vacinal sobre as células e também estudos *in vivo* como a tolerância local no sítio de inoculação que pode ser avaliada durante o próprio estudo da imunogenicidade (EMEA, 2004, 2005). Estudos mais específicos de toxicidade são geralmente realizados em etapas mais avançadas (Garçon *et al.*, 2011b).

[037] Uma vez alcançadas as evidências de imunogenicidade e segurança, devem ser realizados ensaios de proteção utilizando modelos de infecção padronizados para garantir uma adequada avaliação da capacidade profilática ou terapêutica do produto em estudo (Mastelic *et al.*, 2013). Os estudos pré-clínicos devem combinar ensaios *in vitro* e *in vivo*, primeiro em modelos murinos, geralmente camundongos, e depois se possível, em outras espécies animais antes de se passar aos ensaios em humanos (WHO 2003; EMEA 1997, 2005; Vecchi *et al.*, 2011; Garçon *et al.*, 2011b).

[038] Devido à necessidade atual de buscar alternativas terapêuticas mais efetivas contra *S. schenckii*,

somado a evidência de que a enolase deste fungo foi responsável, em parte, da proteção alcançada em camundongos desafiados com *S. schenckii* 16345 ATCC, a presente invenção surge com a possibilidade de usar a enolase obtida por via recombinante e formulada com o hidróxido de alumínio num modelo de infecção sistêmica de esporotricose em uma formulação vacinal. Os resultados obtidos são promissórios e além de evidenciar o uso potencial da tecnologia para fins terapêuticos e/ou preventivo contra a esporotricose, também poderão abrir novos caminhos para futuras preparações vacinais contra doenças de interesse na saúde pública.

ESTADO DA TÉCNICA

[039] O documento intitulado "*A cell wall protein-based vaccine candidate induce protective immune response against Sporothrix schenckii infection*", demonstrou que o soro obtido de camundongos imunizados com uma formulação vacinal composta por nove proteínas isoladas da parede celular do fungo *S. schenckii* ATCC 16345 e o adjuvante hidróxido de alumínio reagiu contra duas (2) dessas proteínas. Uma proteína de 71 kDa não identificada funcionalmente e outra de 47 kDa identificada como enolase presente nas cepas *S. schenckii* ATCC 58251, *S. schenckii* 1099-18 e *S. brasiliensis* 5110. Nesse documento esse soro imune conferiu proteção quando transferido passivamente a camundongos desafiados com o fungo *S. schenckii* ATCC 16345. Esse resultado evidenciou pela primeira vez o efeito imunogênico da proteína enolase de *S. schenckii* e sua possível contribuição na proteção em camundongos desafiados com o fungo. Entretanto, a presente invenção difere de tal documento pelo fato da formulação vacinal composta pela

proteína enolase obtida por via recombinante e não com uma formulação composta por várias proteínas nativas do fungo, com a finalidade de conseguir quantidade suficiente desta proteína para a realização dos ensaios propostos. A tecnologia do DNA recombinante garante que uma sequência de DNA codificadora da proteína de interesse seja produzida em grande escala utilizando bactérias ou leveduras como biorreatores, no presente caso para fins vacinais. Os experimentos realizados contidos na presente invenção demonstraram que a enolase recombinante foi obtida com alta pureza e um peso molecular de 45 kDa próximo ao de 47 kDa previamente detectada em tal documento. Além disso, os resultados da presente invenção demonstraram que a formulação vacinal assim constituída (HA+rSsEno100) conferiu proteção em camundongos desafiados com o fungo.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[040] A presente invenção tem por objetivo propor uma formulação vacinal compreendendo uma proteína enolase de *Sporothrix schenckii*, obtida por via recombinante purificada e associada ao adjuvante hidróxido de alumínio. Tal formulação induz altos títulos de anticorpos antígeno específicos contra a proteína alvo, enolase recombinante - rSsEno, e um perfil de resposta imune Th1/Th2/Th17, indicando seu uso na terapia profilática da esporotricose, especialmente contra o fungo *S. brasiliensis*, considerado o mais patogênico dentro do complexo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[041] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme se segue:

[042] A FIG. 1 mostra graficamente a resposta de anticorpos IgG contra a rSsEno. Cada grupo de camundongos Balb/C (n=5) recebeu duas doses das formulações vacinais indicadas por via subcutânea com intervalo de 14 dias, e sete dias após a segunda imunização foi determinado no soro de cada animal o título de anticorpos IgG contra a rSsEno. A significância estatística foi determinada por ANOVA e pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com intervalo de confiança de 95 %. Letras distintas representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

[043] A FIG. 2 mostra graficamente a quantificação das citocinas IL-10, IL-4, IFN- γ e IL-17. Cada grupo de camundongos Balb/C (n=5) recebeu duas doses das diferentes formulações indicadas por via sc com intervalo de 14 dias, e sete dias após a segunda imunização, as células dos animais foram obtidas e estimuladas com rSsEno (20 $\mu\text{g/mL}$), como controle negativo do teste, o RPMI, e controle positivo, o LPS. A significância estatística foi determinada por ANOVA e pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com intervalo de confiança de 95 %. Letras distintas representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

