CLEISON LEDESMA TAIRA

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

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

São Paulo 2019

CLEISON LEDESMA TAIRA

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

> Tese apresentada ao Programa de Pósgraduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientado: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

Versão original.

São Paulo 2019 CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Taira Ledesma, Cleison Mapeamento de epítopos para desenvolvimento de vacina a partir do antígeno M de Histoplasma capsulatum / Cleison Taira Ledesma; orientador Carlos Taborda Pelleschi. -- São Paulo, 2019. 136 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Histoplasma capsulatum. 2. Vacinas. 3. Antígeno M. 4. Peptídeos. 5. Imunoproteômica. I. Taborda Pelleschi, Carlos, orientador. II. Título. Candidato: Cleison Ledesma Taira

Titulo da Tese: Mapeamento de epítopos para desenvolvimento de vacina a partir do antígeno M de *Histoplasma capsulatum*

Orientador: Carlos Pelleschi Taborda

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a, considerou o candidato:

() Aprovado	() Reprovado
Examinador(a):	Assinatura:		
	Nome:		
	Instituição:		
- · · / ·	.		
Examinador(a):	Assinatura:		
	Nome:		
	Instituição:		
Examinador(a):	Assinatura:		
	Nome:		
	Instituição:		
Presidente:	Assinatura:		
	Nome:		
	Instituição:		



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitària "Armando de Salles Oliveira". Butantă, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 0550 CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Mapeamento de epitopos para desenvolvimento de vacina a partir do antígeno M de Histoplasma capsulatum", registrado sob o protocolo nº 95/2014-E, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em 28/08/2014 pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de 4 ano(s) a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: Dr.(a.) Carlos Pelleschi Taborda

- Departamento: Microbiologia

Membros da Equipe: Cleison Ledesma Taira

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretríz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico <u>www.icb.usp.br/ceua</u>. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

Os animais autorizados na presente proposta serão fornecidos pelo Biotério do Instituto de Pesquisa de Energia Nuclear – IPEN.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "Mapping of epitopes for development of vaccines from Histoplasma capsulatum M antigen", protocol nº 63/2014-E, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for Scientific Research Purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on 08/28/2014 by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for 4 year(s) from the date of approval.

- Principal Investigator: Dr.(a.) Carlos Pelleschi Taborda

- Team members: Cleison Ledesma Taira

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	C57BL/6	Macho	6-8 semanas/weeks	560
Mus musculus	Balb/c	Macho	6-8 semanas/weeks	400

São Paulo, 06 de novembro de 2017.

huciane Illia Ste

Profa. Dra. Luciana Valéria Sita Coordenadora CEUA-ICB/USP Dedico este trabalho a meus pais (Alfredo Taira e Iracilda Ledesma Taira) e queridos irmão (Tiago Ledesma Taira e Deborah Ledesma Taira) por sempre terem apoiado minhas escolhas e sonhos.

AGRADECIMENTOS

A minha família pela presença nos momentos que precisei de apoio para dar continuidade a este trabalho.

Ao professor Carlos Pelleschi Taborda pela oportunidade oferecida e por dar as condições necessárias para realização do trabalho.

A Zita Maria de Oliveira Gregório e a toda equipe do Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos que me apoiaram e possibilitaram a execução deste trabalho, além de terem proporcionado muitos momentos felizes nesta caminhada.

Agradeço especialmente ao Leandro Buffoni Roque da Silva por estar ao meu lado em todos os experimentos e dificuldades, ao Lucas Dias pela amizade e por ter disponibilizado seu tempo e conhecimento, a Ana Camila Oliveira Souza pela sua disponibilidade e energia de trabalho, a Martha Uran pelo entusiasmo com a ciência e boas risadas, a Abigail Gouveia que ajudou muito na época das proteínas e a professora Leila Lopez Bezerra pelo apoio e disponibilidade.

A Gilda Maria Barbaro Del Negro, ao professor Gil Benard e a toda equipe do LIM-53 que sempre me receberam muito bem e sempre estiveram dispostos a ajudar.

A equipe do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do professor Luís Carlos de Souza Ferreira, pela paciência, disponibilidade e conhecimento, especialmente ao Lennon Pereira e Eduardo Gimenes Martíns, sempre gentis e dispostos a ajudar.

A Gisele da Graça Santana, a Naíde Rodrigues Farripas e ao Renato pela disposição e apoio.

Ao professor Benedito Correa e a equipe do Laboratório de Fungos Toxigênicos e Micotoxinas pelo apoio.

Ao Departamento de Microbiologia do ICB/USP por ter oferecido apoio e a estrutura para realização do trabalho.

Ao Marco Alves (biotério) que me deu todo suporte e ofereceu momentos alegres e divertidos.

A Thaís Viggiani Santana (espectrômetro de massa) pela gentileza e disposição para processar minhas amostras.

Ao professor Giuseppe Palmisano e a Dra. Claudia Blanes Angeli pelo suporte e disposição nos experimentos de espectrometria de massa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao apoio de Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (projeto 2014/17293-3 e 2016/08730) ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

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 seguências 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.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas microscópicas do <i>H. capsulatum</i> a temperatura ambiente e a 37 °C
Figura 2 - Proposta de nova organização taxonômica dos grupos filogenéticos de <i>H. capsulatum</i> (NAm 1, NAm 2, LAm A e Panamá)21
Figura 3 - Meio ambiente e forma de infectante do <i>H. capsulatum</i> 22
Figura 4 - Estimativa média de prevalência de exposição prévia da população ao <i>H. capsulatum</i> na América Latina
Figura 5 - Esquema de resposta imune protetora contra histoplasmose29
Figura 6 - Esquema de ligação de peptídeo aos "pockets" da fenda da molécula de MHC
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
Figura 8 - Esquema demonstrando os passos para identificar peptídeos apresentados naturalmente por moléculas de MHC-II de APCs40
Figura 9 - Esquema de expressão da proteína recombinante45
Figura 10 - Esquema das variações na purificação do antígeno M recombinante47
Figura 11 - Predição de peptídeos com ferramentas de análise disponibilizadas pelo IEDB
Figura 12 - Imunização dos grupos de animais com peptídeos53
Figura 13 - Esquema de imunização dos animais58
Figura 14 - Esquema geral dos grupos utilizados nos ensaios in vivo
Figura 15 - Esquema da diferenciação de macrófagos e fagocitose62
Figura 16 - Esquema de processamento das células após descongelamento63
Figura 17 - Esquema de isolamento e purificação do complexo peptídeo-MHC-II64
Figura 18 - Fluxo de trabalho para identificação de peptídeos por espectrometria de massa
Figura 19 - Perfil eletroforético do lisado de bactérias após expressão em gel de SDS-PAGE 12%
Figura 20 - Perfil eletroforético após purificação da proteína em gel de SDS-PAGE 12%
Figura 21 - Perfil eletroforético das frações de proteína recombinante eluída em concentrações crescentes de imidazol70

