CLEISON LEDESMA TAIRA

Mapeamento de epítopos para desenvolvimento de vacina a partir do antígeno M de *Histoplasma capsulatum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2019

RESUMO

Histoplasma capsulatum é um fungo termodimórfico, encontrado de forma ubíqua na natureza. As regiões endêmicas incluem os vales do rio Ohio e Mississipi (EUA), a América Central e a América do Sul; no Brasil casos da doença e microepidemias vêm sendo descritos com maior frequência na região sudeste. O antígeno M é uma glicoproteína encontrada na parede do fungo e induz resposta imune tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença. Levando em consideração que a caracterização do antígeno M como candidato a vacina ainda não foi realizada é de grande importância a avaliação e identificação de epítopos que possam gerar novas ferramentas para utilização na prevenção da histoplasmose. Neste trabalho foram sintetizados peptídeos, a partir de análise *in silico* da sequência do antígeno M, com capacidade teórica de se ligar e serem apresentados por moléculas de MHC de classe II de camundongos C57BL/6. Das sequências geradas foram escolhidas e sintetizadas 12, entre as quais, três (peptídeo 6, 10 e 12) apresentaram resultados promissores na imunização profilática de camundongos contra a histoplasmose, diminuindo a carga fúngica nos pulmões e produzindo citocinas com perfil de resposta imune do tipo Th1 (peptídeo 12) e Th17 (peptídeo 10 e 12) em animais desafiados com inóculo subletal do fungo. Também foram identificados 9 peptídeos de *H. capsulatum* (naturalmente processados e apresentados), por espectrometria de massa, a partir de macrófagos infectados com leveduras, submetidos a imunoprecipitação para isolamento dos complexos MHC-II-peptídeo. Concluímos que metodologias de predição *in silico* são importantes e de grande utilidade para mapeamento de sequências peptídicas provenientes de proteínas imunogênicas, visto que, três peptídeos testados apresentaram resultados promissores na imunização de animais posteriormente desafiados com os fungos; em relação à metodologia de imunoproteômica para identificação de peptídeos apresentados por células APCs após fagocitose do fungo, acreditamos que essa técnica é promissora, pois as sequências peptídicas identificadas foram naturalmente processadas e apresentadas, tendo possibilidade de serem capazes de estimular o TCR e desencadear resposta imune de células T, sendo necessária confirmação com testes *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: *Histoplasma capsulatum*. Vacinas. Antígeno M. Peptídeos. Imunoproteômica.

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum is a thermodymorphic fungus, found ubiquitously in nature. Endemic regions include the valleys of the Ohio River and Mississippi (USA), Central America and South America; in Brazil disease cases and microepidemias have been described more frequently in the southeast region. M antigen is a glycoprotein found in the wall of the fungus and induces immune response in both acute and chronic phases of the disease. The characterization of the M antigen as vaccine candidate has not yet been performed and it is of great importance the evaluation and identification of epitopes that can generate new tools for use in the prevention of histoplasmosis. In this work, peptides from *in silico* analysis of protein antigen M sequence, with the theoretical ability to bind and be presented by MHC class II molecules of C57BL/6 mice, were synthesized. Twelve of the sequences generated were selected and synthesized, among which three (peptides 6, 10 and 12) showed promising results in the prophylactic immunization of mice against histoplasmosis, reducing the fungal load in the lungs and producing cytokines with Th1 response profile (peptide 12) and Th17 response profile (peptide 10 and 12) in animals challenged with sublethal inoculum of the fungus. Also, nine peptide sequences of *H. capsulatum* (naturally processed and presented) were identified by mass spectrometry from yeast-infected macrophages submitted to immunoprecipitation to isolate the MHC-II peptide complexes. We conclude that *in silico* prediction methodologies are important and useful for the peptide sequences mapping from immunogenic proteins, since three peptides tested showed promising results in the immunization of animals later challenged with fungi; in relation to the immunoproteomics approach for the identification of peptides presented by APC cells after phagocytosis of the fungus, we believe that this technique is promising because the identified peptide sequences were naturally processed and presented, being able to stimulate the TCR and trigger T cells immune response, confirming with in vitro and in vivo tests is still required.

Keywords: *Histoplasma capsulatum*. Vaccines. M antigen. Peptides. Immunoproteomics.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Histoplasma capsulatum*

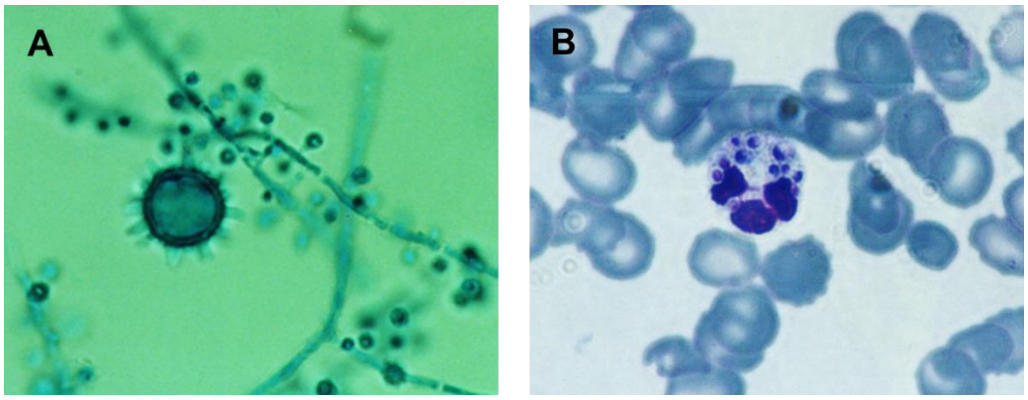
Histoplasma capsulatum é um fungo dimórfico, saprobionte, encontrado de forma ubíqua na natureza, disseminado pelo solo e poeira ricos em nitrogênio e ambientes contaminados por excrementos de aves, morcegos e outros mamíferos infectados (LACAZ et al., 2002; WHEAT, 1996), podendo ser isolado de visitantes, de grutas habitadas por morcegos ou de indivíduos que tiveram contato com galinheiros, pombais ou casas desabitadas com acúmulo de guano de morcegos (MUNIZ et al., 2001).

Este micro-organismo é termodimórfico. Macroscopicamente, em meio de cultura definidos, a temperatura ambiente, apresenta um desenvolvimento filamentoso, cresce como culturas brancas, algodonosas, de desenvolvimento lento. Já a 37° C, desenvolve-se em sua fase leveduriforme, formando colônias cremosas úmidas brilhantes e lisas. Microscopicamente, em temperatura ambiente, observam-se hifas hialinas delicadas, septadas, ramificadas, que produzem microconídios ou clamidoconídios lisos e equinulados e macroconídios tuberculados. A 37° C e em meios ricos, pode-se observar, microscopicamente, pequenas células leveduriforme medindo de 1 a 5 µm de diâmetro, que são encontradas, quando no tecido do hospedeiro, quase que exclusivamente no interior de macrófagos **(figura 1)**. As células leveduriforme, no meio de cultura, podem apresentar brotamento, o que raramente se observa nos tecidos (LACAZ et al., 2002).

Inicialmente o fungo foi classificado em três variedades [var. *capsulatum* (encontrado em todas as regiões); var. *duboisii* (encontrado na África) e var. *farciminosum* (isolado de cavalos)] de acordo com a morfologia, distribuição geográfica e manifestações clínicas (KOWN-CHUNG; BENNETT, 1992). Em 2003, Kasuga e colaboradores (2003) reclassificaram o fungo, por análise da sequência de DNA de quatro genes codificantes de proteínas independentes de 137 isolados dos seis continentes; oito grupos foram encontrados: *North American class 1 clade* (Nam 1); *North American class 2 clade* (Nam 2); *Latin American group A clade* (Lam A); *Latim American group B clade* (Lam B); *Australian* clade; *Netherlands clade*; *Eurasian clade* e A*frican clade*. Nesse estudo foi notado que todos os espécimes de

H. capsulatum var. *duboisii,* assim como, as outras duas variedades (var. *capsulatum* e var. *farciminosum*) estavam contidas no *African clade*, desta maneira, os resultados indicaram que as três variedades de *Histoplasma*, sugeridas anteriormente, não possuem sentido filogenético (KASUGA et al., 2003).

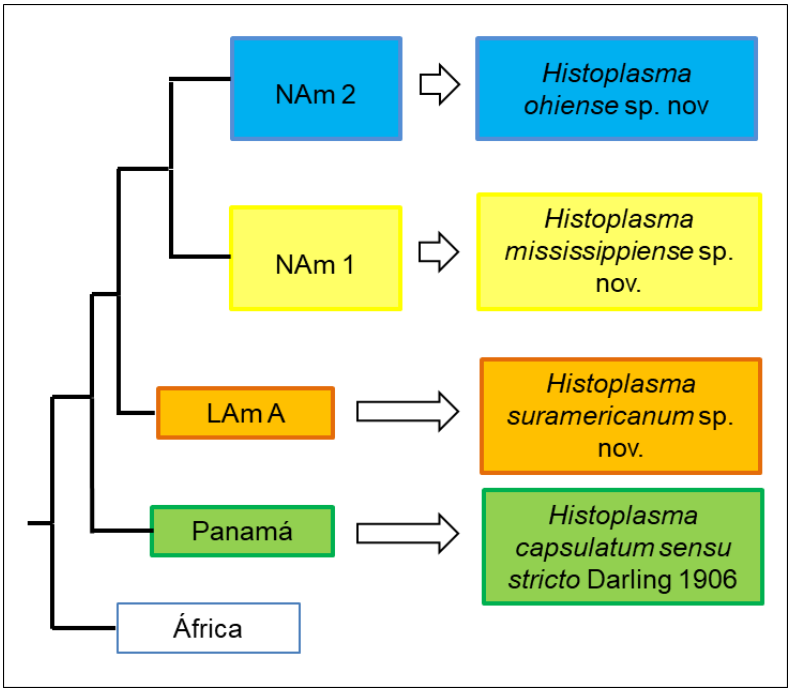
Figura 1 – Formas microscópicas do *H. capsulatum* a temperatura ambiente e a 37 °C.