[044] A FIG. 3 mostra graficamente a proteção conferida pela formulação HA+rSsEno100. Cada grupo de camundongos Balb/c (n=5) recebeu duas doses das diferentes formulações indicadas por via sc com intervalo de 14 dias, e sete dias após a segunda imunização os animais foram desafiados por via ip com 1×10^6 leveduras de *S. brasiliensis* Ss250 e após cinco dias, o baço (A) e o fígado (B) foram extraídos para determinação das UFCs. O grupo controle de infecção (CI) foi infectado com a mesma carga fúngica por

via ip. A significância estatística foi determinada por ANOVA e pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com intervalo de confiança de 95 %. Letras distintas representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[045] A presente invenção refere-se a uma formulação vacinal compreendendo uma enolase recombinante da parede celular do *Sporothrix schenckii*, a qual é purificada e associada ao adjuvante hidróxido de alumínio para uso na terapia profilática da esporotricose, especialmente contra o fungo *S. brasiliensis*, considerado o mais patogênico dentro do complexo. A referida formulação vacinal induz altos títulos de anticorpos antígeno específicos contra a proteína alvo, enolase recombinante (rSsEno) e um perfil de resposta imune Th1/Th2/Th17.

[046] Conforme mencionado, a enolase é obtida por meio de tecnologia recombinante da seguinte maneira:

Transformação da bactéria *Escherichia coli* DH5 α com o plasmídeo recombinante pET28a::SsEno

[047] Uma suspensão de células competentes DH5 α , estocadas a $- 80^{\circ}\text{C}$ foi retirada e transferida para um tubo *ependorf* de 1,5 mL e mantida durante aproximadamente 15 min em banho de gelo. Transcorrido esse tempo foi adicionado 2 μl do pET28a::SsEno a 100 μl das células DH5 α em condições estéreis em fluxo laminar e incubada durante 30 min em gelo. Após desse tempo, a mistura foi submetida a choque térmico intercalando a incubação em banho de água a 42°C por 2 min com banho de gelo por 2 min. Após este período foi adicionado 600 μL de meio Líquido Lysogeny broth (LB, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl, por litro de

solução a pH 7,0) e as células foram deixadas crescer à temperatura de 37° C por 45 min a 200 rpm. Após esse período de crescimento, a cultura foi centrifugada a 2500 rpm durante 2 min à 25° C, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido em 600 mL de meio LB. Aliquotas de 100 µL foram plaqueadas em placas Petri (5 placas) contendo 20 mL de meio ágar LB 1,5% (15 g de ágar, 50 µg do antibiótico kanamicina por cada litro de meio LB líquido) e após de seladas com parafilm foram incubadas por um período de 12 a 16 horas na estufa a 37° C. O plasmídeo pET28a::SsEno contém um gene de resistência a kanamicina que permite selecionar as bactérias transformadas, ou seja, que receberam o plasmídeo.

Purificação do plasmídeo pET28a::SsEno propagado nas células *E. coli* DH5α.

[048] Após o período de incubação, os clones considerados positivos foram transferidos individualmente para tubos estéreis de 15 mL contendo 5 mL de meio líquido LB suplementado com o antibiótico kanamicina (50 µg/mL). O inóculo permaneceu incubado no período entre 12 a 16 horas no shaker a 200 rpm e 37° C. A extração e purificação do DNA plasmidial pET28a::SsEno foi realizada através do Kit Ilustra™ plasmidPrep Mini Spin de acordo com as recomendações do fabricante. A autenticidade do DNA plasmidial do vetor pET28a::SsEno propagado e purificado a partir das células *E. coli* DH5α foi confirmado por sequenciamento e analisada através da ferramenta BLAST.

Indução da expressão da enolase recombinante na bactéria *E. coli* BL21

[049] O procedimento empregado na transformação de células competentes de *E. coli* BL21 foi o mesmo descrito na

transformação de células DH5 α . Após o período de transformação, uma colônia da cepa *E. coli* BL21 foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido LB suplementado com antibiótico kanamicina (50 mg/mL). A cultura foi deixada crescer no shaker sob agitação de 200 rpm durante 16 horas a 37° C. Após esse período 15 mL da cultura foi transferida para outro frasco Erlenmeyer de 2 L contendo 1 litro do mesmo meio suplementado com o antibiótico e incubado nas mesmas condições de temperatura e agitação até atingir a densidade ótica DO₆₀₀ de 0,6 (este intervalo de DO se corresponde à fase logarítmica de crescimento da cepa *E. coli* BL21). Depois de atingido o crescimento celular, a temperatura foi baixada a 30° C e a expressão da enolase recombinante SsEno foi induzida através da adição de 0,2 mM de IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), sendo a cultura incubada por 4 horas a 200 rpm. Após a indução a cultura foi centrifugada a 8000 rpm durante 10 min a 4° C e o *pellet* resultante coletado foi transferido para um béquer contendo 20 mL do tampão A de lise (fosfato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 500 mM e imidazol 20 mM, pH 7,4) acrescentado com 10 μ L (5 U) de DNase e 30 μ g/mL de lisossima. A suspensão foi incubada durante 30 min e ao término deste tempo a suspensão celular foi submetida à lise celular por sonicação nas condições a seguir: 30% de amplitude, 5 segundos PULSE ON e -59 segundos de PULSE OFF.

[050] Em seguida o extrato bruto proveniente das células lisadas foi centrifugado a 17000 rpm durante 20 min a 4° C. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante que continha a proteína recombinante foi filtrada em membrana hidrofílica

de 0,45 μm e em seguida a SsEno foi purificada por dois passos cromatográficos: cromatografia de afinidade ao Ni^{2+} e por cromatografia de exclusão molecular, ambos procedimentos descritos a seguir.