Figura 22 - Perfil eletroforético do lisado de bactérias após expressão a 18 °C overnight
Figura 23 - Perfil eletroforético proteína recombinante purificada no sistema AKTA (SDS-PAGE 12%)
Figura 24 - Cromatograma da purificação no sistema AKTA72
Figura 25 - Perfil eletroforético após purificação da proteína em gel de SDS-PAGE 12%
Figura 26 - Western Blotting para confirmar a expressão do antígeno M recombinante
Figura 27 - Esquema de análise da sequência do antígeno M75
Figura 28 - Tabela dos 55 peptídeos considerados possíveis ligantes na molécula de MHC-II, por predição <i>in silico</i>
Figura 29 - Sequência de peptídeos escolhidos para síntese e testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
Figura 30 – Tabela de solubilidade dos peptídeos77
Figura 31 - Sequência do antígeno M em formato FASTA (GenBank: AAB84182.2) com os peptídeos em desta de cores
Figura 32 - Sequência de peptídeos escolhidos a partir da predição <i>in silico</i> localizados em estrutura tridimensional da proteína
Figura 33 - Sequência de peptídeos testados em ensaios in vivo
Figura 34 - Tabela de viabilidade celular (%) após 24 horas de exposição ao peptídeo testado
Figura 35 - Estratégia de análise do teste de linfoproliferação81
Figura 36 - Ensaio de linfoproliferação de linfócitos de animais vacinados com o mix 1 (peptídeo 1, peptídeo 2 e peptídeo 3) e estimulados com cada peptídeo especifico
Figura 37 - Ensaio de linfoproliferação de linfócitos de animais vacinados com o mix 2 (peptídeo 4, peptídeo 5 e peptídeo 7) e estimulados com cada peptídeo especifico
Figura 38 - Ensaio de linfoproliferação de linfócitos de animais vacinados com o mix 3 (peptídeo 10, peptídeo 11 e peptídeo 12) e estimulados com cada peptídeo especifico
Figura 39 - Ensaio de linfoproliferação de linfócitos de animais vacinados com o mix 4 (peptídeo 6, peptídeo 8 e peptídeo 9) e estimulados com cada peptídeo especifico
Figura 40 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de IFN-γ, dosados no sobrenadante de cultura da linfoproliferação

Figura 41 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de TNF-α, dosados Figura 42 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de IL-17A, dosados Figura 43 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de IL-6, dosados no sobrenadante de cultura da linfoproliferação......90 Figura 44 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de IL-10, dosados no sobrenadante de cultura da linfoproliferação......91 Figura 45 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de IL-2, dosados no sobrenadante de cultura da linfoproliferação......92 Figura 46 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de IL-4, dosados no sobrenadante de cultura da linfoproliferação......93 Figura 47 - Estratégia utilizada para analisar a cinética de fagocitose e expressão de Figura 48 - Cinética de fagocitose de leveduras inativada e apresentação de MHC Figura 49 - Cinética de fagocitose de leveduras inativada analisado por microscopia de fluorescência......96 Figura 50 - Cultura de macrófagos após 7 dias de diferenciação......97 Figura 51 - Cultura de macrófagos após 1 hora de incubação com leveduras97 Figura 52 - Cultura de macrófagos após 2 horas de incubação com leveduras......98 Figura 53 - Cultura de macrófagos após 4 horas de incubação com leveduras......98 Figura 54 - Cultura de macrófagos após 6 horas de incubação com leveduras......99 Figura 55 - Cultura de macrófagos após 6 horas de incubação com leveduras......99 Figura 56 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A) e baço (B) dos animais avaliados no ensaio 1.....101 Figura 57 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A) e baço (B) dos animais avaliados no ensaio 2.....102 Figura 58 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), baço (B) e fígado (C) dos animais avaliados no ensaio 3.....102 Figura 59 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), baço (B) e fígado (C) dos animais avaliados no ensaio 4.....104 Figura 60 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), baço (B) e fígado (C) dos animais avaliados no ensaio 5.....105

Figura 61 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), baço (B) e fígado (C) dos animais avaliados no ensaio 6......106

Figura 62 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), baço (B) e fígado (C) dos animais avaliados no ensaio 7......107

Figura 63 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), baço (B) e fígado (C) dos animais avaliados no ensaio 8......108

Figura 68 - Avaliação das sequências dos peptídeos identificados por espectrometria de massa em relação à capacidade de ligação a MHC de classe II (camundongos C57BL/6) por predição *in silico* (IEDB, método Consenso)......114

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Histoplasma capsulatum	19
1.2 Histoplasmose e diagnóstico	21
1.3 Epidemiologia	24
1.4 Mecanismos de virulência	26
1.5 Resposta imune	29
1.6 Antígeno M	33
1.7 Vacina contra histoplasmose	34
1.8 Complexo de histocompatibilidade e ligação MHC-Peptídeo	35
1.9 Bioinformática e predição de epítopos	38
1.10 Imunoproteômica	39
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Comitê de ética	43
4.2 Micro-organismo e condições de cultivo	43
4.3 Expressão do antígeno M recombinante	43
4.3.1 Expressão do antígeno M recombinante a 37 °C	43
4.3.2 Expressão do antígeno M recombinante a 18 °C overnight	44
4.4 Purificação do antígeno M recombinante por cromatografia de	afinidade
	45
4.4.1 Purificação do antígeno M recombinante por cromatografia de a em coluna acoplada a bomba peristáltica em tampão com ureia	afinidade 45
4.4.2 Purificação do antígeno M recombinante em coluna HisTrap (G a sistema de cromatografia AKTA com troca de tampão por diluição .	E) acoplada 46
4.5 Troca de tampão da proteína recombinante	47
4.5.1 Diálise simples	47
4.5.2 Diálise com diminuição gradual de concentração	47
4.5.3 Troca de tampão por diluição (1:10) seguida por purificação em acoplada a bomba peristáltica	ı coluna 48

4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	.48
4.7 Western Blotting	49
4.8 Predição in silico de peptídeos a partir da sequência do antígeno M	49
4.9 Método de ensaio de linfoproliferação	51
4.9.1 Obtenção das células dos linfonodos	51
4.9.2 Marcação com CFSE	51
4.9.3 Preparo para leitura no citômetro de fluxo	52
4.9.4 Ensaio de linfoproliferação com estímulos específicos	52
4.10 Ensaio de fagocitose e cinética de apresentação de moléculas de MH	
1 10 1 Cultures solulares	53
4.10.2 Draduaão de estrenadorte de culture de cálulos I 020	.53
4.10.2 Produção de sobrenadante de cultura de celulas L929	54
4.10.3 Cinetica de fagocitose e de apresentação de MHC de classe il com levedura inativada de <i>H. capsulatum</i> analisado por citometria de fluxo	54
4.10.4 Cinética de fagocitose com levedura inativada de <i>H. capsulatum</i> analisado por microscopia de fluorescência	55
4.10.5 Avaliação da viabilidade de células J774.1A em cultura com 20 μg/ml c cada peptídeos (teste de MTT)	le 56
4.11 Ensaios <i>in vivo</i>	57
4.11.1 Animais	57
4.11.2 Infecção dos animais	57
4.11.3 Esquema de imunização	57
4.11.4 Processamento dos órgãos e unidades formadoras de colônia (UFC)	.58
4.11.5 Esquema geral dos ensaios <i>in vivo</i> testados	.58
4.11.6 Cinética de produção de citocinas	.60
4.12 Detecção e quantificação de citocinas	.61
4.13 Extração do complexo MHC-peptídeo por método de imunoprecipitaçã	ão 62
4.14 Identificação dos peptídeos acoplados ao MHC-II por espectrometria o massa	de 65
4.15 Análise de dados e testes estatísticos	66
4.16 Estrutura molecular	67
4.17 Síntese, pureza e preparo dos peptídeos	67
5 RESULTADOS	68
5.1 Expressão do antígeno M recombinante	68