(A) Forma filamentosa corada com Azul de Lactofenol (B) Forma de levedura infectando célula polimorfonuclear corada com Giemsa. Visualização em aumento de 1000x. (Fonte: Laboratório de Micologia Médica da UFMS)

Recentemente um novo estudo foi realizado por Sepúlvida e colaboradores (2017), onde foi analisado o genoma total de 30 isolados de *Histoplasma* de cinco dos sete grupos filogenéticos encontrados por Kasuga e colaboradores (2003) (Nam 1; Nam 2; Lam A; Linhagem H81 e *African clade*) sugerindo uma nova organização taxonômica do gênero com pelo menos quatro novas espécies crípticas: [*Histoplasma capsulatum sensu stricto* Darling 1906 (formalmente conhecido como linhagem do Panamá ou 81H); *Histoplasma mississippiense* sp. nov. (formalmente conhecido como Nam 1); *Histoplasma ohiense* sp. nov (formalmente conhecido com Nam 2) *; Histoplasma suramericanum* sp. nov. (formalmente conhecido com Lam A)] (SEPÚLVEDA et al., 2017) **(figura 2)**.

Figura 2 – Proposta de nova organização taxinômica dos grupos filogenéticos de *H. capsulatum* (Nam 1, Nam 2, Lam A e Panamá).



Esquema representa a proposta de criação de novas quatro espécies de *H. capsulatum* após análise do genoma de isolados pertencentes a grupos filogenéticos caracterizados por Kasuga e colaboradores (2003) (adaptado de: Sepúlvida et al., 2017).

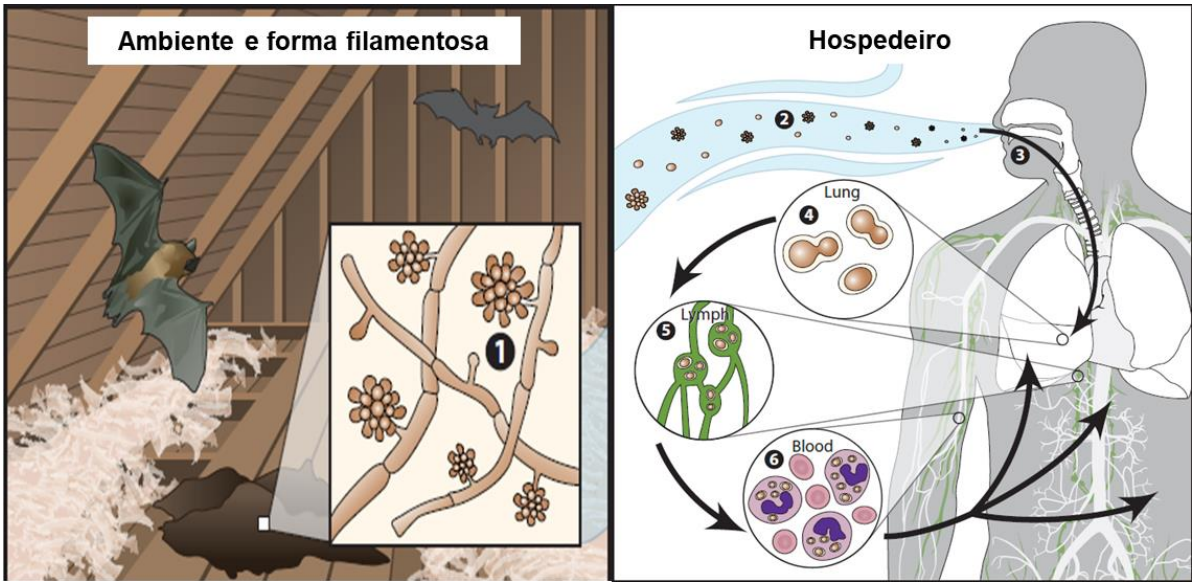
1.2 Histoplasmose e diagnóstico

A histoplasmose foi reportada pela primeira vez em 1906 por um patologista chamado Dr. Samuel Taylor Darling, que observou estruturas semelhantes à *Leishmainia* em um material de autopsia no Hospital Ancon, localizado na Zona do Canal do Panamá. O caso descrito foi o de um trabalhador proveniente de Martinique, onde foi observado, envolvimento generalizado pela doença, hepatoesplenomegalia e anemia, levando Darling a acreditar que a doença era causada por um protozoário. O nome *Histoplasma capsulatum* foi sugerido por Darling, devido aos histiócitos ("histio") aumentados e as estruturas "plasmodiumlike" observadas. A descrição correta do micro-organismo só foi realizada em 1912 pelo patologista brasileiro Henrique da Rocha-Lima que o classificou como fungo (SCHWARZ; BAUM, 1957).

A porta de entrada para *H. capsulatum* é através da inalação dos microconídios presentes no ar, os quais se transformam em leveduras após a infecção e rapidamente são ingeridos por macrófagos e neutrófilos **(Figura 3)**. O

fungo tem a capacidade de evitar a destruição intracelular podendo ser transportado por via linfática e corrente sanguínea, contudo a infecção inicial é normalmente contida pela resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro. Em indivíduos imunocompetentes a doença pulmonar é geralmente subclínica a limitada, no entanto pode ser fatal quando indivíduos saudáveis são infectados com grande quantidade de inóculo (MIHU; NOSANCHUK, 2012).

Figura 3 - Meio ambiente e forma de infectante do *H. capsulatum*.



Forma filamentosa do fungo presente no ambiente (1) é suspensa no ar (2) e são inaladas pelo hospedeiro susceptível (3). Transformam-se em levedura (37°C); no pulmão (4) são fagocitadas e transportadas para os linfonodos (5) e posteriormente para outros órgãos pela corrente sanguínea. (adaptado de: https://www.cdc.gov/fungal/diseases/histoplasmosis/causes.html).

A histoplasmose clássica é uma micose sistêmica causada por *H. capsulatum* var. *capsulatum*. Esta micose é relativamente rara, restrita a surtos epidêmicos, apresentando manifestações variadas, dependendo do estado imunológico do paciente. A histoplasmose ganhou renovada importância, dada sua maior frequência e por seu comportamento oportunista em paciente imunodeprimidos: tais como pacientes com AIDS, com câncer ou mesmos em crianças menores de um ano e pessoas idosas. Em tais casos, apresenta clínica, evolução e prognósticos mais graves podendo ser letal (WHEAT et al., 1990).

As manifestações clínicas da histoplasmose incluem desde a forma assintomática, pulmonar aguda, pulmonar crônica à infecção extrapulmonar disseminada. Indivíduos hígidos podem apresentar tosse, febre, dispneia e astenia em uma (reinfecção) a três (infecção primária) semanas após exposição ao fungo.

Os achados clínicos são diferentes dependendo se o hospedeiro foi previamente infectado ou não e também do tamanho do inóculo inalado (KAUFFMAN, 2007). Nos pacientes imunodeprimidos, principalmente nos portadores de HIV, doenças neoplásicas, transplantados e diabéticos, a infecção por *H. capsulatum* representa doença de alta gravidade e com sério risco de disseminação (KAUFFMAN, 2007; WHEAT; KAUFFMAN, 2003).

Estima-se que cerca de 90 a 95% dos indivíduos que se infectam por *H. capsulatum* não desenvolvem a doença ou apresentam sintomatologia clínica leve, com regressão espontânea dos sintomas. A gravidade da doença, em indivíduos imunocompetentes, parece estar relacionada ao tamanho da carga fúngica e ao tempo de exposição: períodos curtos, como 20 minutos, proporcionam sintomas leves; enquanto que uma exposição de 50 a 60 horas pode acarretar no desenvolvimento de doença grave e, por vezes, fatal (EISSENBERG; GOLDMAN, 1991; WHEAT; KAUFFMAN, 2003). A infecção aguda pode ainda levar a outras manifestações da doença, como, por exemplo, as formas cavitária crônica e a disseminada. A histoplasmose disseminada é a forma clínica mais grave e apresenta evolução potencialmente fatal decorrente da deficiência da imunidade celular do hospedeiro, estando intimamente relacionada às infecções oportunistas. Entre os possíveis hospedeiros estão: crianças com imaturidade imunológica, idosos debilitados, imunossuprimidos e indivíduos portadores do HIV (KAUFFMAN, 2007; WHEAT; KAUFFMAN, 2003).

Com o surgimento da AIDS, em 1981, observou-se aumento do número de casos de histoplasmose disseminada associada aquela patologia, apresentando-se como a primeira infecção oportunista combinada a outras infecções e/ou neoplasias, desencadeada provavelmente pelo despertar de processos pulmonares quiescentes, em pacientes residentes ou procedentes de zonas endêmicas. Este fato levou o CDC (*Center Diseases Control*), em 1985, quando não havia provas sorológicas e moleculares para a identificação do HIV, a incluir a histoplasmose disseminada como infecção “marcadora” da AIDS (WHEAT; KOHLER; TEWARI, 1986).

O diagnóstico definitivo para a maioria das micoses, incluindo histoplasmose, é a identificação do agente etiológico por processos histológicos e o isolamento do fungo em cultura, este último considerado o método padrão. Contudo, em algumas situações o estado físico ou clínico dos pacientes impossibilita o acesso ao local da lesão, impedindo assim a coleta do material biológico. O tempo prolongado (duas a

seis semanas) necessário para o crescimento e identificação em cultura, a dificuldade para diferenciar *H. capsulatum* de outros fungos em tecido e a necessidade de diagnóstico diferencial (*Leishmania* e *Toxoplasma*) são outros fatores que dificultam o diagnóstico da histoplasmose (LACAZ et al., 2002). Como alternativa ao diagnóstico micológico direto pode-se incluir os testes sorológicos como a imunodifusão e a pesquisa de anticorpos através de testes imunoenzimáticos como ELISA e *Western blot* (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1994a).

Os testes imunoenzimáticos, na histoplasmose, têm como finalidade procurar anticorpos contra os antígenos M e H que são originários da parede celular do fungo. No entanto há algumas limitações nesses testes como reações cruzadas com outros micro-organismos. Grande parte dessas reações cruzadas é devido aos carboidratos presentes na parede celular (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1994b).

1.3 Epidemiologia

H. capsulatum é endêmico nos vales dos rios Ohio e Mississipi (EUA), América Central e América do Sul e há microfocos no leste dos Estados Unidos, sul da Europa, África e sudeste da Ásia (KAUFFMAN, 2009). Várias microepidemias de histoplasmose têm sido descritas quando ambientes abrigando o fungo são alterados por atividades humanas tais como exploração de cavernas, demolições de construções antigas, arrumações de acampamentos, desflorestamentos, urbanização maciça em locais antes ocupados pela natureza, trabalho em locais de risco manuseando solos ricos em componentes orgânicos, limpeza de galinheiros (JIMÉNEZ et al., 2002).