[051] Cabe ressaltar que uma alíquota de 1 mL retirada da cultura antes e após da indução com IPTG foi centrifugada a 2500 rpm por 2 min e os pellets resultantes, foram individualmente ressuspensos em 50 μL de tampão azul de corrida SDS-PAGE e congelados a -20°C . Ambas as alíquotas serviram como controles de indução e não indução da enolase recombinante.

Purificação da proteína recombinante rSsEno por cromatografia de afinidade e exclusão por tamanho.

[052] O sobrenadante filtrado foi inserido numa coluna de afinidade HisTrap contendo no seu interior uma matriz de níquel-sefarose, que se baseiam em esferas de agarose contendo em sua superfície íons Ni^{2+} imobilizados. O aminoácido de histidina apresenta uma alta afinidade pelos íons Ni^{2+} presentes na resina, deste modo a cauda de histidina contida na proteína recombinante SsEno permitiu a purificação desta proteína por afinidade a esse íon. A eluição da proteína SsEno foi realizada com 10 mL do tampão B (NaPO_4 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM, pH 7,4). A separação se deu em duas etapas primeiro com 4 mL e depois com 6 mL. Ambas as amostras foram avaliadas por SDS-PAGE e constatou-se a presença da proteína na fração de 6 mL que foi conduzida a etapa de polimento por cromatografia de exclusão por tamanho. A cromatografia de exclusão molecular foi conduzida em coluna Superdex 200 pg 16/60 acoplada a um sistema HPLC preparativo previamente lavada com água Milli-

Q durante duas horas e pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, 100 mM de NaCl e 2 mM de β -mercaptoetanol, pH 7.5, sendo que a proteína foi eluída nesse mesmo tampão. Os eluatos foram coletados em frações de 1 mL empregando-se uma velocidade de fluxo de 1 mL/min. As frações contendo a proteína recombinante foram reunidas e concentradas através de tubos de filtração Amicon® Ultra-15 de 3 K conforme as orientações do fabricante e dialisadas contra PBS 7,2-7,4. O coeficiente molecular da enolase $5,4620 \times 10^4$ e seu peso molecular de 47584 Da foram utilizados para calcular a concentração proteica desta proteína utilizando o valor da absorvância do extrato proteico determinada em espectrofotômetro UV-Vís a 280 nm. Todas as etapas de produção e purificação da proteína foram acompanhadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

[053] Finalmente para atestar a integridade estrutural da proteína avaliou-se a estrutura secundária por meio de dicroísmo circular (CD). Os ensaios de CD foram realizados em um a J-815 espectropolarímetro acoplado a um sistema Peltier PFD 425S para controle da temperatura. A rSsEno foi testada em tampão Tris-HCl (pH=7.5), 100 mM de NaCl e 2 mM de β -mercaptoetanol na concentração de 4 μ M. Em adição, para melhor compreender o estado oligomérico da proteína recém-sintetizada foram realizados ensaios de cromatografia de exclusão molecular analítica (CEMa) em coluna Superdex 200 GL 10/30 acoplada a um ÄKTA Prime Plus e equilibrada com tampão Tris-HCl (pH=7.5), 100 mM de NaCl e 2 mM de β -mercaptoetanol.

Extração de proteínas da superfície celular dos Ss16345 e Ss250

[054] As PSC da cepa Ss16345 e do isolado de gato Ss250 foram extraídas na fase logarítmica de crescimento seguindo o protocolo descrito por Castro e colaboradores (2013) com modificações (Portuondo *et al.*, 2016). As leveduras de ambos os fungos foram obtidas como anteriormente, só que um inóculo inicial para Ss16345 foi de 2×10^8 leveduras e de 2×10^6 leveduras no caso de Ss250, ambos os inóculos para 1 litro de meio BHI em frascos Erlenmeyer com capacidade de 2000 mL afim de obter quantidade necessária de massa celular para o procedimento de extração das proteínas. As culturas se deixaram crescer então durante 5 dias nas mesmas condições descritas anteriormente. Ao término desse tempo, ambas as culturas foram centrifugadas a $1000 \times g$ durante 10 minutos e lavadas três vezes com 25mM de Tris-HCl pH 8,5 gelado. Em seguida, os *pellets* celulares correspondentes a cada fungo foram lavados três vezes com tampão Tris-HCL 25 mM, pH 8.5. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspensos individualmente no mesmo tampão acrescentado com 2 mM de Ditioneitol (DTT), 1 μ M de PMSF e 5 mM de EDTA. As suspensões celulares foram mantidas sob agitação leve, durante 3 horas a 4°C. Transcorrido esse tempo, os sobrenadantes foram separados por centrifugação e então filtrados com membrana de porosidade de 0,20 μ m. O filtrado de cada sobrenadante contendo as PSC de Ss16345 e Ss250 foram dialisados contra água destilada a 4°C durante 48 horas com trocas de água a cada 12 horas e em seguida concentrado 100 vezes com sistema à vácuo Amicon utilizando uma membrana de celulose YM10 (Milipore) e posteriormente com tubos de filtração Amicon® Ultra-15 de 3 K conforme as orientações do fabricante. O

extrato de proteínas de cada fungo foi aliqotado e estocado a -20° C. A dosagem de proteínas foi realizada pelo o método do ácido bicinonínico (BCA), segundo as orientações do fabricante, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão de proteínas. Esse método baseia-se na redução do cobre II pelas proteínas, em meio alcalino, produzindo o cobre I e formando um complexo com o BCA o qual apresentam a máxima absorbância a 562 nm.