5.2 Purificação do antígeno M recombinante por cromatografia de afinidade		
5.3 <i>Western Blotting</i> do produto da expressão após sonicação e e das proteínas	⊭ xtração 73	
5.4 Predição <i>in silico</i> de peptídeos ligantes a moléculas de MHC d de camundongos C57BL/6 a partir da sequência do antígeno M	e classe II 74	
5.5 Estrutura tridimensional do antígeno M com peptídeos localiza	ados78	
5.6 Avaliação da viabilidade de células J774.1A em cultura com 20 cada peptídeos (teste de MTT)) µg/ml de 79	
5.7 Ensaio de linfoproliferação	80	
5.8 Quantificação de citocinas do sobrenadante de cultura (linfop	r oliferação) 86	
5.9 Cinética de fagocitose e de apresentação de MHC de classe II levedura inativada de <i>H. capsulatum</i> analisado por citometria de f	com luxo 93	
5.10 Cinética de fagocitose com levedura inativada de <i>H. capsulat</i> analisado por microscopia de fluorescência	' um 95	
5.11 Ensaios <i>in vivo</i>	100	
5.11.1 Ensaio <i>in vivo</i> 1 (peptídeos 1, 2, 3, 8, e 9)	100	
5.11.2 Ensaio <i>in vivo</i> 2 (peptídeos 4, 5, 6, 7, 8 e 9)	101	
5.11.3 Ensaio <i>in vivo</i> 3 (peptídeos 6, 8 e 9)	102	
5.11.4 Ensaio <i>in vivo</i> 4 (peptídeos 6, 8 e 9)	103	
5.11.5 Ensaio <i>in vivo</i> 5 (Peptídeo 6 + adjuvante MPLA)	104	
5.11.6 Ensaio <i>in vivo</i> 6 (peptídeo 6 + Adjuvante MPLA)	105	
5.11.7 Ensaio <i>in vivo</i> 7 (peptídeos 1, 10 e 12)	106	
5.11.8 Ensaio <i>in vivo</i> 8 (peptídeos 1, 10 e 12)	108	
5.11.9 Quantificação de citocinas do macerado de pulmões	109	
5.12 Identificação dos peptídeos acoplados a MHC de classe II po espectrometria de massa	r 113	
6 DISCUSSÃO	119	
7 CONCLUSÃO	126	
REFERÊNCIAS	127	

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 African 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 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).







A histoplasmose clássica é uma micose sistêmica causada por *H. capsulatum v*ar. *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 glutathionedependent enzymatic redutase*; redutores não enzimáticos de baixo peso molecular e uma *cell surfasse reducing activity*) e capacidade de utilizar o "complexo de multicopper 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).





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-1 β , 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-y. A produção de IFN-y 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 $\gamma \delta$ (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 é identificação vacinas fúngicas а 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).

apresentação de fragmentos Na 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 αhelix/ β -sheet ($\alpha \beta$), 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 $\alpha_1 \alpha_2$) é formada por uma cadeia pesada e uma subunidade de cadeia leve $(\beta_2$ -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 αhélices 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 gual 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 (SMMalign) (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 seguência 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.

2 JUSTIFICATIVA

A histoplasmose tem importância clínica devido ao aumento de indivíduos imunossupressoras portadores de doenças е de pacientes que utilizam medicamentos imunossupressores. Apesar disponibilidade da de agentes antifúngicos de amplo espectro, pacientes com moderada severa ou imunossupressão não respondem adequadamente ao tratamento e têm grande possibilidade de desenvolver a forma disseminada da doença que é grave e pode ser fatal, além do alto custo dos antifúngicos e sua elevada toxicidade, principalmente da anfotericina B. Outro dado importante são os relatos da doença em todas as regiões do país, principalmente na região sudeste, tanto em áreas urbanas como em áreas rurais e pontos turísticos (cavernas e grutas), expondo turistas e profissionais que trabalham nesses locais.

Levando em consideração impacto da 0 doenca em pacientes imunocomprometidos e a presença do fungo, tanto em áreas urbanas quanto rurais, expondo a população ao contato direto com sua forma infectante, é de grande importância o desenvolvimento de novos tratamentos terapêuticos e profiláticos, como as vacinas e desta maneira o estudo de moléculas, como ao antígeno M, o qual está presente na parede do fungo e é um antígeno detectado em todas as fases da doença e pode apresentar sequências peptídicas especificas que geram resposta protetora contra a doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade vacinal de peptídeos gerados a partir da sequência do antígeno M de *H. capsulatum* através de predição *in silico* em programa computacional que identifica possíveis ligantes (peptídeos) a moléculas de MHC de classe II de camundongos C57BL/6 e identificar peptídeos naturalmente processados e apresentados por macrófagos diferenciados de células progenitoras extraídas de medula óssea, após fagocitarem leveduras inativadas por calor, utilizando métodos de cromatografia de afinidade e imunoproteômica.

3.2 Objetivos específicos

- Expressar o antígeno M recombinante.
- Purificar o antígeno M recombinante.
- Avaliar por citometria de fluxo, sequência de peptídeos do antígeno M gerado por métodos computacionais (*in silico*), quanto à capacidade de estimular a proliferação de diferentes populações linfocitárias.
- Avaliar a imunização profilática de camundongos C57BL/6 com peptídeos gerados a partir da sequência do antígeno M por predição *in silico,* posteriormente infectados com dose subletal de leveduras de *H. capsulatum* (cepa G271B).
- Determinar a carga fúngica em diferentes sítios anatômicos de camundongos infectados e submetidos à imunização profilática.
- Quantificar a produção de citocinas nos pulmões dos animais infectados e submetidos aos protocolos de imunização.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com o protocolo nº 63/2014-E.

4.2 Micro-organismo e condições de cultivo

O micro-organismo utilizado nos experimentos *in vitro* e *in vivo* foi o *Histoplasma capsulatum*, cepa G-217B (ATCC 26032) (fase leveduriforme). As leveduras foram cultivadas em meio BHI líquido (*Brain Heart Infusion*) (Becton Dickinson) suplementado com solução de cisteína 1 % (Sigma) em agitação de 150 RPM a 37 °C. Após crescimento em sete dias, foi realizado o repique e após 72 horas (fase log) as leveduras foram estocadas a -80 °C (BHI líquido com 30% de glicerol estéril) ou preparadas para experimento (DEEPE; GIBBONS, 2001; GOMEZ; ALLENDOERFER; DEEPE, 1995b).