Em 2018, Adenis e colaboradores (2018) avaliaram 1310 artigos publicados até o ano de 2015 e estimaram a prevalência de exposição prévia de pessoas ao *H. capsulatum* (por análise dos inquéritos epidemiológicos com histoplasmina) (**figura 4**) e a incidência anual de histoplasmose associada ao HIV em países da América Latina, nesse estudo, áreas com prevalência de exposição ao fungo maior que 30% e com incidência de casos de histoplasmose associado ao HIV maior que 1,5 casos por 100 pessoas doentes, foram considerados como área de maior risco, sendo elas: América Central, regiões mais ao norte da América do Sul e Argentina (ADENIS et al., 2018).

Figura 4 - Estimativa média de prevalência de exposição prévia da população ao *H. capsulatum* na América Latina.

Mapa demonstrando estimativa média da prevalência em porcentagem (diferenciada por cores) da exposição da população ao *H. capsulatum* em cada país da América Latina. (adaptado de: Adenis et al., 2018).

No Brasil, a incidência da histoplasmose tem sido demonstrada pela observação de casos clínicos, seja sob a forma de casos isolados ou sob a forma de microepidemias; bem como pela realização de inquéritos epidemiológicos empregando o teste cutâneo com histoplasmina (LACAZ et al., 2002). Em estudo realizado por Prado e colaboradores (2009), no período de 1996 a 2006 demonstrou-se que a histoplasmose vem crescendo como causa de morte associada ou não com a AIDS. Nesse período observou-se que dentre todas as micoses sistêmicas, a histoplasmose está como a terceira causa de morte em pacientes com AIDS e que a região do Brasil mais afetada pela doença é a região sudeste acometendo mais pessoas com idade entre 30 a 50 anos do sexo masculino (PRADO et al., 2009).

Casos da doença, microepidemias e isolamento do fungo de animais têm sido relatados principalmente na região nordeste e sudeste do Brasil (CORREIA et al.,

2016; CURY et al., 2001; DEUS FILHO et al., 2009; FAIOLLA et al., 2013). Em trabalho realizado em 2011, foram analisados 2427 morcegos no período de cinco anos (2003 a 2008) e *H. capsulatum* foi isolado de 87 (3,6%), um dado relevante, pois demonstra a presença do fungo em áreas densamente povoadas como São Paulo (DIAS et al., 2011). Em estudo similar e mais recente, na região centro-oeste do estado de São Paulo foram analisados 172 morcegos e a prevalência para infecção foi de 8,1%, reforçando a importância dos morcegos como agentes dispersantes do fungo por ambientes urbanos (DA PAZ et al., 2018). Outras áreas do Brasil também têm relatado casos de histoplasmose, como no estado do Mato Grosso do Sul (CHANG et al., 2007), Goiás (DA SILVA FERREIRA et al., 2017), Santa Catarina (OLIVEIRA; UNIS; SEVERO, 2006), Rio Grande do Sul (SEVERO et al., 2001).

Além de centros urbanos, um forte indicativo da presença do fungo em cavernas de vários estados do país foi descrito por Vicentine e colaboradores (2012) ao avaliar amostras de soro de profissionais com atividades relacionadas a cavernas (15 biólogos), através de testes sorológicos (*immunoblotting*), detectando anticorpos contra antígenos especifico de *H. capsulatum* em 94,1% das amostras analisadas. O questionário epidemiológico revelou que as cavernas visitadas estavam distribuídas por todas as regiões do Brasil, sendo a sua maioria localizada nas regiões sudeste e centro-oeste (VICENTINI et al., 2012).

1.4 Mecanismos de virulência

A patogênese do fungo pode ser observada a partir do seu contato com o hospedeiro, quando a forma de micélio perde sua atividade metabólica, na temperatura corpórea, e ocorre a mudança para forma de levedura (MITTAL et al., 2018). Essa mudança morfológica é geralmente regida por reguladores transcricionais que desencadeiam a cascata de expressão gênica (NGUYEN; SIL, 2008). Nguyen e Sil (2008) identificaram o gene RYP1 (*required for phase growth*) que é necessário para o crescimento da forma de levedura a 37°C e demonstraram que cepas sem esse gene não conseguiam sair da forma filamentosa, independente da temperatura. Posteriormente foram identificados os genes RYP2 e RYP3 (WEBSTER; SIL, 2008) e o gene RYP4 (BEYHAN et al., 2013), todos envolvidos na morfogênese do fungo.

Histoplasma capsulatum possui diverso mecanismos de virulência, os quais estão principalmente associados a moléculas expressa em sua superfície. Essas moléculas são responsáveis pela interação do fungo com as células do sistema imune do hospedeiro, dessa maneira, possuem grande importância para sobrevivência do patógeno, evitando sua destruição pelo sistema imune inato, permitindo sua multiplicação e sobrevivência (MIHU; NOSANCHUK, 2012).

Os principais receptores de superfície em macrófagos alveolares são: LFA-1 (CD11a/CD18), CR3 (CD11b/CD18) e CD4 (CD11B/CD18) (BULLOCK; WRIGHT, 1987). A *Heat Shock Protein* 60 (HSP60) é considerada o mais importante ligante do fungo aos macrófagos, essa proteína é reconhecida pelo receptor CR3 (CD11/CD18) e essa interação é a provável razão pela qual o fungo consegue entrar na célula sem desencadear o *burst* oxidativo (EISSENBERG; GOLDMAN, 1987; LONG et al., 2003).

A parede celular dos fungos é composta por grande quantidade de carboidratos, podendo chegar até a 80%. Os açucares α e β-glucanas fazem parte da composição da parede de *H. capsulatum*, os quais são estruturas antigênicas e são importantes no reconhecimento e modulação da resposta imune do hospedeiro (GUIMARÃES; CERQUEIRA; NOSANCHUK, 2011). Em 2001, Brown e Gordon demostraram que a Dectina-1 era o receptor responsável pelo reconhecimento das *β*-glucanas, e era capaz de mediar à fagocitose não opsonizada de patógenos oportunistas, pelo reconhecimento desses açucares (*β*-1,3-linked e *β*-1,6-linked glucanas) (BROWN; GORDON, 2001). A presença de *α*-(1,3) glucana é um importante fator de virulência do fungo; Rappleye e colaboradores (RAPPLEYE; EISSENBERG; GOLDMAN, 2007) demonstram que a *α*-(1,3) glucana presente na parede do *H. capsulatum* é capaz de bloquear sua detecção pelos receptores padrões de reconhecimento (RRPs) dos macrófagos do hospedeiro, mascarando sua presença e desta maneira evitando o início da resposta desencadeada pela detecção do fungo pelo receptor Dectina-1 (RAPPLEYE; EISSENBERG; GOLDMAN, 2007).

Após ser fagocitado, para poder sobreviver, o *H. capsulatum* precisa superar várias adversidades nesse novo ambiente, como: a produção de espécies reativas de oxigênico e nitrogênico; a acidificação do fagossomo e fusão deste com lisossomo e a escassez de nutrientes essenciais (ferro e cálcio) para sua sobrevivência (MITTAL et al., 2018).

Um mecanismo de sobrevivência importante, responsável pela resistência do fungo as espécies reativas de oxigênio (ROS), é a produção da superóxido desmutase Sod3, secretada e associada a superfície celular. A função atribuída a Sod3 foi confirmada observando-se que cepas de *H. capsulatum* não produtoras de Sod3 eram susceptíveis a morte por macrófagos e polimorfonucleares que produziam ROS (YOUSEFF et al., 2012). Outras enzimas importantes para sobrevivência da levedura frente à produção de ROS são as catalases B e P (CatB e CatP). Holbrook e colaboradores (2013) confirmaram experimentalmente que essas duas enzimas fornecem proteção moderada ao fungo contra macrófagos dependentes da produção de ROS *in vitro* (HOLBROOK et al., 2013).

A produção de óxido nítrico (NO) pela célula é outro mecanismo para restringir o crescimento do fungo, entretanto sua ação é apenas fungistática, não sendo capaz de mata-lo (NAKAMURA; WU-HSIEH; HOWARD, 1994). A infecção persistente por *H. capsulatum* é devido a sua capacidade de sobreviver à exposição às espécies reativas de nitrogênio (RNS); para entender esse fenômeno Nittler e colaboradores (2005), utilizaram a técnica de *shotgun genome microarray* para traçar o perfil transcriptacional de *H. capsulatum* em relação aos compostos geradores de NO e foi encontrado um gene, o NOR1, que codifica uma proteína com sequência homologo a proteína P450 oxido nítrico redutase, sendo essa proteína suficiente para aumentar a resistência do fungo aos RNS em cultura (NITTLER et al., 2005).

Para um patógeno sobreviver no hospedeiro, o ferro é um nutriente essencial, pois é um co-fator de muitas enzimas metabólicas do micro-organismo. Em *H. capsulatum* já foram observados pelo menos três mecanismos para obter ferro do meio e do hospedeiro, que são: produção do quelante *hydroxamate sideropore rhodotorulic acid,* capaz de quelar o ferro da proteína transferrina do hospedeiro; habilidade de secretar três diferentes redutores de ferro (*reduced glutathione-dependent enzymatic redutase*; redutores não enzimáticos de baixo peso molecular e uma *cell surfasse reducing activity*) e capacidade de utilizar o “complexo de multi-copper oxidade” (FET3) e uma permeasse férrica (FTR1) que possuem alta afinidade para transportar ferro (III) (HILTY; GEORGE SMULIAN; NEWMAN, 2011).