Separação de proteínas por SDS-PAGE

[055] As PSC obtidas de Ss16345 ou Ss250 assim como as amostras de proteínas obtidas em cada etapa do processo de expressão e purificação da rSsEno foram caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). A preparação do gel separador e de empilhamento foi realizada conforme os volumes dos reagentes descritos na Tabela 1 a seguir:

Tabela 1: Reagentes e volume para o preparo dos géis da eletroforese.

| Componentes | Gel separador 12% (mL) | Gel de empilhamento 5 % (mL) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|---|
| Água | 6.6 | 2.7 |
| Acrilamida/bis-acrilamida 30% | 8 | 0.67 |
| Tris-HCl (pH 8.8) 1,5M | 5.00 | - |
| Tris-HCl (pH 6.8) 0,5M | - | 0.5 |
| Deodecil sulfato de sódio (SDS) 10% | 0.2 | 0.04 |
| Persulfato de amônio 10% | 0.2 | 0.004 |
| TEMED | 0.008 | 0.004 |

[056] As amostras de proteínas contendo a rSsEno e o marcador de peso molecular de proteínas foram diluídas em

tampão da amostra "Lane Marker Sample Buffers", contendo 0,3 M Tris-HCL, 5 % SDS, 50 % glicerol, 100 mM de DTT e corante rosa na proporção de 16 µl do tampão da amostra/ 64 µl das amostras. Após, aquecidas a 100°C por 5 minutos, e depositadas nos poços do gel da eletroforese, a corrida foi realizada à temperatura ambiente em cuba de eletroforese em placas mini-gel (10x8) aplicando-se 100 V durante aproximadamente 2 horas até que as amostras atingissem 0,5 cm do final do gel. O marcador de peso molecular continha a Apoferritina (480 kDa), γ -Globulina (160 kDa); 3), BSA (67 kDa/), anidrase carbônica (29 kDa) e Citocromo C (12 kDa). O tampão da cuba constituiu-se de Tris base 0,25 M, glicina 2 M e SDS 1 %. Os géis foram corados com prata e Comassie blue ou prata conforme o procedimento descrito na Tabela 2 a seguir:

Tabela 2: Coloração com nitrato de prata

| Coloração com nitrato de Prata | Solução | Tempo (minutos) |
|---------------------------------------|--|------------------------|
| Fixação | 50% Metanol/etanol e 5% de ácido acético em água | 20 |
| Lavagem | 50% Metanol/etanol em água | 10 |
| Lavagem | Água bidestilada | 5 |
| Lavagem | Água bidestilada | 20 |
| Sensibilização | 0,025% Na ₂ SO ₃ em água | 1 |
| Lavagem (2x) | Água bidestilada | 1 |
| Coloração | 0,15% AgNO ₃ em água gelada | 20 |
| Lavagem (2x) | Água bidestilada | Rápido |
| Revelação | 3% Na ₂ CO ₃ e 0,05 % de formaldeído em água | |
| Interrupção (3x) | 5 % de ácido acético em água | |

| | | |
|---------|----------------------------|--|
| Estoque | 1 % de ácido acético à 4°C | |
|---------|----------------------------|--|

Ensaio de immunoblot

[057] As PSC de Ss16345 e Ss250 assim como a rSsEno foram dissolvidas em tampão de amostra Lane Marker Sample Buffers e submetidas à SDS-PAGE. Após a eletroforese, os géis de cada amostra foram transferidos para membranas de nitrocelulose de 0,45 µm, recobertos com papel de filtro e comprimidos com esponjas de poliuretano. Todos os materiais foram previamente embebidos em tampão de transferência bicarbonato de sódio e metanol pH 9,9 e em seguida encaixados em placas acrílicas perfuradas e mergulhadas na câmara de transferência contendo o mesmo tampão. A transferência foi feita durante 5 h com amperagem constante de 0,4 mA a 4° C em câmara de transferência para mini-gel 10x8 cm. As membranas de nitrocelulose contendo as PSC de Ss16345, Ss250 e a rSsEno foram cortados em tiras e incubadas com solução bloqueadora (BSA 5% em TBS-T, que contém 50 mM de *Tris Base*, 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20) por 4 horas. O soro anti-rEno proveniente dos camundongos imunizados com a rSsEno100 foi colocado individualmente sobre as tiras e deixados sob agitação, durante 16 horas à temperatura ambiente. Como controle negativo foi utilizado sCNI, ambos os soros foram diluídos 1/50 em TBS-T. Transcorrido esse tempo, as tiras foram lavadas com PBS três vezes, com trocas a cada 10 minutos, para a retirada do excesso do soro. Então, foram incubadas por 2 horas com conjugado imunoenzimático, soro anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase na diluição de 1/500 em PBS. O excesso de conjugado foi retirado com novo ciclo de lavagens. Para evidenciar os complexos antígenos-anticorpos formados, foi acrescentado o substrato

cromógeno, que consistiu de 0,005 g de diaminobenzidina diluída em 30 mL de PBS acrescidos de 150 µL de peróxido de hidrogênio no momento do uso. A reação foi interrompida com água destilada.