4.3 Expressão do antígeno M recombinante

4.3.1 Expressão do antígeno M recombinante a 37 °C

A cepa de *E. coli* M15, já transformada com o plasmídeo [pQE40 (Qiagen)] contendo a sequência codificante do antígeno M recombinante de *H. capsulatum* que foi cedida pelo Professor Dr. Allan Guimarães (Universidade Federal Fluminense). Após ser descongelada, foi realizado o repique em meio Luria Bertani (LB) ágar acrescido de antibióticos (ampicilina 100 µg/ml e kanamicina 25 µg/ml) e incubado por 24 horas a 37 °C. Após a incubação, uma colônia isolada foi selecionada e semeada em 25 ml de meio LB líquido contendo os antibióticos acima descritos, incubado em agitação de 150 rpm por 12 horas a 37 °C. O volume completo (25 ml) foi adicionado a 1 L do meio LB com antibióticos e incubado a 37 °C em agitação de 200 rpm até atingir a absorbância entre 0,4 a 0,6 a 600 nm (aproximadamente 4 horas). Ao atingir a absorbância necessária adicionou-se

isopropil-β-D-1-tiogalactoparanosido (IPTG) (Sigma), na concentração de 1 mM/ml, para a indução da expressão da proteína recombinante e incubou-se em agitação de 200 rpm a 37 °C por 4 horas **(figura 9)**. Após a incubação, o meio LB foi centrifugado em tubos cônicos tipo falcon de 50 ml (20 tubos) a 1100 g por 18 °C por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* congelado a – 20 °C *overnight*. Após descongelar as amostras, foi adicionado 1 ml de tampão de lise (Imidazol 5 mM, Tris 20 mM, NaCl 500 mM; pH 7,9), agitados e o conteúdo dos tubos transferidos para apenas um tubo (volume aproximado de 20 ml) e adicionou-se 500 µl de coquetel inibidor de proteases (SIGMAFAST Protease Inhibitor Tablets) (Sigma) (diluição final 1:40) (GUIMARÃES et al., 2008).

Após o processo de expressão as bactérias foram lisadas para liberar a proteína recombinante (contida em corpúsculos de inclusão) pelo método de sonicação, com 10 ciclos de 59 segundos com intervalo de 59 segundos entre os ciclos a 35% de amplitude (sonicador SonicsVibraceII) com a amostra em gelo. O lisado foi distribuído em tubos de 1,5 ml e centrifugado a 11300 g por 10 minutos a 18 °C, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 ml de tampão contendo ureia (ureia 6 M, Imidazol 5 mM, Tris 20 mM, NaCl 500 mM; pH 7,9) em cada tubo e o volume total foi transferido para um tubo de 50 ml e agitado por 1 hora a temperatura ambiente. O conteúdo foi distribuído novamente em tubos de 1,5 ml e centrifugado a 11300 g por 10 minutos a 18 °C e o sobrenadante contendo a proteína recombinante coletado e filtrado em membrana de 0,45 µM e 0,22 µM (GUIMARÃES et al., 2008).

4.3.2 Expressão do antígeno M recombinante a 18 °C overnight

Na tentativa de expressar a proteína na sua forma solúvel, sem necessidade de eluição em tampão contendo ureia, foi realizada expressão a 18 °C *overnight* (18 horas) após adicionar o IPTG (figura 9), os procedimentos anteriores foram os mesmos descritos no item 4.3.1. Após a expressão a amostra foi distribuída em tubos de 50 ml e centrifugada a 1100 g por 18 °C por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* congelado a -20 °C *overnight*. Após descongelar as amostras, foi adicionado 1 ml de tampão de lise (imidazol 5 mM, Tris 20 mM, NaCl 500 mM; pH 7,9), agitados e o conteúdo dos tubos transferidos para apenas um tubo e adicionouse coquetel inibidor de proteases (SIGMAFAST Protease Inhibitor Tablets) (SIGMA

S8820) (diluição 1:40). A suspensão foi lisada, conforme item 4.3.1, distribuídas em tubos de 1,5 ml e centrifugadas a 11300 g por 10 minutos a 18 °C, o sobrenadante foi recolhido, filtrado em filtro 0,45 μ M e 0,22 μ M e submetido a eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% para verificar a expressão da proteína.





Após ser descongelada, a *E. coli* M15 foi repicada em LB sólido incubada por 24 hs (37 °C); uma colônia isolada foi transferida para 25 ml de LB líquido e incubado 24 hs (37 °C, 150 RPM). Após o período o volume foi transferido para 1 L de LB líquido e incubado (37 °C, 200) RPM até a suspensão atingir DO de 0,4 a 0,6, adicionado IPTG e incubado mais 4 horas (37 °C, 200 RPM) ou após a transferência dos 25 ml para 1 L de LB foi adicionado IPTG incubado a 18 °C overnight.

4.4 Purificação do antígeno M recombinante por cromatografia de afinidade

4.4.1 Purificação do antígeno M recombinante por cromatografia de afinidade em coluna acoplada a bomba peristáltica em tampão com ureia

Cinco mililitros da resina (Ni-NTA, Qiagen) com afinidade por proteínas com calda de histidina, foram misturadas em 10 ml de água milliQ, agitada por 5 minutos (temperatura ambiente) e transferidas para uma coluna cromatográfica de vidro de 15 ml, a qual ficou em repouso por 2 horas até o empacotamento total da resina. Após o empacotamento, a coluna foi acoplada a uma bomba peristáltica, a coluna foi

lavada cinco vezes (5 volumes de coluna) com água milliQ e posteriormente com 5 volumes de tampão de lavagem (ureia 6 M, Tris 20 mM, 10 mM de imidazol, NaCl 500 mM; pH 7,9). O imidazol é responsável por competir com as ligações das proteínas com a coluna, desta maneira, sua função é eluir a amostra. O imidazol 10 mM foi adicionado ao tampão para retida de contaminantes com baixa afinidade pela coluna (GUIMARÃES et al., 2008).

A amostra foi passada pela coluna acoplada a bomba peristáltica (fluxo 1 ml/minuto) seguida de lavagem com 5 volumes do tampão de lavagem e de eluição com 2 volumes de tampão de eluição (ureia 6 M, Imidazol 500 mM, Tris 20 mM, NaCl 500 mM; pH 7,9) e foram coletadas 35 frações de 1 ml em tubos de 1,5 ml. O descarte das lavagens foi reservado até a eletroforese em gel (SDS-PAGE) (GUIMARÃES et al., 2008).

Para aperfeiçoar a purificação da proteína recombinante também foi realizado um protocolo com modificação no passo de eluição da amostra, que consistiu na utilização de concentrações crescentes de imidazol no tampão de eluição (100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM e 500 mM) (aplicado 1 volume de coluna para cada concentração) visando diminuir a ligação de proteínas contaminantes a resina da coluna. Outra método utilizado para melhora da purificação foi a lavagem da coluna com tampão de lavagem (10 volumes de coluna) (ureia 6 M, Tris 20 mM, 10 mM de imidazol, NaCl 500 mM; pH 7,9) contendo concentração aumentada de imidazol (50 mM) para diminuir a ligação de proteína contaminantes, seguido de eluição com tampão contendo 500 mM de imidazol **(figura 10)**.

4.4.2 Purificação do antígeno M recombinante em coluna HisTrap (GE) acoplada a sistema de cromatografia AKTA com troca de tampão por diluição

Após a expressão da proteína, foi realizado diluição de 6 ml da amostra, por gotejamento em fluxo de 1 ml/minuto, em 2 litros de tampão (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, 20% de glicerol; pH 7,9). Em seguida a amostra foi aplicada a uma coluna HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare) acoplada ao sistema de cromatografia AKTA (GE Healthcare) em fluxo de 1 ml/minuto; após esse processo a coluna foi lavada com 5 volumes de tampão A sem imidazol (Tris 50 mM, 200 mM NaCl, 20 % glicerol; pH 7,9) e a amostra foi eluída de forma linear com o aumento da

porcentagem de tampão B (Tris 50 mM, 1 M imidazol, 200 mM NaCl, 20 % glicerol, pH 7,9) e foram coletadas 40 frações.



Figura 10 – Esquema das variações na purificação do antígeno M recombinante.

Variações da técnica de purificação do antígeno M recombinante em coluna com resina com afinidade para proteína His-*tagged*.