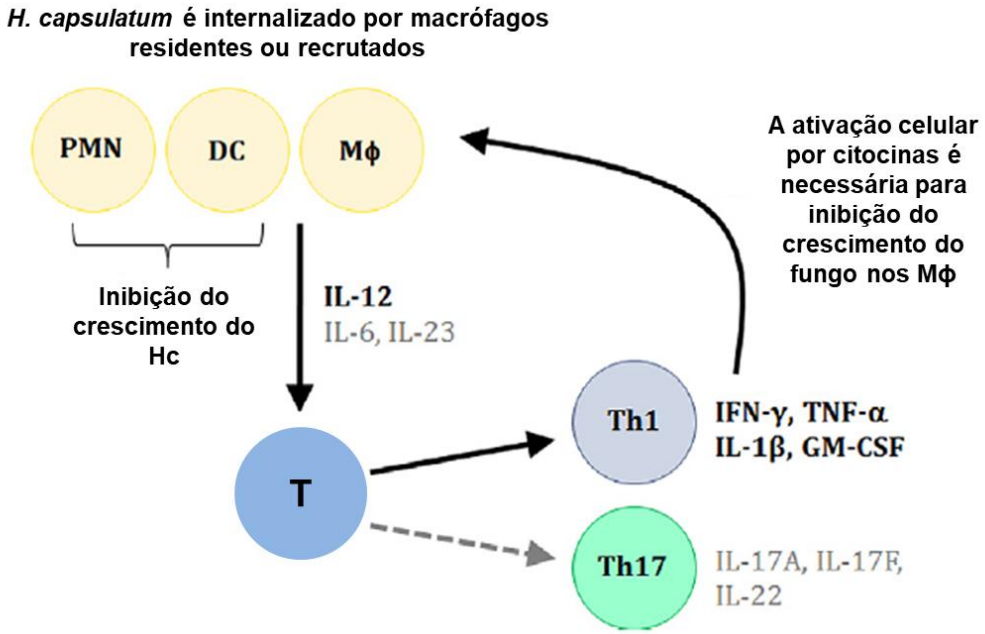
Outra proteína importante secretada pela levedura de *H. capsulatum* é a *calcium-binding protein* (CBP), responsável pelo seu crescimento em condições de cálcio limitado. Sebghati e colaboradores (2000) observaram que isolados de *H.*

capsulatum sem o gene CBP1, responsável por codificar a CBP, perdiam a capacidade de destruir macrófagos *in vitro*, demonstrando que essa proteína é importante no parasitismo intracelular do fungo, possibilitando sua sobrevivência (SEBGHATI; ENGLE; GOLDMAN, 2000).

1.5 Resposta imune

A produção de citocinas do tipo Th1 (IFN-γ, TNF-α) é o perfil de resposta necessário para proteção contra a infecção causada por *H. capsulatum,* sendo a produção de IFN-γ crucial na infecção primária e a produção de TNF-α em uma infecção secundária. Várias células participam da resposta contra o micro-organismo, desde a resposta inicial (inata) com participação de macrófagos, células polimorfonucleares, células NK (*natural killer*) e células dendríticas até o início da resposta adaptativa, onde células T (CD4 e CD8) têm grande importância no controle e *clearence* do micro-organismo no hospedeiro. Os macrófagos também têm importância na produção de citocinas que podem polarizar uma resposta protetora do tipo Th1 ou Th17 **(Figura 5)** (CAIN; DEEPE, 1998; KROETZ; DEEPE, 2012).

Figura 5 - Esquema de resposta imune protetora contra histoplasmose.



Após entrar no hospedeiro, o fungo é internalizado por macrófagos (Mϕ), polimorfonucleares (PMN) e células dendríticas (DC). Os macrófagos quando não ativados permitem a sobrevivência e

multiplicação do micro-organismo, já polimorfonucleares e células dendríticas inibem seu crescimento. As citocinas IL-12, IL-6 e IL-23 são produzidas durante a resposta inata e podem polarizar a respostas de células T (T) para o tipo Th1 (IFN-γ, INF-α, IL-1β, GM-CSF) ou para o tipo Th17 (IL-17A, IL-17F, IL-22). (adaptado de: KROETZ; DEEPE, 2012).

Após ser inalado, *H. capsulatum* é primeiramente reconhecido por receptores presentes nas células do sistema imune, os chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Nos macrófagos a Dectina-1 é responsável pela detecção das β-glucanas presentes na parede celular, mediando à fagocitose do fungo (BROWN; GORDON, 2001). Após a entrada no macrófago, vários processos são iniciados pela célula contra a levedura, como: acidificação do fagossoma, produção de ROS e RNS e a diminuição de disponibilidade de ferro e zinco na célula (MITTAL et al., 2018).

Células dendríticas (DCs) também são capazes de fagocitar o fungo, entretanto, o reconhecimento do patógeno é realizado pelo receptor de fibronectina. Gildea e colaboradores (2001) demonstraram que DCs humanas são capazes de fagocitar, processar e apresentar as leveduras, estimulando a proliferação de linfócitos, sugerindo que essas células podem facilitar a indução de uma resposta imune celular (GILDEA; MORRIS; NEWMAN, 2001). Outra função importante relacionada às DCs é a capacidade de realizar apresentação cruzada de antígeno de *H. capsulatum*, após a levedura ou macrófagos em processo de apoptose contendo antígenos do fungo, ser fagocitado ou captados por essas células, estimulando a proliferação de células T CD8, como foi observado por Lin e colaboradores (2005).

H. capsulatum apresenta resistência à morte pelo mecanismo de *burst* oxidativo dos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) murino, demonstrado em experimentos *in vitro* por *Kurita e colaboradores* (1991). Todavia, Newman e colaboradores (1993) observaram PMNs humanos possuem potente atividade fungistática contra o fungo, principalmente quando a proporção de PMNs é muito maior em relação às leveduras (10:1 a 50:1). Os granulos azurofilos são os principais responsáveis pela atividade fungistática dessas células, que reconhecem o fungo pelos receptores de complemento CR tipo 1, CR3 e FcR III (CD 16), sendo necessário a opsonização das leveduras para se observar o efeito fungistático sobre o fungo (NEWMAN; GOOTEE; GABAY, 1993).

É de vital importância caracterizar o perfil de células na resposta inflamatória e de produção de citocinas durante a infecção pulmonar por *H. capsulatum*, para

compreender as alterações que ocorrem na imunidade do hospedeiro, desta maneira Cain & Deepe (1998) avaliaram a evolução da resposta imune primaria em pulmões de camundongos (C57BL/6) infectados, via intranasal, com leveduras do fungo, comparando os tipos celulares de animais controle (não infectados) e infectados e mensurando os níveis de citocinas, de maneira indireta, por PCR, detectando os níveis de mRNA (CAIN; DEEPE, 1998). Ao analisar a resposta inflamatória celular, foi observado o aumento inicial de células da linhagem mieloide no dia 5 (após infecção), seguido de macrófagos, PMNs e células Natural Killer (NK), com picos máximos no dia 7 e aumento de células T no dia 10. Durante o curso da infecção, os primeiros transcritos específicos detectados foram a IL-12 e IL-4, seguido de IL-2 e IFN-γ (dia 5 ao dia 10). A detecção prévia de transcritores específicos de IL-12 é justificada, pois, é uma das primeiras citocinas produzidas após infecções por parasitas intracelulares e sua secreção estimula a produção de IFN-γ. A produção de IFN-γ durante a infecção primária foi atribuída a células T e NK, após serem isoladas por “cell sorting” e o IFN-γ ser dosado no citoplasma, sendo encontrado em elevadas quantidades (CAIN; DEEPE, 1998).

Um mecanismo importante na resposta imune contra micro-organismos intracelulares é o mediado por células T citotóxicas (CTL), como o que envolve as perforinas, que são glicoproteínas com capacidade de se ligar a membrana celular de formar poros, sendo expressas principalmente por células T CD8, células NKs e células T γ δ (KÄGI et al., 1996). A importância das perforinas, na infecção por *H. capsulatum*, foi descrita pela primeira vez por Zhou e colaboradores (2001) utilizados camundongos com deficiência na produção de perforinas *knockout* (PfKO) que quando desafiados com o fungo apresentavam aumento da carga fúngica e morte acelerada; para correlacionar a atividade citolítica das perforinas as células NK, foi realizado um ensaio utilizando células YAC-1 como alvo, onde os resultados sugeriram que a atividade citolítica mediada por essas células pode ser importante no controle inicial do fungo (ZHOU et al., 2001).

Trabalhos vêm demonstrando que as células T possuem papel essencial na resposta e resistência à infecção por *H. capsulatum* (ALLENDÖRFER; BRUNNER; DEEPE, 1999; CAIN; DEEPE, 1998; DEEPE, 1994). Cain e Deepe (CAIN; DEEPE, 1998) observaram migração de células T CD4 e CD8 na resposta inflamatória pulmonar em camundongos a partir do décimo dia de infecção e a produção de grande quantidade de IFN-γ, citocina chave na defesa contra a infecção, por essas

células. Em outro estudo, animais com células T CD4 depletadas tiveram comprometimento na produção de IFN-γ quando infectados com o fungo e animais com depleção das células CD4 e CD8 desafiados com uma infecção secundária tiveram sobrevida diminuída (ALLENDÖRFER; BRUNNER; DEEPE, 1999). Em 1994, resultados de Deepe (1994) indicaram a necessidade de células T CD8 para eliminação total do fungo do tecido de animais infectados com *H. capsulatum*, para demonstrar esses dados, camundongos foram tratados com anticorpos anti-CD8 e posteriormente desafiados (DEEPE, 1994).

Outras citocinas relacionadas a uma resposta protetora contra a infecção são a IL-17 e IL-23, as quais podem promovem uma resposta protetora do tipo Th17, como foi demostrado em animais com deficiência na produção de IL-12 desafiados com o fungo, sugerindo que existe um papel regulatório dessa citocinas em camundongos infectados com *H. capsulatum* com deficiência de resposta imune do tipo Th1 (DEEPE; GIBBONS, 2009). Em trabalho mais recente foi observado que animais imunossuprimidos, com falta de células CD4, podiam ser vacinados com sucesso contra infecção letal de *H. capsulatum* ou *Blastomyces dermatitidis* com vacina indutora de resposta mediada por células Tc17 (células T CD8 produtoras de IL-17) (NANJAPPA et al., 2012). Já citocinas relacionadas a uma resposta imune do tipo Th2, como IL-4 e IL-10, estão relacionadas ao aumento da mortalidade de animais infectados com o fungo (MIHU; NOSANCHUK, 2012).

A resposta humoral tem um papel limitado na histoplasmose, visto que altos títulos de anticorpos, no soro, específicos contra *H. capsulatum* não estão correlacionados com proteção contra a doença, entretanto há relatos de resposta imune protetora em animais tratados com anticorpos monoclonais (mAbs) (GUIMARAES et al., 2009; NOSANCHUK et al., 2003). Nosanchuk e colaboradores (2003), ao administrar mAbs, provenientes de animais vacinados com leveduras inativadas por aquecimento, em camundongos, antes de serem infectados com o fungo, observaram menor inflamação nos pulmões e diminuição da carga fúngica nos órgãos desses animais, quando comparados ao controle (NOSANCHUK et al., 2003). Outros mAbs que apresentaram capacidade protetora contra a infecção por *H. capsulatum* foram os obtidos a partir da proteína HSP60 (IgG1 e IgG2a) que prolongaram a sobrevida de animais tratados e desafiados com o fungo e tiveram a capacidade de induzir a produção de citocinas associadas a resposta do tipo Th1 (IL-2, IL-12 e TNF-α) (GUIMARAES et al., 2009).