Ensaio de imunorreatividade do soro anti-rSsEno com as leveduras dos fungos

[058] Para este ensaio, 5 mL de uma suspensão celular de leveduras de Ss16345, Ss1099-18, Ss250 e Ss256 foi centrifugada a 1000 x g durante 5 min a 4°C. Após, os *pellets* celulares foram lavados duas vezes em PBS na mesma condição anterior e em seguida foi filtrado através de 8 camadas de gaze estéril contida numa seringa estéril para a obtenção de uma suspensão contendo apenas leveduras, confirmada visualmente por microscopia óptica. Após, alíquotas de 100µL contendo 10⁶ leveduras de cada fungo foram transferidas para tubos eppendorf e incubadas por 1 h a 37°C com soro anti-rSsEno ou com sCNI como controle da marcação inespecífica, todos diluídos 1:50 em PBS. Em seguida, as suspensões foram lavadas como acima, ressuspendidas em 100µL de PBS e então incubadas por 1 h a 37°C com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo obtido em coelho e conjugado com FITC diluído 1:50. As amostras foram lavadas mais duas vezes para remoção dos anticorpos não ligados e então adquiridas no citômetro de fluxo BD Accuri C6 e analisadas usando o software proprietário do equipamento. O limiar de aquisição das amostras foi ajustado para 50.000 no parâmetro FSC-H ("*forward scatter - height*") para exclusão do *debri* e pelo menos 60.000 eventos foram efetivamente incluídos em cada análise. A ligação dos anticorpos presentes nos soros testados à superfície das leveduras foi avaliada

pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI).

Preparação da Formulação

[059] Para a preparação da referida formulação, uma concentração de 1 mg do rSsEno /0,9 mL de PBS foi misturada com 0,1 mL de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) a 2% na forma de uma suspensão coloidal estéril, livre de pirógenos e com um conteúdo de Al³⁺ entre 9-11 mg/mL, ressuspendido em PBS. A mistura antígeno/adjuvante foi mantida sob agitação leve durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Imunização e Eutanásia

[060] Foram definidos três grupos de camundongos contendo cinco animais por grupo para serem imunizados pela via subcutânea. Os animais foram imunizados com 100 µL das formulações, conforme descritas na Tabela 3, sendo administradas no dia 0 e no dia 14 administrada uma dose reforço. No dia 21 foi realizada a eutanásia dos animais e coleta do sangue.

Tabela 3: Distribuição dos grupos de camundongos imunizados por via subcutânea (n=5 por grupo).

| Grupos experimentais | Formulações administradas |
|-----------------------------|--|
| Grupo 1 | PBS (pH 7.2 - 7.4) |
| Grupo 2 | 1 mg de rSsEno /mL PBS (rSsEno100) |
| Grupo 3 | 1 mg de rSsEno /mL PBS + 0,1 mL de HA (HA+rSsEno100) |

Obtenção do soro dos camundongos

[061] Conforme mencionado acima, sete dias após a última imunização foi extraído o sangue de todos os camundongos após a eutanásia. O procedimento de extração foi feito por punção cardíaca com seringa e agulhas descartáveis.

O sangue total foi acondicionado em tubos de microcentrífuga estéreis de 1,5 mL e incubado em estufa a 37 °C por 20 minutos. Em seguida foram centrifugados a 117 xg por 10 minutos, os soros colhidos e transferidos para outros tubos estéreis e armazenados a -20 °C até o momento do uso para a quantificação de anticorpos IgG anti-rSsEno.

Detecção de IgG Total anti-rSsEno no soro dos camundongos imunizados

[062] O soro dos animais de cada grupo experimental foi utilizado para a quantificação de anticorpos IgG totais específicos anti-rSsEno. Foram adsorvidas microplacas de 96 poços com 1µg/mL de ssEno diluídas em PBS (100 µL/poço) e incubadas por 18 horas a 4 °C. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,2 % de Tween-20 (PBS-T) em lavadora e em seguida bloqueadas com 200 µL/poço de tampão de bloqueio (5% de leite em PBS-T 0.2%) durante 1 hora a temperatura ambiente.

[063] A placa foi lavada e diluições do soro 1/200 em tampão de bloqueio, foram adicionadas aos poços e incubadas duas horas em estufa a 37 °C. Transcorrido esse tempo a placa foi lavada e, então adicionado 100 µL do conjugado marcado com peroxidase (1/1000) em tampão de bloqueio. Após incubação de 1 hora a 37 °C, e uma nova lavagem foi realizada e então adicionado o substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e deixado por 30 minutos a temperatura ambiente na ausência de luz. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 2N, e a densidade ótica (DO) foi lida a 450 nm utilizando leitor de ELISA UV/visível de microplacas. A leitura final foi realizada em duplicata e a média determinada.

[064] Como pode se observar na FIG. 1, a produção de anticorpos IgG contra a rSsEno foi alcançada tanto nos camundongos imunizados com apenas esta proteína quanto nos animais imunizados com ela formulada com HA evidenciando a capacidade imunogênica da enolase de gerar resposta imune sozinha. No entanto, como esperado, esta resposta de anticorpos foi estatisticamente superior na formulação HA+rSsEno100.