4.5 Troca de tampão da proteína recombinante

4.5.1 Diálise simples

A diálise simples da amostra foi realizada adicionando 2 ml da proteína purificada em tampão contendo 6 M de ureia a uma membrana de nitrocelulose (cutoff de 14 kDa) (Sigma) em 200 ml de tampão sem ureia (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,9) (4 °C). Foram realizadas duas trocas de tampão, a cada 2 horas, e após a última, a amostra foi dialisada overnight a 4 °C.

4.5.2 Diálise com diminuição gradual de concentração

Método realizado com concentrações decrescentes de ureia no tampão (3,0 M; 1,5 M; 0,75 M; 0,5 M) até retirada total da ureia. A amostra ficou em diálise dentro de membrana de nitrocelulose (*cut-off* 14 kDa) por 8 horas em cada concentração de ureia (3,0 M a 0,5 M) e overnight no tampão sem ureia (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,9) a 4 °C.

4.5.3 Troca de tampão por diluição (1:10) seguida por purificação em coluna acoplada a bomba peristáltica

Quatro mililitros da amostra foram diluídos em 40 ml de tampão (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,9), diluição 1:10, por gotejamento em velocidade mínima da bomba peristáltica e com agitação magnética da amostra. Após a diluição, a amostra foi purificada, como descrito no item 4.4.1, e foi eluída utilizando concentrações crescentes de imidazol no tampão de eluição (100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM e 500 mM). Foram coletadas frações de 1 ml.

4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para observar o perfil eletroforético de proteína, foi utilizado o gel de poliacrilamida [Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)]. O gel de separação foi utilizado na concentração de 12 % de acrilamida e bis-acrilamida e o gel de empilhamento a 3% de acrilamida. As amostras foram diluídas em tampão de amostra sem agentes redutores, na proporção de 1:5 e em seguida submetidas à fervura a 100 °C por cinco minutos. Após o término 20 µl da mistura foi aplicada em cada um dos poços do gel.

Para a migração eletroforética utilizou-se aparelho Mini-V 8.10[®] (Life Technologies) ajustado com voltagem inicial de 80 V, durante 30 minutos e após a penetração no gel de corrida, a voltagem foi mantida a 90 V até que o corante indicador atingisse o final do gel de separação. O padrão de massa molecular utilizado como curva de referência foi o SDS-Page *Molecular Weight Standard Low Range* (Bio-Rad) que compreende proteínas entre 97,4 a 14,4 kDa. Após o término da corrida, os géis foram corados pelo método de coloração de Prata ou pela coloração de Coomassie Brilliant Blue (CBB).

4.7 Western Blotting

Após o final da corrida eletroforética, o gel foi imerso em tampão de transferência de *Western blot* (Tris 25 mM, glicina 192 mM, e metanol a 20%) durante 15 minutos e em seguida, foi realizada a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose [polyvinylidenedifluoride (PVDF)] de 0,45 µm (Immobilon-P Membrane) em cuba Mini Protean (Bio-Rad). O processo de transferência durou aproximadamente 1 hora (90 V) e o padrão de massa molecular pré corado (Pre-stained Protein Standard - Novex) foi utilizado como controle.

Após a transferência, a membrana foi cortada em tiras verticais de aproximadamente 4 mm e estas foram imersas em solução bloqueadora de PBS-T (0,05% de Tween-20) com 5% de leite em pó desnatado (Molico) e ficaram em agitação constante, à temperatura ambiente, por uma hora. Após o bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos, as membranas foram lavadas quatro vezes durante 5 minutos com PBS-T e incubadas *overnight* (4 °C) com anticorpos primários (soro de animais infectados com *H. capsulatum*) diluídos 1:50 em PBS-T com 1,5% de leite em pó desnatado.

Após a incubação com o soro dos animais (anticorpo primário), as tiras foram lavadas com PBS-T seis vezes por cinco minutos em cada lavagem. Para a detecção dos anticorpos, foi utilizado o conjugado enzimático anti-mouse IgG *peroxidase-linked species-specific whole antibody* (GE Healthcare), diluído 1:2500 no mesmo diluente do soro e incubado a temperatura ambiente por uma hora. Realizou-se lavagem com PBS-T e a reação foi revelada com o Amersham ECL *Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare) adicionando-se as soluções as tiras e cobrindo-as com filme Amersham *Hyperfilm* ECL (GE Healthcare), para detecção da reação. Após a exposição ao filme, este foi colocado no revelador até o aparecimento da banda, lavado em recipiente com água, deixado no fixador por 2 minutos, lavado novamente por 5 minutos em água corrente e pendurado até secar.

4.8 Predição in silico de peptídeos a partir da sequência do antígeno M

A predição *in silico* foi realizada online utilizando o MHC-II *Binding Predictions* (http://tools.iedb.org/mhcii/) disponibilizado pelo *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB) (http://www.iedb.org/), o qual utiliza diferentes algoritmos

de predição para analisar peptídeos gerados a partir de sequências de proteínas em relação à capacidade de ligação ao MHC de classe II alelo específico. A predição foi realizada com a análise da sequência do antígeno M [formato FASTA (GenBank: AAB84182.2)], pelo método Consenso (WANG et al., 2008), o qual calcula a média dos métodos de predição disponíveis no banco de dados gerando um *rank* em porcentagem único, quanto à geração de peptídeos ligantes a MHC-II de camundongos da linhagem C57BL/6 [(H-2-I), H-2-IAb]. Após a análise da sequência da proteína pelo IEDB (predição de ligação ao MHC-II), foi gerado uma tabela de classificação (*rank*) dos peptídeos e os com percentual abaixo de 10% ou com valores de IC-50 menor que 1000 nM foram considerados possíveis "ligantes" ao MHC-II (figura 11) (WANG et al., 2008).





Predição de peptídeos com capacidade de acoplamento ao MHC de classe II de camundongos C57/BL6 (H2-IAb).

4.9 Método de ensaio de linfoproliferação

4.9.1 Obtenção das células dos linfonodos

Após a coleta dos linfonodos, estes foram macerados em meio simples (RPMI 1640, 25 mM de HEPES, 2 g/L de bicarbonato de sódio, 2 g/L de Glicose, 25 µg/L de gentamicina) e o líquido foi filtrado em *cell strainer* e armazenado em tubo cônico, os quais foram centrifugados a 300 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi suspenso em 6 ml de NaCl 0,2% (gelado) por 15 segundos (lise das hemácias) e em seguida foi adicionado 6 mL da solução de NaCl 1,6% (gelado) para interromper o processo. As amostras foram centrifugadas novamente e suspensas em meio simples (5 ml) (lavagem), centrifugadas e ressuspendidas em 1 ml de meio simples e contadas em câmara de Neubauer (antes diluir 1/100) coradas por Azul de *Trypan* (Sigma) para determinar viabilidade (QUAH; PARISH, 2010).

Após a contagem das células e verificação da viabilidade, foram separadas células para o controle negativo de fluorescência, o qual foi cultivado em placa de 96 poços juntamente com as amostras marcadas, e outra alíquota para marcação com CFSE (*Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*) (Thermo Fisher Scientific).

4.9.2 Marcação com CFSE

Foi separada a alíquota de células para a marcação com CFSE e preparada uma suspensão contendo 10^7 células viáveis/ml em meio simples (RPMI 1640, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina, 50µM de 2 β -mercaptoetanol) a temperatura ambiente em tubo cônico.