1.6 Antígeno M

A parede celular é de importância vital para a célula fúngica, pois é responsável pela proteção contra danos mecânicos, além de atuar com uma barreira filtrante para moléculas (CABIB et al., 1997) e apresenta em sua porção externa, moléculas glicosiladas que estão envolvidas em importantes funções biológicas como a patogenicidade e virulência, além de ser uma fonte significante de antígenos (LÓPEZ-RIBOT et al., 2004).

Os antígenos H e M de *H. capsulatum*, são glicoproteínas e estão localizadas na parede do fungo. Estes antígenos podem provocar tanto uma resposta imune humoral quanto adquirida (HARRIS; DEEPE, 1988), também estão envolvidos na patogênese da histoplasmose.

O antígeno M é considerado imunodominante, pois anticorpos contra esse antígeno são os primeiros a surgirem na histoplasmose aguda, além de poder ser detectado durante o todo o curso da doença (WHEAT et al., 1982). Essa proteína foi previamente purificada utilizando métodos cromatográficos e caracterizada por uma combinação de ensaios imunoquímicos, sendo observado que sua massa molecular varia de acordo com a glicosilação (70-94 kDa), além de possuir epítopos específicos e não específicos tanto proteicos quanto glicosídicos (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1993, 1994a, 1994b).

Em 2008, Guimarães e colaboradores (2008) expressaram e purificaram a proteína antígeno M recombinante, onde o cDNA amplificado do gene que codifica a proteína M foi digerido com as enzimas de restrição e ligado ao vetor de expressão pQE40 (Qiagen); após esse processo, o produto obtido foi utilizado para transformar cepas *Escherichia coli* M15 (Qiagen) e as colônias positivas para presença do plasmídeo foram utilizadas para expressão da proteína recombinante (GUIMARÃES et al., 2008). Nesse trabalho foi demonstrado que essa molécula está localizada na parede do fungo na fase de micélio além de estar presente na superfície da levedura e que atua como uma catalase, possuindo importância na virulência do fungo, visto que essa proteína pode estar envolvida na proteção contra o estresse oxidativo (GUIMARÃES et al., 2008).

1.7 Vacina contra histoplasmose

O conceito de desenvolvimento de vacinas contra fungos continua a ser viável, mas não atraiu muita atenção por causa da incidência relativamente baixa de infecção e a distribuição geográfica limitada de diversos fungos em relação a muitas doenças virais, bacterianas e parasitárias. No entanto, com o aparecimento da AIDS e o uso de potentes terapias imunossupressoras para combater as doenças autoimunes, neoplasias e rejeição de transplante renovou-se o interesse no desenvolvimento de vacinas contra diversas micoses. O grande desafio para o desenvolvimento de vacinas fúngicas é a identificação de epítopos imunologicamente ativos que possam promover a eliminação desses organismos (CUTLER; DEEPE; KLEIN, 2007).

A pesquisa de imunógenos protetores para histoplasmose é de longa data. Estudos preliminares mostraram que o extrato de etilenodiamina proveniente da própria parede de *H. capsulatum* pode conferir proteção contra o fungo em modelos experimentais de histoplasmose (GARCIA; HOWARD, 1971).

Estudos mais recentes demonstraram que a imunização com a molécula recombinante HSP60 confere uma resposta protetora em diferentes linhagens de camundongos infectados, com um inóculo letal de *H. capsulatum*, sendo capaz de estimular a produção de células T $CD4^+$ e de citocinas como IL-10, IL-12 e IFN-γ (GÓMEZ; RHODES; DEEPE, 1991). Em outro trabalho, a HSP60 foi mapeada e segregada em polipeptídeos e após imunização com uma das sequências (porção F3) observou-se a redução da carga fúngica e aumento da sobre vida dos animais (DEEPE; GIBBONS, 2002). Os resultados obtidos com a HSP60 mostraram-se promissores, entretanto o uso dessa proteína como vacina está limitado, devido a sua alta homologia com a HSP60 humana, o que pode causar uma reação autoimune (DEEPE, 2004).

Outra proteína estudada no desenvolvimento de vacina contra a histoplasmose foi o antígeno H. No primeiro trabalho camundongos BALB/c foram imunizados com o antígeno H recombinante, no entanto esta imunização não demonstrou proteção em animais infectados com doses subletais e letais de leveduras do fungo, sugerindo que a proteína não gerava uma resposta suficiente para proteger os animais (DEEPE; DUROSE, 1995). Estudos posteriores demonstraram que camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados com antígeno H e

infectados por via nasal, quatro semanas após a vacinação, foram protegidos contra inóculos letais e subletais de leveduras de *H. capsulatum*. A vacinação foi associada com a produção de IFN-γ, GM-CSF, IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos. Esses dados sugerem que o antígeno H pode ser importante como um imunógeno protetor contra histoplasmose pulmonar (DEEPE; GIBBONS, 2001). Contudo os estudos com essa proteína não foram continuados.

1.8 Complexo de histocompatibilidade e ligação MHC-peptídeo

Os principais mecanismos de defesa utilizados por organismos superiores para combater patógenos são os de imunidade celular (célula T mediada) e humoral (anticorpo mediada), nesse processo antígenos intactos são reconhecidos por anticorpos enquanto células T, através de receptores, identificam material “não próprio”, pelo reconhecimento de antígenos apresentados pelo Complexo de Histocompatibilidade (MHC), todavia a resposta imune só será iniciada se o peptídeo apresentado for antigênico (RUDOLPH; STANFIELD; WILSON, 2006).

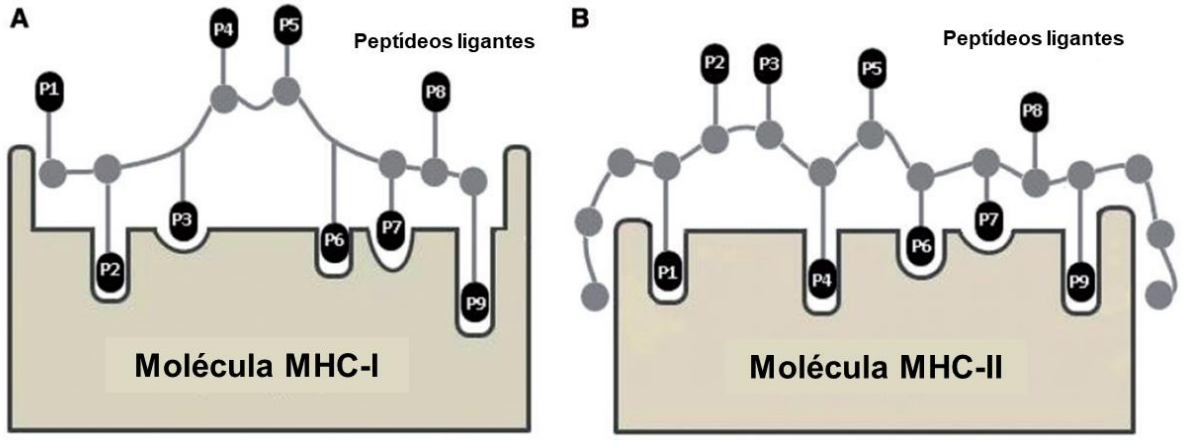
Os linfócitos T são capazes de reconhecer antígenos como peptídeos associados ao MHC, nesse processo estão envolvidos os Receptores de Células T (TCRs) e peptídeos antigênicos apresentados (BRUSIC; FLOWER, 2004; RÖTZSCHKE et al., 1991). Uma grande variedade de TCRs são expressos, os quais reconhecem moléculas presentes na superfície de outras células, os MHCs, que têm a capacidade de se complexar com pequenos fragmentos de peptídeos derivados de proteínas processadas de patógenos ou do próprio hospedeiro, entretanto alguns complexos (antígeno-MHC) são reconhecidos pelos TCRs enquanto outros não, quando reconhecidos são capazes de desencadear uma resposta imune e esse peptídeo, acoplado ao MHC, pode ser referido como epítopo de células T (BRUSIC; FLOWER, 2004; RUDOLPH; STANFIELD; WILSON, 2006).

Os peptídeos são produtos do processamento que ocorre nas células APCs, as quais são responsáveis pela proteólise das proteínas e possuem dois principais sistemas de processamento. O primeiro é dependente do proteosoma e do imunoproteosoma, estruturas responsáveis pela quebra das proteínas alvos e formação dos peptídeos que serão capazes de se ligar ao MHC-I. O segundo é realizado pelo lisossoma, ou seja, proteínas exógenas são internalizadas pela célula e degradadas por proteólise lisossomal; esse mecanismo pode ser iniciado por

endocitose, quando a proteína é endocitada, formando uma vesícula que sofre um processo de amadurecimento (“early endosomes e late endossomes”) até ocorrer a fusão com o lisossoma (endolisossoma) ou pela fagocitose, onde partículas inteiras são fagocitadas, formando o fagossoma que se funde ao lisossoma (fagolisossoma), e ocorre a ação de proteases (catepsinas), degradando a partícula em peptídeos curtos utilizados para síntese de novas proteínas da célula ou ocorre uma ação proteolítica menor gerando peptídeos que se ligarão ao MHC-II e serão apresentados pelas células APCs (BLUM; WEARSCH; CRESSWELL, 2013; HUOTARI; HELENIUS, 2011; MAUPIN-FURLOW, 2012).