Obtenção dos macrófagos peritoneais dos grupos vacinados e estimulação com a rSsEno

[065] Todos os animais vacinados foram inoculados com 3,0 mL de tioglicolato de sódio a 3,0% três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO₂. Em seguida a pele da região abdominal de cada camundongo foi retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar Classe 100 e o peritônio exposto. Posteriormente foram inoculados 5,0 mL de PBS gelado na cavidade abdominal que foi massageada para a liberação das células peritoneais. O líquido peritoneal resultante foi coletado com seringa e agulha, transferido para um tubo cônico estéril com capacidade de 15 mL e centrifugado a 1500 x g durante 5 minutos e o sedimento celular foi lavado três vezes com 3 mL de PBS. Após a última lavagem, as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 contendo 2β-mercaptoetanol, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL, L-glutamina 2mM e 5% de soro fetal bovino (SFB), sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-1640-C). A suspensão celular foi contada em câmara de Neubauer e ajustada a 5x10⁵/mL em RPMI-1640-C e então 0,1 mL dessa suspensão foi transferida para placas de cultura de 96 poços e incubadas em estufa a 37°C

com 5% de CO₂ durante 2 horas para a aderência dos macrófagos. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados com o intuito de retirar as células não aderentes e um novo meio de cultura foi adicionado na proporção de 1:1 com uma solução da rSsEno (20 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em estufa com tensão constante de 5% de CO₂. Ao término desse tempo, os sobrenadantes obtidos foram centrifugados a 4°C durante 10 min a 14000x g, aliquotados e estocados a -80°C até o momento da dosagem da citocina IL-10.

Obtenção dos esplenócitos dos grupos vacinados e estimulação com a rSsEno

[066] Após a extração das células peritoneais, o peritônio foi aberto para a extração do baço. O mesmo foi fragmentado com auxílio de pinça anatômica em placa de Petri estéril contendo 2,0 mL de RPMI-1640-C gelado para a liberação das células. O conteúdo da placa contendo a suspensão celular foi aspirado e transferido para um tubo cônico estéril de 15 mL. As hemácias foram lisadas com NH₄Cl e a suspensão foi lavada três vezes em PBS estéril a 700xg por 5 min a 4°C. Após a última lavagem as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI-1640-C e contadas em câmara de Neubauer pela técnica de exclusão com azul de Trypan a 0,04%. A concentração das células foi ajustada para 5x10⁶ células/mL em RPMI-1640-C para a realização dos testes propostos.

[067] As suspensões celulares ajustadas para 5x10⁶ células/mL, obtidas de cada animal foram distribuídas em placas de cultura de tecidos de 48 poços na proporção de 1:1 com solução da rSsEno (20µg/mL) ou Concanavalina A (0,5µg/mL) como controle positivo ou apenas com o meio RPMI-1640C como

controle negativo e incubadas a 37°C por 24 horas em estufa com tensão constante de 5% de CO₂. Em seguida, os sobrenadantes obtidos foram centrifugados a 4°C durante 10 min a 14.000 x g, aliquotados e estocados a -80°C até o momento da dosagem das citocinas e IFN- γ , IL-4 e IL-17.

Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da produção de citocinas

[068] A citocina IL-12 foi quantificada no sobrenadante das culturas de macrófagos estimuladas com a ssEno e as citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-17 foram quantificadas no sobrenadante da cultura de esplenócitos estimulados com a solução de antígeno (PSC).

[069] Todos os procedimentos foram feitos conforme as instruções dos fabricantes. Basicamente, placas de 96 poços foram recobertas com 100 μ L/poço de solução contendo anticorpos purificados de captura, diluídos em tampão apropriado. As placas foram incubadas a 4°C por 18 horas. Após a incubação, foram realizadas três lavagens com solução PBS-Tween 20 (0,05%) e as placas foram incubadas com 200 μ L/poço de solução de bloqueio (PBS contendo 10% SFB) durante 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas por três vezes e adicionou-se o padrão e 100 μ L/poço das amostras (sobrenadante). As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas por cinco vezes e incubadas com 100 μ L/poço com anticorpo anti-citocinas (anticorpo biotinilado mais Streptavidina-peroxidase) por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente as placas foram lavadas e foram adicionados 100 μ L/poço da solução do substrato. Desta vez, as placas foram incubadas sob proteção da luz durante 30

minutos. Após o tempo determinado a reação foi interrompida com a adição de 50 µL/poço de uma solução de H₂SO₄ 2N. A absorvância foi lida a 450 nm em um leitor de microplaca e as concentrações das citocinas foram calculadas por meio de uma curva padrão de concentrações conhecidas das citocinas em questão. Os resultados foram expressos em pg/mL.

[070] Como pode se observar na FIG. 2 (A, B, C e D), a indução das proteínas IL-10, IFN-γ, IL-4 e IL-17 não foi detectada na cultura de macrófagos ou esplenócitos, respectivamente estimulada com a rSsEno, sendo também evidente este resultado na estimulação de IL-10 para a formulação HA+rSsEno100 (FIG. 2 A). Porém, a produção de IFN-γ, IL-4 e IL-17 (FIG. 2 B, C e D) induzido no esplenócitos provenientes dos camundongos vacinados com a formulação HA+rSsEno100 sugere um padrão de resposta imune Th1, Th2 e Th17.

Ensaio de imunoproteção

[071] Para esse ensaio, cinco animais por grupo foram imunizados com 100 µL das formulações rSsEno100, HA+rSsEno100 ou PBS conforme mostrado anteriormente na Tabela 1. Sete dias após a segunda dose os camundongos foram infectados por via intraperitoneal com 1x10⁶ de leveduras de Ss250 em PBS e o efeito protetor induzido pelas formulações foi avaliado pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) no baço e no fígado 5 dias após o desafio. A escolha desse dia foi feita devido a elevada carga fúngica neste modelo de infecção.