Após o preparo do estoque de CFSE a 5 mM, 1 µl de CFSE (solução estoque) foi adicionado a 1 ml de PBS estéril (PBS+CFSE-5µM). O tubo cônico contendo as células (10⁷ células em 1 ml de meio simples) foi protegido da luz, com papel alumínio, e adicionou-se o 1 ml de PBS (CFSE 5 µM em PBS 1X), diluindo o CFSE (1:2) (concentração final 2,5 µM), agitando-se periodicamente no por 10 minutos a temperatura ambiente. Para interromper a marcação foi adicionado igual volume de soro fetal bovino (SFB) inativado gelado. Em seguida, o volume do tubo falcon foi completado com meio suplementado (RPMI, 1% de aminoácidos não essenciais, 1%

piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina, 50 μ M de 2 β -mercaptoetanol, 10% de SFB inativado) e incubado por 5 minutos no gelo, centrifugado e descartado o sobrenadante, foi adicionado ao *pellet* 10 ml de meio suplementado, foram realizadas duas lavagem e o *pellet* suspenso em 2 ml de meio suplementado e as células foram contadas em câmara de Neubauer com Azul de *Trypan* (Sigma). Realizada a contagem, foi preparada uma suspensão de 3x10⁶ células/ml e plaqueada 100 μ l/poço (3x10⁵ células) e adicionado 100 μ l dos estímulos. As placas foram protegidas da luz e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 5 dias no escuro (120 horas) (QUAH; PARISH, 2010).

O estimulo foi preparado com o dobro da concentração, para que a concentração final fosse 1x após a adição das células. Para estímulo com Concanavalina A, a concentração final no poço foi de 4 µg/ml.

4.9.3 Preparo para leitura no citômetro de fluxo

Terminado o período de incubação, as células foram visualizadas no microscópio, centrifugadas (300 g por 10 minutos a 4°C) na própria placa, foi descartado o sobrenadante e o *pellet* suspenso em 200 µl de tampão FACS e o processo foi repetido. Após a lavagem das células foi adicionado 200 µl de paraformaldeído 0,4% para fixar as células e estas foram transferidas para tubos de citometria devidamente identificados.

4.9.4 Ensaio de linfoproliferação com estímulos específicos

O ensaio de linfoproliferação foi realizado com linfonodos inguinais e poplíteos de camundongos C57BL/6 machos com 6 a 8 semanas de vida. Três animais foram imunizados com o 20 μ g/ml de uma mistura de 3 peptídeos (**mix**), resultando em 4 grupos de peptídeos (**mix1** – peptídeos 1,2,3; **mix 2** – peptídeos 4,5,7; **mix 3** – peptídeos 10,11,12 e **mix 4** – peptídeos 6,8,9) com adjuvante completo de *Freund* (CFA) no coxim plantar (**figura 12**). Após sete dias da imunização os animais foram sacrificados e os linfonodos inguinais e poplíteos foram retirados e processados para realização do ensaio *in vitro*. O estímulo na placa foi realizado com cada peptídeo separado nas concentrações finais de 5 μ g/ml, 10 μ g/ml e 20 μ g/ml em placa de 96 poços em triplicada para cada concentração diferente por 120 horas. Também foram

preparados poços para células sem estímulo e para controle positivo de proliferação (Concanavalina A na concentração final de 4 µg/ml), todos em triplicata.



Figura 12 – Imunização dos grupos de animais com peptídeos.

Imunização de quatro grupos de animais (três animais cada) com misturas de peptídeos (mix) e adjuvante no coxim plantar.

4.10 Ensaio de fagocitose e cinética de apresentação de moléculas de MHC-II

4.10.1 Culturas celulares

Os macrófagos J774.16 foram cultivados em meio de cultura celular, DMEM com 10% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos não essenciais e gentamicina (20 μ M) em estufa à 37 °C em 10% de CO₂.

Para diferenciação de macrófago derivado de medula óssea foi utilizado os fêmures e tíbias de um camundongo C57BL/6. Após a remoção dos fêmures, estes foram transferidos para placa de petri, foi adicionado 7 ml de PBS 1x estéril, as extremidades de cada fêmur foi removida e com seringa de 1 ml a lavagem do lúmen dos ossos foi realizada para retirada da medula óssea, centrifugou-se a 300 g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi suspenso em 1 ml de

meio RPMI e cada 250 µl foi pipetado em uma 1 placa de petri descartáveis (90x15 mm) (4 placas no total). A cada placa foi adicionado 10 ml de **meio R20/30** (RPMI 1640, 20% soro fetal bovino inativado, 30% e sobrenadante de células L929) e foram incubadas em estufa com tensão de CO_2 5% a 37°C. No quarto dia foi adicionado mais 10 ml de meio R20/30 e no sétimo dia os macrófagos foram coletados (TROUPLIN et al., 2013; WEISCHENFELDT; PORSE, 2008).

Após o período de diferenciação, o sobrenadante de cada placa foi descartado, adicionado 5 ml de meio RPMI e as células retiradas, com auxilio de *cell scraper*, transferidas para tubo falcon, centrifugadas a 300 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 1 ml de meio R20/30. Em seguida as células foram contadas em câmara de Neubauer, a viabilidade verificada com Azul de Trypan (Sigma).

4.10.2 Produção de sobrenadante de cultura de células L929

As células L929 foram cultivadas com meio R10 (RPMI 1640, 10% SFB inativado) em garrafas de 150 cm² até atingirem 100% de confluência (a cada três dias o meio foi trocado) (5% CO₂, 37 °C), atingindo a confluência desejada, o sobrenadante foi descartado e adicionado 90 ml de meio R10 e a garrafa mantida em estufa com 5% de tensão de CO₂ a 37°C por 7 dias. Após o período o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 450 g por 10 minutos e o sobrenadante congelado a -80 °C (TROUPLIN et al., 2013; WEISCHENFELDT; PORSE, 2008).

4.10.3 Cinética de fagocitose e de apresentação de MHC de classe II com levedura inativada de *H. capsulatum* analisado por citometria de fluxo

Os ensaios de fagocitose e cinética de expressão de MHC de classe II foram avaliados pelo método de citometria de fluxo. Os macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram adicionados em placas de 24 poços em volume final de 500 µl, seguido de ativação com IFN-γ (156 U/ml) durante 12 horas. Após o tempo de ativação, as leveduras, previamente marcadas com UVITEX 2B (Sigma) e inativadas por temperatura (60 °C por 60 min), foram adicionados aos macrófagos, na proporção de 3:1 (CARNEIRO et al., 2014).

Para a marcação com UVITEX 2B, foi adicionado 1 µl de uma solução de 10% de UVITEX 2B (Sigma) em 1 ml de PBS 1x contendo 1 x 10⁸ leveduras (*H. capsulatum*), seguido por incubação de 1 min e duas lavagens com PBS 1x. Após tempos determinados de fagocitose (1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas), as células foram lavadas com PBS 1x para retirar as leveduras que não foram fagocitadas e desprendidas da placa com *cell scraper*. As células foram ressuspensas em tubos de citometria e marcadas com os seguintes anticorpos: anti-CD11b (clone M1/70) de camundongo, anti-MHCII Pe (clone M5/114.15.2) de camundongo (CARNEIRO et al., 2014).