Na apresentação de fragmentos de peptídeos estão envolvidas principalmente duas classes de moléculas de MHC, que são as de classe 1 (MHC-I) e de classe 2 (MHC-II). Estruturalmente as duas classes são heterodimeros e possuem arquitetura e topografia similares, sendo formadas por um superdomínio α-helix/β-sheet (α β), local onde o peptídeo se liga, e dois domínios “Ig-like”, entretanto o local de ligação de peptídeo de cada classe é diferente, no MHC-I a região (domínio α_1 α_2) é formada por uma cadeia pesada e uma subunidade de cadeia leve (β_2-microglobulina); no MHC-II a região de ligação de peptídeo é constituída por duas cadeias pesadas (domínio α_1 β_1) (LIAO; ARTHUR, 2011; RUDOLPH; STANFIELD; WILSON, 2006). Apesar da diferença nas subunidades que constituem as classes, a fenda de ligação de peptídeo, em ambas é composta por duas α-hélices antiparalelas que comprimem e formam o local que o peptídeo pode se ligar, e sete β-hélices anti-paralelas localizadas na base da fenda, propiciando a especificidade de ligação dos “peptides binding pockets” (HOLLAND; COLE; GODKIN, 2013; RUDOLPH; STANFIELD; WILSON, 2006). Outra característica do local de ligação de peptídeo no MHC-I é a forma da fenda de encaixe, a qual é quase fechada permitindo a ligação de peptídeos menores (aproximadamente 8 a 11 resíduos), enquanto no MHC-II é mais aberta o que permite o acoplamento de peptídeos maiores (aproximadamente 12 a 25 resíduos), esse maior espaço aumenta a complexidade da interação peptídeo-MHC **(figura 6)** (LIAO; ARTHUR, 2011).

Figura 6 - Esquema de ligação de peptídeo aos “pockets” da fenda da molécula de MHC.



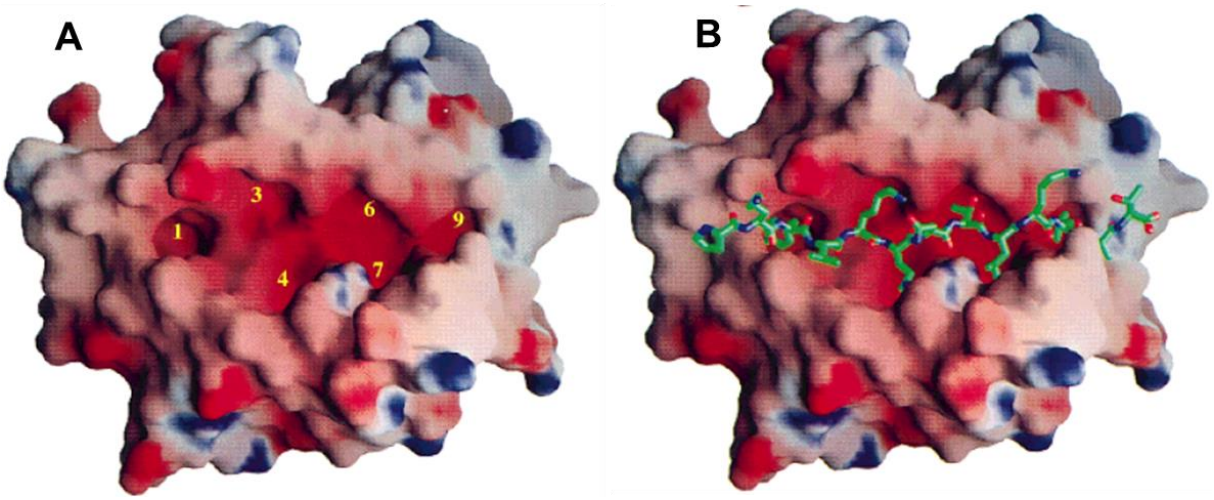
O esquema demonstra peptídeos e seus aminoácidos (P1 a P9) ligando-se aos “pockets” da molécula de MHC. (A) MHC de classe I com fenda estreita e ligação da estrutura inteira do peptídeo a sua fenda; (B) MHC de classe II com fenda aberta permitindo a ligação do “core” (9 peptídeos) a sua fenda e da formação de ligações adjacentes dos resíduos fora do “core” com o MHC-II (peptide flanking regions). (adaptado de: Zhang et al., 2011).

A ligação de peptídeos a fenda do MHC-I (peptídeos de apresentação restrita a essa classe) ocorre pela ligação das porções nitrogênio (-N) e carbono (-C) terminal a *pockets* específicos, localizados na fenda de ligação de peptídeo e através de diversas pontes de hidrogênio que liga a parte central do peptídeo (região com sequência de aminoácidos conservados) a fenda. Peptídeos ancorados ao MHC-I são comprimidos e resíduos da parte central são expostos, se estendendo para fora do sulco, assumindo uma forma abaulada, e expondo as cadeias laterais para a interação direta com o TCR (BATALIA; COLLINS, 1997; HOLLAND; COLE; GODKIN, 2013).

O MHC-II possui em sua fenda de ligação de peptídeos, regiões específicas chamadas de *pockets*, as quais são alelo específico e estão revestidos com resíduos polimórficos responsáveis pelas características químicas e tamanho de cada *pocket*, os principais são o P1, P4, P6 e P9. Os peptídeos (peptídeos de apresentação restrita a essa classe) possuem uma região central composta por nove aminoácidos (*core*) que por interações de pontes de hidrogênio se ligam a fenda de ligação de peptídeo do MHC-II; os aminoácidos que não fazem parte do “core” também vão interagir com a fenda de ligação pelo –N e –C terminais, a fenda no MHC-II é mais aberta, desta maneira, esse peptídeos vão se estendendo por ela formando o “peptide flanking regions” (PFRs) e são apesentados de forma plana ao TCR **(figura**

7) (BATALIA; COLLINS, 1997; BROWN et al., 1993; HOLLAND; COLE; GODKIN, 2013).

Figura 7 - Esquema da estrutura do HLA-DR1 (MHC-II), seu “pockets” de ligação e a interação entre um peptídeo e a molécula de HLA-DR1.



A estrutura tridimensional representa uma molécula de HLA-DR1 (MHC-II), seus “pockets” (1, 3, 4, 6, 7 e 9) (A). Interação peptídeos e molécula HLA-DR1. (adaptado de: Batalia et al., 1997)

1.9 Bioinformática e predição de epítopos

Bioinformática é o campo da ciência que engloba diferentes disciplinas como computação, tecnologia da informação e os campos da biologia (genética, biotecnologia, bioquímica, microbiologia) e visa organizar a grande quantidade de dados gerados pelos avanços biologia molecular, genética e biotecnologia, disponibilizando esses dados e possibilitando o fácil acesso (internet) a essa informações geradas por grupos de pesquisa, além de possuir um importante papel na geração de ferramentas que auxiliam no estudo e desenvolvimento de tratamentos contra doenças, incluindo o desenvolvimento de vacinas (BRUSIC; FLOWER, 2004; SORIA-GUERRA et al., 2015).

Nos últimos anos a bioinformática possibilitou o desenvolvimento de ferramentas computacionais para mapeamento de epítopos de células T, as quais tem o objetivo de acelerar a descoberta de sequências de peptídeos com capacidade de estimular resposta de células T contra patógenos específicos, permitindo a identificação de epítopos e o delineamento de vacinas (DE GROOT; MOISE, 2007). Essas ferramentas são baseadas em algoritmos desenvolvidos a

partir de conhecimentos da forma e características de ligação dos peptídeos a fenda do MHC e a estudos que propuseram as bases químico-físicas e biológicas necessárias para ativação de células T através de antígenos (DELISI; BERZOFSKY, 1985; RÖTZSCHKE et al., 1991; SORIA-GUERRA et al., 2015).

O “Immune Epitope Database and Analysis Resourse” (IEDB) é uma fonte de dados disponibilizada de forma gratuita que oferece uma grande coleção de sequências de epítopos experimentalmente testados e ferramentas para análise e predição de epítopos; sua base de dados inclui epítopos de células T para doenças infecciosas, doenças autoimunes, alérgenos e transplante para estudos em humanos, camundongos e outras espécies de animais. O IEDB disponibiliza ferramentas que permitem realizar predição de ligação de peptídeos ao MHC-I e MHC-II, analisar processamento e imunogenicidade de antígeno restrito a apresentação pelo MHC-I e predição de epítopos de células B (FLERI et al., 2017). A análise de dados e cálculos para predição, nas ferramentas computacionais do IEDB, é realizada utilizando diversos algoritmos como: *Scoring Matrix Method* (SMM-align) (NIELSEN; LUNDEGAARD; LUND, 2007), *Artificial Neural Network* (NN-align) (NIELSEN; LUND, 2009), *Consensus* (WANG et al., 2008), *Combinatory Library* (SIDNEY et al., 2008), Sturniolo (STURNIOLO et al., 1999), NetMHCIIpan (ANDREATTA et al., 2015). Após a analise da sequência da proteína proposta ao IEDB (predição de ligação ao MHC-II), os dados são gerados apresentando uma classificação (*rank*) dos peptídeos e os com percentual abaixo de 10% ou com valores de IC-50 menor que 1000 nM podem ser considerados “ligantes” (FLERI et al., 2017).

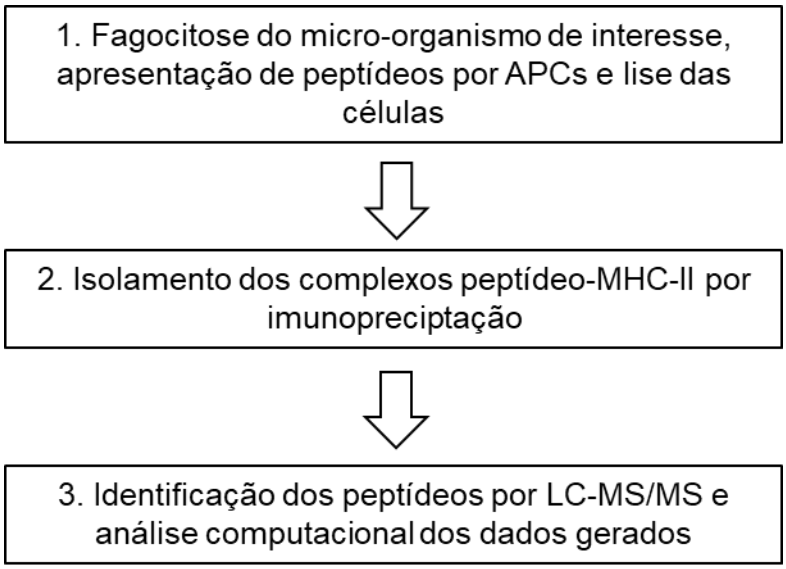
1.10 Imunoproteômica

Diversos estudos de proteômica têm auxiliado na detecção e identificação de proteínas e peptídeos podem ser reconhecidos e ativar o sistema imune. A identificação dessas proteínas e peptídeos é de grande importância, visto que o sistema imune e constantemente desafiado por micro-organismos (vírus, bactérias e fungos), os quais, após serem processados, são apresentados através de peptídeos pelas células (FULTON; TWINE, 2013).