[072] Para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), o baço e o fígado dos camundongos foram removidos assepticamente e macerados com auxílio de uma

seringa em placa de Petri estéril contendo 2 mL de PBS. Em seguida, 200 µl de uma diluição da suspensão celular desses órgãos foram plaqueados individualmente em placas de Petri contendo meio Mycosel. O número de UFC foi contado após três e sete dias de incubação à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos como o número de UFC/órgão.

[073] Conforme pode ser observado na FIG. 3 (A e B), a eficácia das formulações vacinais de gerar proteção foi avaliado por meio da imunoprofilaxia em animais imunizados com rSsEno100 ou HA+rSsEno100 e desafiados com a cepa Ss250, representativa do clade 1 (*S. brasiliensis*) considerado o mais virulento dentro do complexo *Sporothrix*. A resposta imune induzida por ambas as formulações diminuiu drasticamente o número de UFC no baço e no fígado em comparação ao grupo controle de infecção, sugerindo que a formulação HA+rSsEno100 pode ser utilizado como um potencial candidato vacinal contra a esporotricose.

[074] A proteção induzida pela formulação HA+rSsEno100 em camundongos desafiados com o fungo Ss250, reforça a hipótese de que provavelmente o perfil misto de resposta Th1/Th2/Th17 *in vitro* possa estar associado ao controle da infecção *in vivo*. É importante destacar que apesar de não ser detectada a produção *in vitro* das citocinas de IL-10, IL-4, IFN-γ e IL-17 no sobrenadante de macrófagos e esplenócitos provenientes dos camundongos imunizados com a rSsEno100 sozinha *in vitro*, provavelmente devido a dose escolhida para a estimulação, mesmo assim essa formulação reduziu a carga fúngica no baço e no fígado nos animais desafiados com Ss250, porém visualmente essa redução foi menor à gerada pela formulação com o adjuvante HA, o que

evidencia a importância do perfil imune gerado pela formulação HA+rSsEno100.

[075] Levando em consideração a forte reatividade cruzada evidenciada entre o soro anti-rSsEno com a superfície celular das leveduras de *S. schenckii* (Ss16345, Ss1099-18) e os dois isolados de gatos *S. brasiliensis* (Ss250 e Ss256), a formulação HA+rSsEno100 constitui um promissor candidato vacinal para a imunoprofilaxia multiespécie do complexo *Sporothrix*, o que sugere também que a enolase de *S. schenckii* presente na parede celular do fungo, demonstrado na presente invenção, seja uma proteína altamente conservada no gênero *Sporothrix* e que suas propriedades imunogênicas e de proteção induzidas neste estudo confirmam a hipótese do seu potencial uso para estratégias vacinais e/ou terapêuticas contra a esporotricose.

[076] Embora a invenção tenha sido amplamente descrita, está claro para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas visando aprimoramento do projeto sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação vacinal **caracterizada** pelo fato de compreender 1 mg da enolase de de *Sporothrix schenckii* rSsEnoO /0,9 mL de PBS misturada com 0,1 mL de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) a 2% na forma de uma suspensão coloidal estéril, livre de pirógenos e com um conteúdo de Al³⁺ entre 9-11 mg/mL, ressuspendido em PBS, em que a enolase foi obtida por via recombinante.

2. Formulação vacinal, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de induz altos títulos de anticorpos antígeno específicos contra a proteína alvo, enolase recombinante (rSsEno) e um perfil de resposta imune Th1/Th2/Th17.

3. Uso da formulação vacinal conforme definida na reivindicação 1 e 2, **caracterizado** pelo fato de ser para terapia profilática da esporotricose, especialmente contra o fungo *S. brasiliensis*, considerado o mais patogênico dentro do complexo.