As amostras foram incubadas por 30 min a 4 °C. O citômetro utilizado foi o BD FACS Fortessa LSR (BD). Para a estratégia de seleção positivas, primeiramente as células positivas para CD11b foram selecionadas, seguida da seleção de células vivas e assim selecionando a população final. A população final consiste em macrófagos contendo leveduras, nas quais foram adquiridos 100000 eventos. A quantificação de MHC-II foi baseada na medição da porcentagem de células MHC-II positivas e na mediana de intensidade de florescência (MIF).

4.10.4 Cinética de fagocitose com levedura inativada de *H. capsulatum* analisado por microscopia de fluorescência

Os macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram adicionados placas de 24 poços com volume final de 500 μ l/poço (5 x 10⁵ células), seguido de ativação com IFN- γ (156 U/ml) durante 12 horas. Após o tempo de ativação, as leveduras previamente marcadas com FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Sigma) e inativadas por temperatura (60 °C por 60 minutos), foram adicionadas aos macrófagos, na proporção de 3:1.

Para a marcação foi adicionado uma solução de FITC (200µl), previamente preparada, na concentração de 50 µg/ml, em um *pellet* contendo 1 x 10⁸ leveduras (*H. capsulatum* G217b), estas foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz, seguido de duas lavagens com PBS 1x, para retirada do corante não ligado. Após tempos determinados de fagocitose (1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas), o meio de cultura foi retirado dos poços, seguido de uma lavagem com 0,15 M de α-metil manopiranosídeo (Sigma) em PBS 1X por 5 minutos e três lavagens com PBS 1X para retirada das leveduras não fagocitadas. Adicionou-se

500 µl de meio a cada posso e a contagem das células foi realizada no microscópio de fluorescência EVOS (Thermo Fisher Scientific).

O índice fagocítico (IF) foi calculado pelo nº leveduras internalizadas dividido pelo nº de macrófagos presentes no campo e para cada poço da triplicata foram contadas 200 células.

4.10.5 Avaliação da viabilidade de células J774.1A em cultura com 20 μg/ml de cada peptídeos (teste de MTT)

Para avaliar a viabilidade das células após exposição aos peptídeos foi preparada uma placa de 96 poços com a linhagem de macrófagos J774.1A, contendo $5x10^5$ células por poço em meio de cultura (RPMI 1640, 10% soro fetal bovino inativado, 20 µg/ml de gentamicina). Após aderência das células (12 horas), o meio de cultura foi removido e adicionou-se 100 µl do peptídeo na concentração de 20 µg/ml (preparado no mesmo meio de cultura). Cada peptídeo foi testado em triplicata (VAN DE LOOSDRECHT et al., 1994).

A placa foi incubada a 37°C com 5% de CO2 no escuro por 24 horas. Após o tempo de incubação, as soluções foram removidas e adicionou-se uma solução de MTT [3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma) na concentração de 5 mg/ml e incubou-se por 4 horas a 37°C com 5% de CO₂ no escuro. Em seguida o MTT foi removido e adicionaram-se 100 μ l de isopropanol (Merk) para dissolver o precipitado e a leitura foi realizada na DO de 595 nm (VAN DE LOOSDRECHT et al., 1994).

A viabilidade das células foi calculada conforme a equação abaixo.

% células viáveis = média do teste x 100% / média do controle negativo (células não tratadas).

4.11 Ensaios in vivo

4.11.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, com média de idade entre 6 e 8 semanas. Os animais foram mantidos em condições SPF (*Specific Pathogen Free*), no biotério de camundongos isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), dentro das normas preconizadas pela Comissão de Ética e Experimentação Animal.

4.11.2 Infecção dos animais

As leveduras de *H. capsulatum*, após crescimento por 72 horas, foram transferidas para tubo falcon, centrifugadas (2000 RPM, 10 minutos, 20 °C), o meio de cultura foi descartado e o *pellet* lavado 3 vezes com PBS 1X, a viabilidade foi verificada com Azul de Trypan (Sigma) e a contagem das leveduras foi realizada em câmara de Neubauer (antes da administração). Os animais foram anestesiados com uma solução contendo 80 mg/kg de ketamina e 10 mg/kg de xilazina e uma incisão transversal de aproximadamente 1 cm na pele do pescoço foi realizada, expondo a traqueia, com o auxílio de uma seringa de 1 ml, 50 µl da suspensão de fungos foi injetada. Imediatamente após a infecção, a incisão foi suturada e os camundongos mantidos aquecidos. O inóculo utilizado foi de 1,0 x 10^6 leveduras (inóculo subletal).

4.11.3 Esquema de imunização

Os animais foram imunizados por via subcutânea com 20 µg do peptídeo escolhido, obtido a partir da predição *in silico* da análise da sequência de aminoácido do antígeno M, em adjuvante completo (CFA) e incompleto de *Freund* (IFA) ou MPLA (Monofosforil Lipídio A). A mistura (40 µl) foi inoculada em cada animal em uma das patas traseiras por via subcutânea (primeira dose) e duas doses posteriores, separadas por um período de 7 dias, via subcutânea na base da calda. Os camundongos controles foram administrados o adjuvante e PBS 1X **(figura 13)**. Em relação ao CFA/IFA, a primeira dose nos animais foi com CFA e as duas posteriores com IFA.

Figura 13 – Esquema de imunização dos animais.



Esquema referente ao modelo experimental realizado em camundongos. **Dias** (dia que o procedimento experimental foi realizado; 7 dias de intervalo entre cada procedimento); **Imunização 1** (primeiro tratamento); **Imunização 2** (segundo tratamento); **Imunização 3** (terceiro tratamento); **Infecção** (infecção intratraqueal com dose subletal de leveduras de *H. capsulatum*); **Sacrifício** (sacrifício dos animais para retirada e análise dos órgãos).

4.11.4 Processamento dos órgãos e unidades formadoras de colônia (UFC)

Os órgãos foram rompidos manualmente em 2 ml de PBS 1x (pulmão e fígado) ou 1 ml de PBS 1x (baço). Essas soluções foram plaqueadas (100 µl) após diluições (1:20 e 1:50 para pulmão e 1:10 para baço e fígado) em meio BHI suplementado (5% de sangue de carneiro desfibrinado, 1% de cisteína, 2% de glicose e 20 µg/ml de gentamicina) e as placas mantidas a 37°C por até 20 dias e 1 ml do macerado do pulmão foi reservado, com inibidor de protease, para análise do perfil de citocinas. O número de colônias formadas e o resultado foram expressos em UFC por grama de tecido (DEEPE; GIBBONS, 2001; DIAS et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2012; TABORDA et al., 1998).

4.11.5 Esquema geral dos ensaios in vivo testados

Inicialmente foram testados dois ensaios de triagem, utilizando os peptídeos já sintetizados, para avaliar diminuição de UFC nos pulmões e baços de animais tratados e posteriormente desafiados com dose subletal do fungo. Após obter os resultados, foram escolhidos três peptídeos com melhor desempenho na diminuição da carga fúngica nos pulmões, para realizar as repetições dos ensaios. Também foram testados outros três peptídeos que quando utilizados para estimular células de

linfonodos de animais tratados com os respectivos peptídeos, produziram citocinas com perfil de resposta Th1, em maior quantidade quando comparado às células sem estímulo específico, nos sobrenadantes de culturas celulares. O esquema geral dos grupos utilizados nos ensaios *in vivo* está representado na **figura 14**.