Metodologias de proteômica têm sido utilizadas para identificar peptídeos associados ao MHC-I e MHC-II, provenientes do processamento de micro-

organismos apresentados naturalmente por células apresentadoras de antígenos (APCs). Uma das metodologias que se destaca e é utilizada por diversos grupos de pesquisa é a cromatografia de imunoafinidade que aumenta a especificidade da identificação dos peptídeos acoplados ao MHC, permitindo o isolamento do complexo peptídeo-MHC através de anticorpos monoclonais específicos para o MHC escolhido, seguida da eluição dos complexos e análise da amostra por espectrometria de massa **(figura 8)** (FULTON; TWINE, 2013).

Figura 8 - Esquema demonstrando os passos para identificar peptídeos apresentados naturalmente por moléculas de MHC-II de APCs.



Esquema geral dos passos necessários para identificação dos peptídeos apresentados por células APCs utilizando técnicas de imunoproteômica.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho concluímos que a estratégia de desenvolvimento de vacina utilizando metodologias computacionais são promissoras e importantes, pois observamos que dos 12 peptídeos gerados por predição *in silico*, 3 sequências apresentaram resultados promissores quanto a imunização de animais contra a infecção subletal com leveduras de *H. capsulatum*, com diminuição da carga fúngica nos pulmões dos animais tratados com esses peptídeos.

Em relação a metodologia de imunoproteômica, acreditamos que seja de grande utilidade na geração de sequências de peptídeos que podem ser reconhecidos por células T, pois foram processadas e apresentadas naturalmente pelas células, contudo, as sequências obtidas ainda precisão ser validadas por testes *in vitro* e *in vivo*.

Quanto a comparação das metodologias de imunoproteômica e computacional, foi observado discordância nos resultados, entretanto apenas após a síntese e testes *in vitro* das sequências fornecidos pela espectrometria de massa poderemos avaliar se estas realmente vão produzir uma resposta imune contra a doença.

REFERÊNCIAS

ADENIS, A. A. et al. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 10, p. 1150–1159, out. 2018.

ALLENDÖRFER, R.; BRUNNER, G. D.; DEEPE, G. S. Complex requirements for nascent and memory immunity in pulmonary histoplasmosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 12, p. 7389–96, 15 jun. 1999.

ALMEIDA, J. R. F. DE et al. An immunoproteomic approach revealing peptides from Sporothrix brasiliensis that induce a cellular immune response in subcutaneous sporotrichosis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4192, 8 dez. 2018.

ANDREATTA, M. et al. Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification. **Immunogenetics**, v. 67, n. 11–12, p. 641–650, 29 nov. 2015.

ANTHONY, D. D. et al. Dissecting the T Cell Response: Proliferation Assays vs. Cytokine Signatures by ELISPOT. **Cells**, v. 1, n. 2, p. 127–140, 10 maio 2012.
BÄR, E. et al. A Novel Th Cell Epitope of Candida albicans Mediates Protection from Fungal Infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 11, p. 5636–5643, 1 jun. 2012.

BATALIA, M. A.; COLLINS, E. J. Peptide binding by class I and class II MHC molecules. **Biopolymers**, v. 43, n. 4, p. 281–302, 1997.

BEYHAN, S. et al. A Temperature-Responsive Network Links Cell Shape and Virulence Traits in a Primary Fungal Pathogen. **PLoS Biology**, v. 11, n. 7, p. e1001614, 23 jul. 2013.

BLUM, J. S.; WEARSCH, P. A.; CRESSWELL, P. Pathways of Antigen Processing. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 443–473, 21 mar. 2013.

BOZZACCO, L. et al. Mass Spectrometry Analysis and Quantitation of Peptides Presented on the MHC II Molecules of Mouse Spleen Dendritic Cells. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 11, p. 5016–5030, 4 nov. 2011.

BROWN, G. D.; GORDON, S. A new receptor for Beta-glucans. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 36–37, 2001.

BROWN, J. H. et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. **Nature**, v. 364, n. 6432, p. 33–39, 1 jul. 1993.

BRUSIC, V.; FLOWER, D. R. Bioinformatics tools for identifying T-cell epitopes. **Drug Discovery Today: BIOSILICO**, v. 2, n. 1, p. 18–23, 1 jan. 2004.

BULLOCK, W. E.; WRIGHT, S. D. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95, in binding of Histoplasma capsulatum by human macrophages.

Journal of Experimental Medicine, v. 165, n. 1, p. 195–210, 1 jan. 1987.

CABIB, E. et al. The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. **Biochemical Society Transactionsransactions**, v. 25, n. 1, p. 200–4, fev. 1997.

CAIN, J. A.; DEEPE, G. S. Evolution of the Primary Immune Response to Histoplasma capsulatum in Murine Lung. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1473–1481, 1998.

CARNEIRO, C. et al. A new method for yeast phagocytosis analysis by flow cytometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 101, p. 56–62, jun. 2014.

CASELLA, C. R.; MITCHELL, T. C. Putting endotoxin to work for us: Monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 20, p. 3231–3240, 1 out. 2008.

CHANG, M. R. et al. Study of 30 cases of histoplasmosis observed in the Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 1, p. 37–39, fev. 2007.

CORREIA, F. G. S. et al. Spatial distribution of disseminated histoplasmosis and AIDS co-infection in an endemic area of Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 227–231, abr. 2016.

CREECH, A. L. et al. The Role of Mass Spectrometry and Proteogenomics in the Advancement of HLA Epitope Prediction. **PROTEOMICS**, v. 18, n. 12, p. 1700259, jun. 2018.

CURY, G. C. et al. Surto de histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p. 483–486, out. 2001.

CUTLER, J. E.; DEEPE, G. S.; KLEIN, B. S. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 13–28, jan. 2007.

DA PAZ, G. S. et al. Infection by Histoplasma capsulatum, Cryptococcus spp. and Paracoccidioides brasiliensis in bats collected in urban areas. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 6, p. 1797–1805, dez. 2018.

DA SILVA FERREIRA, B. et al. Disseminated histoplasmosis in AIDS patients: an urban disease. Experience in a metropolis in the middle east of Brasil. **Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive**, v. 25, n. 3, p. 258–262, 1 set. 2017.

DE GROOT, A. S.; MOISE, L. New tools, new approaches and new ideas for vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 6, n. 2, p. 125–127, 9 abr. 2007.

DEEPE, G. S. Role of CD8+ T cells in host resistance to systemic infection with

Histoplasma capsulatum in mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 152, n. 7, p. 3491–500, 1994.

DEEPE, G. S.; DUROSE, G. G. Immunobiological activity of recombinant H antigen from Histoplasma capsulatum. **Infection and immunity**, v. 63, n. 8, p. 3151–7, ago. 1995.

DEEPE, G. S.; GIBBONS, R. S. Cellular and molecular regulation of vaccination with heat shock protein 60 from Histoplasma capsulatum. **Infection and immunity**, v. 70, n. 7, p. 3759–67, jul. 2002.

DEEPE, G. S.; GIBBONS, R. S. Interleukins 17 and 23 influence the host response to Histoplasma capsulatum. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 1, p. 142–51, 1 jul. 2009.

DEEPE, G. S. J. Preventative and therapeutic vaccines for fungal infections: from concept to implementation. **Expert Review of Vaccines**, v. 3, n. 6, p. 701–709, 9 dez. 2004.

DEEPE, J.; GIBBONS, R. Protective efficacy of H antigen from Histoplasma capsulatum in a murine model of pulmonary histoplasmosis. **Infection and Immunity**, 2001.

DELISI, C.; BERZOFSKY, J. A. T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 20, p. 7048–7052, 1 out. 1985.

DEUS FILHO, A. DE et al. Revista portuguesa de pneumologia. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 15, n. 1, p. 109–114, 2009.

DIAS, M. A. G. et al. Isolation of Histoplasma capsulatum from bats in the urban area of São Paulo state, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 10, p. 1642–1644, 23 out. 2011.

EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E. Histoplasma capsulatum fails to trigger release of superoxide from macrophages. **Infection and immunity**, v. 55, n. 1, p. 29–34, jan. 1987.

EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E. Histoplasma variation and adaptive strategies for parasitism: New perspectives on histoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 4, p. 411–421, 1991.

ELHASSAN, R. M. et al. Computational vaccinology approach: Designing an efficient multi-epitope peptide vaccine against Cryptococcus neoformans var. grubii heat shock 70KDa protein. **bioRxiv**, p. 534008, 29 jan. 2019.

FAIOLLA, R. C. L. et al. Histoplasmosis in immunocompetent individuals living in an endemic area in the Brazilian Southeast. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 461–465, jul. 2013.

FLERI, W. et al. The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 278, 2017.

FULTON, K. M.; TWINE, S. M. Immunoproteomics: Current Technology and Applications. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l: s.n.]. v. 1061p. 21–57.

GARCIA, J. P.; HOWARD, D. H. Characterization of antigens from the yeast phase of Histoplasma capsulatum. **Infection and immunity**, v. 4, n. 2, p. 116–25, ago. 1971.

GILDEA, L. A.; MORRIS, R. E.; NEWMAN, S. L. Histoplasma capsulatum yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 2, p. 1049–56, 2001.

GÓMEZ, A. M.; RHODES, J. C.; DEEPE, G. S. Antigenicity and immunogenicity of an extract from the cell wall and cell membrane of Histoplasma capsulatum yeast cells. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 1, p. 330–6, jan. 1991.

GOMEZ, F. J.; ALLENDOERFER, R.; DEEPE, G. S. Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from Histoplasma capsulatum protects mice against pulmonary histoplasmosis. **Infection and Immunity**, 1995a.

GOMEZ, F. J.; ALLENDOERFER, R.; DEEPE, G. S. Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from Histoplasma capsulatum protects mice against pulmonary histoplasmosis. **Infection and immunity**, v. 63, n. 7, p. 2587–95, jul. 1995b.

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

GUIMARÃES, A. J. et al. Biological Function and Molecular Mapping of M Antigen in Yeast Phase of Histoplasma capsulatum. **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, p. e3449, 17 out. 2008.

GUIMARÃES, A. J.; CERQUEIRA, M. DE; NOSANCHUK, J. D. Surface architecture of Histoplasma capsulatum. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 225, 2011.