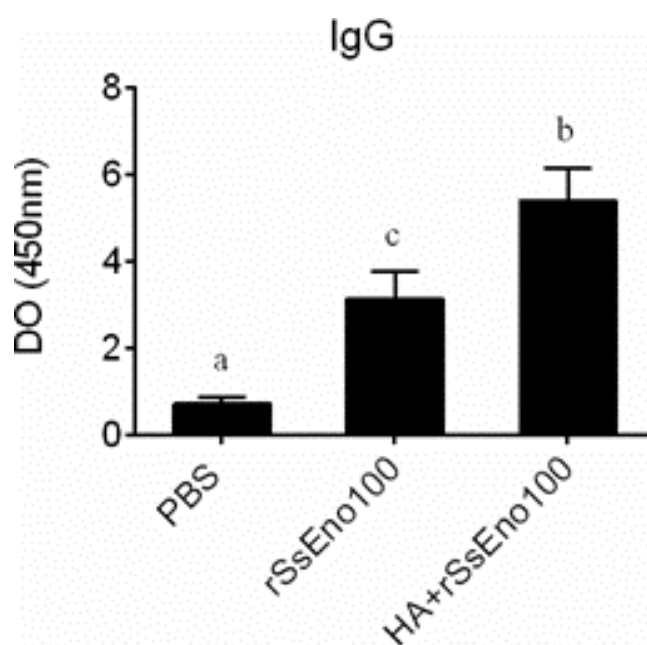


FIG. 1

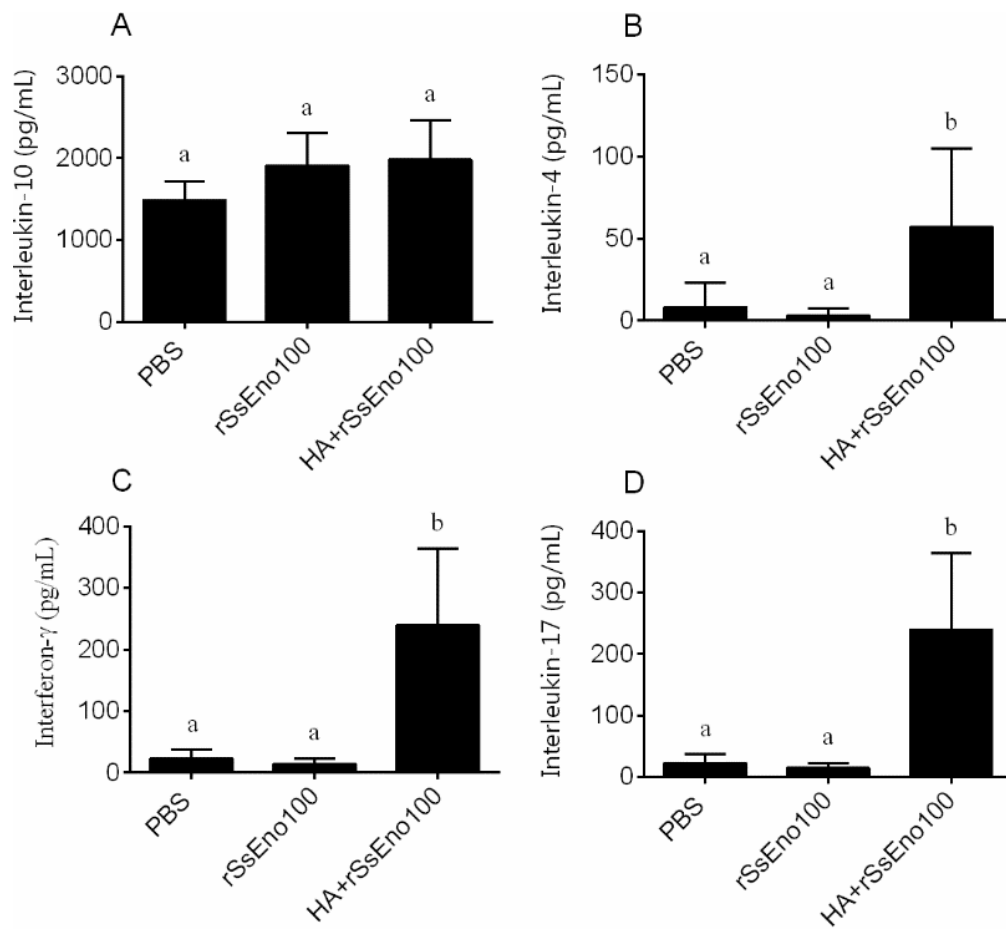


FIG. 2

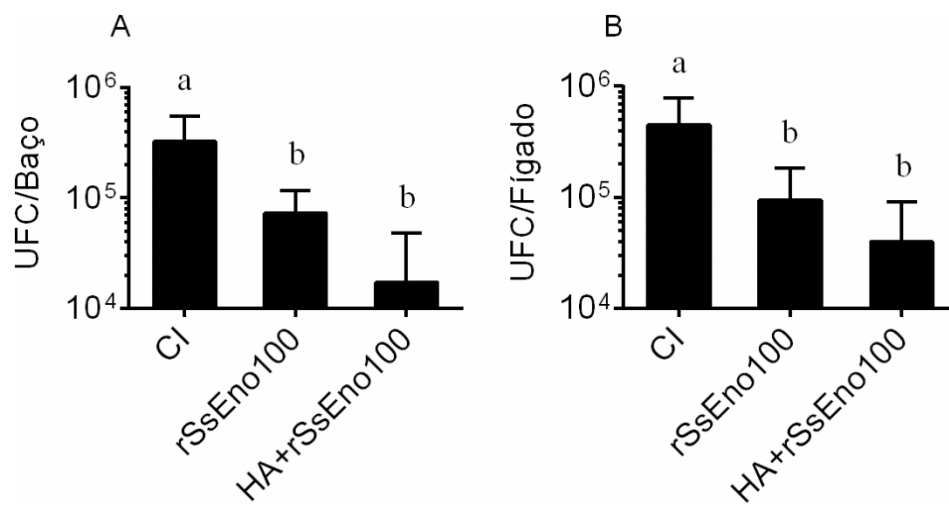


FIG. 3

RESUMO**FORMULAÇÃO VACINAL E USO DA MESMA**

A presente invenção refere-se a uma formulação vacinal contendo uma enolase recombinante de *Sporothrix schenckii*, a qual é purificada e associada ao adjuvante hidróxido de alumínio para uso na terapia profilática da esporotricose, especialmente contra o fungo *S. brasiliensis*, considerado o mais patogênico dentro do complexo. Adicionalmente, a referida formulação pode ser usada em associação ao tratamento antifúngico convencional e potencial uso em outras micoses sistêmicas auxiliando na medicina veterinária e humana. Isso devido ao fato da formulação induzir altos títulos de anticorpos antígeno específicos contra a proteína alvo (enolase recombinante - rSsEno) e um perfil de resposta imune Th1/Th2/Th17.