HARRIS, J. E.; DEEPE, G. S. Characterization of antigenic determinants in histoplasmin that stimulate Histoplasma capsulatum-reactive T cells in vitro. **Infection and immunity**, v. 56, n. 9, p. 2343–9, set. 1988.

HILTY, J.; GEORGE SMULIAN, A.; NEWMAN, S. L. Histoplasma capsulatum utilizes siderophores for intracellular iron acquisition in macrophages. **Medical Mycology**, v. 49, n. 6, p. 633–642, 2011.

HOLBROOK, E. D. et al. Redundant catalases detoxify phagocyte reactive oxygen and facilitate Histoplasma capsulatum pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 81, n. 7, p. 2334–46, jul. 2013.

HOLLAND, C. J.; COLE, D. K.; GODKIN, A. Re-Directing CD4+ T Cell Responses with the Flanking Residues of MHC Class II-Bound Peptides: The Core is Not Enough. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013.

HUNT, D. et al. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. **Science**, v. 255, n. 5049, p. 1261–1263, 6 mar. 1992.

HUOTARI, J.; HELENIUS, A. Endosome maturation. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 17, p. 3481–3500, 31 ago. 2011.

JIMÉNEZ, R. A. et al. Outbreak of acute histoplasmosis in a family group: identification of the infection source. **Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 22, n. 2, p. 155–9, jun. 2002.

JOHNSON, K. L. et al. Discovery of naturally processed and HLA-presented class I peptides from vaccinia virus infection using mass spectrometry for vaccine development. **Vaccine**, v. 28, n. 1, p. 38–47, 10 dez. 2009.

JOSHI, S. et al. Immunogenicity and Protective Efficacy of T-Cell Epitopes Derived From Potential Th1 Stimulatory Proteins of Leishmania (Leishmania) donovani. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 288, 28 fev. 2019.

KÄGI, D. et al. Molecular Mechanisms of Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity and Their Role in Immunological Protection and Pathogenesis in Vivo. **Annual Review of Immunology**, v. 14, n. 1, p. 207–232, 1996.

KASUGA, T. et al. Phylogeography of the fungal pathogen Histoplasma capsulatum. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 12, p. 3383–401, dez. 2003.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 115–132, 1 jan. 2007.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, n. 2, p. 217–225, 2009.

KOWN-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical mycology**. 2nd editio ed. [s.l.] Lea & Febiger, 1992.

KROETZ, D. N.; DEEPE, G. S. The role of cytokines and chemokines in Histoplasma capsulatum infection. **Cytokine**, v. 58, n. 1, p. 112–117, abr. 2012.

KURITA, N. et al. Antifungal activity of murine polymorphonuclear neutrophils against Histoplasma capsulatum. **Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 29, n. 3, p. 133–43, 1991.

LACAZ, C. DA S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LIAO, W. W. P.; ARTHUR, J. W. Predicting peptide binding to Major Histocompatibility Complex molecules. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 8, p. 469–473, jun. 2011.

LIN, J.-S. et al. Dendritic Cells Cross-Present Exogenous Fungal Antigens to Stimulate a Protective CD8 T Cell Response in Infection by Histoplasma capsulatum. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 10, p. 6282–6291, 2005.

LONG, K. H. et al. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on Histoplasma capsulatum that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, n. 1, p. 487–94, 2003.

LÓPEZ-RIBOT, J. L. et al. Antibody response to Candida albicans cell wall antigens. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 187–196, 1 jul. 2004.

MAGALHÃES, A. et al. Prophylactic and Therapeutic Vaccination Using Dendritic Cells Primed with Peptide 10 Derived from the 43-Kilodalton Glycoprotein of Paracoccidioides brasiliensis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 1, p. 23–29, jan. 2012.

MAUPIN-FURLOW, J. Proteasomes and protein conjugation across domains of life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 100–111, 19 fev. 2012.

MIHU, M. R.; NOSANCHUK, J. D. Histoplasma virulence and host responses. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

MITTAL, J. et al. Histoplasma Capsulatum: Mechanisms for Pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 2018.

MUNIZ, M. DE M. et al. Genetic diversity of Histoplasma capsulatum strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro state, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4487–4494, 2001.

NAKAMURA, L. T.; WU-HSIEH, B. A.; HOWARD, D. H. Recombinant murine gamma interferon stimulates macrophages of the RAW cell line to inhibit intracellular growth of Histoplasma capsulatum. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 2, p. 680–4, fev. 1994.

NANJAPPA, S. G. et al. Tc17 cells mediate vaccine immunity against lethal fungal pneumonia in immune deficient hosts lacking CD4+ T cells. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 7, p. e1002771, 2012.

NEWMAN, S. L.; GOOTEE, L.; GABAY, J. E. Human Neutrophil-mediated Fungistasis against Histoplasma capsulatum. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. August, p. 624–631, 1993.

NGUYEN, V. Q.; SIL, A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of Histoplasma capsulatum requires Ryp1, a conserved transcriptional regulator.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 105, n. 12, p. 4880–4885, 2008.

NIELSEN, M.; LUND, O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 296, 18 dez. 2009.

NIELSEN, M.; LUNDEGAARD, C.; LUND, O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 238, 4 dez. 2007.

NITTLER, M. P. et al. Identification of Histoplasma capsulatum Transcripts Induced in Response to Reactive Nitrogen Species. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. October, p. 4792–4813, 2005.

NOSANCHUK, J. D. et al. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against Histoplasma capsulatum. **Journal of Clinical Investigation**, 2003.

OLIVEIRA, F. DE M.; UNIS, G.; SEVERO, L. C. Microepidemia de histoplasmose em Blumenau, Santa Catarina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 4, p. 375–378, ago. 2006.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513–21, maio 2009.

QUAH, B. J. C.; PARISH, C. R. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 44, 12 out. 2010.

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

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 172, 17 abr. 2014.

RÖTZSCHKE, O. et al. Exact prediction of a natural T cell epitope. **European Journal of Immunology**, v. 21, n. 11, p. 2891–2894, nov. 1991.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 725–738, 25 abr. 2010.

RUDOLPH, M. G.; STANFIELD, R. L.; WILSON, I. A. HOW TCRS BIND MHCS, PEPTIDES, AND CORECEPTORS. **Annual Review of Immunology**, v. 24, n. 1, p. 419–466, abr. 2006.

SCHWARZ, J.; BAUM, G. L. The History of Histoplasmosis, 1906 to 1956. **New England Journal of Medicine**, v. 256, n. 6, p. 253–258, 7 fev. 1957.

SEBGHATI, T. S.; ENGLE, J. T.; GOLDMAN, W. E. Intracellular parasitism by Histoplasma capsulatum: Fungal virulence and calcium dependence. **Science**, v. 290, n. 5495, p. 1368–1372, 2000.

SEPÚLVEDA, V. E. et al. Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen Histoplasma capsulatum. **mBio**, v. 8, n. 6, p. e01339-17, 5 dez. 2017.

SEVERO, L. C. et al. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 4, p. 183–187, ago. 2001.

SIDNEY, J. et al. Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. **Immunome research**, v. 4, p. 2, 25 jan. 2008.

SORIA-GUERRA, R. E. et al. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 53, p. 405–414, fev. 2015.

STURNIOLO, T. et al. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 555–561, jun. 1999.

TABORDA, C. P. et al. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of Paracoccidioides brasiliensis which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infection and immunity**, v. 66, n. 2, p. 786–93, 1 fev. 1998.

TEN BRINKE, A. et al. Monitoring T-Cell Responses in Translational Studies: Optimization of Dye-Based Proliferation Assay for Evaluation of Antigen-Specific Responses. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1870, 21 dez. 2017.

TROUPLIN, V. et al. Bone marrow-derived macrophage production. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 81, p. e50966, 22 nov. 2013.

TSUMOTO, K. et al. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein expression and purification**, v. 28, n. 1, p. 1–8, mar. 2003.

VAN DE LOOSDRECHT, A. A. et al. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. **Journal of Immunological Methods**, v. 174, n. 1–2, p. 311–320, 14 set. 1994.

VICENTINI, A. P. et al. Histoplasmose: um risco ocupacional entre pesquisadores que realizam trabalho de campo? **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 4, p. 747–752, 2012.

WANG, P. et al. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. **PLoS computational biology**, v. 4, n. 4, p. e1000048, 4 abr. 2008.

WEBSTER, R. H.; SIL, A. Conserved factors Ryp2 and Ryp3 control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen Histoplasma capsulatum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 38, p. 14573–14578, 23 set. 2008.

WEISCHENFELDT, J.; PORSE, B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. **CSH protocols**, v. 2008, n. 12, p. pdb.prot5080, 1 dez. 2008.

WHEAT, J. et al. The diagnostic laboratory tests for histoplasmosis: analysis of experience in a large urban outbreak. **Annals of Internal Medicine**, v. 97, n. 5, p. 680–5, nov. 1982.

WHEAT, J. Histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **Current topics in medical mycology**, v. 7, n. 1, p. 7–18, dez. 1996.

WHEAT, L. J. et al. Disseminated histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome: clinical findings, diagnosis and treatment, and review of the literature. **Medicine**, v. 69, n. 6, p. 361–74, nov. 1990.

WHEAT, L. J.; KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 17, n. 1, p. 1–19, vii, mar. 2003.

WHEAT, L. J.; KOHLER, R. B.; TEWARI, R. P. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of Histoplasma capsulatum antigen in serum and urine specimens. **New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 2, p. 83–88, 9 jan. 1986.

YOUSEFF, B. H. et al. Extracellular superoxide dismutase protects Histoplasma yeast cells from host-derived oxidative stress. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, 2012.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. et al. Evaluation of cation exchange chromatography for the isolation of M glycoprotein from histoplasmin. **Journal of Medical and Veterinary Mycology** , v. 31, n. 1, p. 29–41, 1993.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. et al. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 1, n. 4, p. 390–3, jul. 1994a.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. et al. Immunochemical analysis of the H and M glycoproteins from Histoplasma capsulatum. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 1, n. 5, p. 563–8, set. 1994b.

ZHOU, P. et al. Perforin Is Required for Primary Immunity to Histoplasma capsulatum. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1968–1974, 2001.

ZHOU, P.; MILLER, G.; SEDER, R. A. Factors involved in regulating primary and secondary immunity to infection with Histoplasma capsulatum: TNF-alpha plays a critical role in maintaining secondary immunity in the absence of IFN-gamma. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 3, p. 1359–68, 1 fev. 1998.