Cada grupo foi composto por 5 ou 6 animais. Os grupos testes foram imunizados profilaticamente com os peptídeos de interesse (um peptídeo para cada grupo teste) e adjuvante de escolha. Os grupos controles foram: grupo controle não tratado (controle positivo de infecção); grupo Sham; grupo controle tratado com adjuvante de escolha e PBS 1x.

A triagem com os peptídeos já sintetizados foi realizada nos ensaios *in vivo* 1 e 2 e após escolha de três peptídeos, com melhor resultado, foram avaliados nos ensaios *in vivo* 3, 4 e 5:

- Ensaio *in vivo* 1 peptídeo 1; peptídeo 2; peptídeo 3; peptídeo 8; peptídeo 9 (grupos testes, cinco no total com n=5 animais para cada grupo) (todos os grupos testes receberam adjuvante) e grupos controles (não tratado; sham; tratado com adjuvante e PBS 1x).
- Ensaio *in vivo* 2 peptídeo 5; peptídeo 6; peptídeo 7; peptídeo 8 (grupos testes, quatro no total com n=5 animais para cada grupo) (todos os grupos testes receberam adjuvante) e grupos controles (não tratado; sham; tratado com adjuvante e PBS 1x).

- Ensaios *in vivo* 3 e 4 após a escolha dos peptídeos com melhores resultados, em relação à diminuição de UFC nos pulmões, foram realizados os ensaios 3 e 4 testando os peptídeo 6, 8 e 9 (grupos teste, adjuvante CFA e IFA) e os grupos controles (não tratado; sham; tratado com adjuvante e PBS 1x).
- Ensaios *in vivo* 5 e 6 (MPLA) o peptídeo 6 foi testado utilizando-se o MPLA como adjuvante e foi comparado com os grupos controles (não tratado; sham; tratado com adjuvante e PBS 1x).
- Ensaios *in vivo* 7 e 8 foram testados os peptídeos 1, 10 e 12 (grupos teste, adjuvante CFA e IFA) e os grupos controles (não tratado; sham; tratado com adjuvante e PBS 1x).

4.11.6 Cinética de produção de citocinas

Para avaliar a produção de citocinas nos pulmões de animais imunizados com os peptídeos 6, 8 e 9, e desafiados com dose subletal do fungo, foi realizado um ensaio *in vivo* com grupos testes duplicados para cada peptídeo testado (peptídeo 6; peptídeo 8 e peptídeo 9) e para os controles (não tratado; sham; tratado com adjuvante e PBS1X). Os grupos testes foram imunizados e infectados em paralelo, sendo sacrificados em dias diferentes (48 horas após infecção e 7 dias após infecção) para avaliar o perfil de citocinas após a infecção de animais submetidos a imunização. Após o sacrifício, os pulmões foram retirados, macerados e o sobrenadante acrescido de inibidor de proteases foi congelado a -80 °C, até a quantificação das citocinas.

4.12 Detecção e quantificação de citocinas

As quantificações das citocinas foram realizadas do homogeneizado de pulmão dos camundongos utilizados nos ensaios experimentais e dos sobrenadantes do ensaio de linfoproliferação (recolhido após 120 horas de cultura e armazenado a -80 °C).

A quantificação das citocinas foi feita pelo método de *Cytometric Bead Array* (CBA), segundo instruções do fabricante (BD). Antes de analisar as amostras, foi realizada a curva padrão com as diluições (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256) definindo a concentração do padrão entre 20 - 5000 pg/ml. Após a realização do padrão, foi feita a reconstituição do Mix, no qual são adicionados 10 µl do anticorpo específico para cada citocina em cada amostra. Todos os procedimentos foram realizados a em banho de gelo. Após adicionar o mix foram acrescentados 50 µl do anticorpo de detecção fluorocromo, PE, por amostra e foram incubadas por duas 2 horas, protegidas da luz. As "beads de setup" foram preparadas, marcando três tubos (A, B e C): nos tubos B e C foram adicionados 50 µl dos reagentes de marcação, FITC e PE respectivamente, e foram adicionados 400 µl da solução de lavagem. No tubo A foi adicionado 450 µl desta solução. As "beads de setup" foram incubadas por 30 minutos (temperatura ambiente), protegidas da luz. Após este procedimento, as amostras foram analisadas, no citômetro BD FACS Fortessa LSR (BD), e analisadas no software FCAP Array 3 (BD). As concentrações individuais de citocinas foram indicadas por suas intensidades fluorescentes. Os padrões de citocina foram diluídos em série para facilitar a construção de curvas de calibração, que foram necessárias para determinar as concentrações das citocinas nas amostras testadas. Os limites mínimos de detecção para as citocinas nos kits utilizados (Th1; Th2; Th17) foram 0,1 pg/ml para IL-2; 0,03 pg/ml para IL-4; 1,4 pg/ml para IL-6; 0,5 pg/ml para IFN-γ; 0,9 pg/ml para TNF-α; 0,8 pg/ml para IL-17A e 16,8 pg/ml para IL-10, os resultados obtidos foram obtidos em pg/ml.

4.13 Extração do complexo MHC-peptídeo por método de imunoprecipitação

Depois de retirada a medula óssea de 10 animais e diferenciação em macrófagos, em placas de Petri descartáveis (90x15 mm) (40 placas), foi realizada a fagocitose de leveduras de *H. capsulatum*, inativadas por calor (1 hora a 60 °C por 1 hora) na proporção de 5 leveduras para cada 1 macrófago (5:1) por 4 horas. Terminado o período de fagocitose, parte do meio de cultura foi retirado, deixando aproximadamente 5 ml nas placas. Os macrófagos foram retirados das placas com o auxilio de *cell scraper* e transferidos para tubos falcon de 50 ml, centrifugados a 300 g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com PBS 1x, congelado em nitrogênio líquido (10 minutos) e reservado a -80 °C **(figura 15)**.



Figura 15 – Esquema da diferenciação de macrófagos e fagocitose.

Esquema de diferenciação de macrófagos a partir de medula óssea de camundongos C57BL/6 e fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* inativadas por calor. Após o processo de fagocitose e expressão de moléculas de MHC-II as células foram congeladas e estocadas a -80 °C.

O células do *pellet* (aproximadamente 5 x 10^8 macrófagos) foram descongeladas e lisadas em tampão Tris [50 mM Tris HCI (pH 7,6), 150 mM NaCI com 1% de Igepal-CA630 (Sigma) suplementado com inibidor de protease (Roche)] por 2 horas a 4 °C. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 1300 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante recolhido e centrifugado a 100000 g por 1 hora. Após a centrifugação a 100000 g (figura 16) o sobrenadante contendo o complexo MHC de classe II carregado com o peptídeo foi submetido à cromatografia de afinidade através de esférulas magnéticas conjugadas com Proteína G [(*Dynabeads Protein G Immunoprecipitation* Kit – (Thermo Fisher Scientific)], seguido de eluição dos complexos para posterior análise, conforme orientações do fabricante. As esférulas foram associadas com o anticorpo anti-MHC-II (clone KH74) (Biolegend) de camundongo (figura 17).





Depois de descongeladas, as células foram lisadas com tampão tris (contendo Igepal-CA630) e passaram por processo de centrifugação. O sobrenadante foi reservado para imunoprecipitação dos complexos peptídeo-MHC-II.



Figura 17 - Esquema de isolamento e purificação do complexo peptídeo-MHC-II.

Os complexos MHC-II-peptídeo foram isolados do sobrenadante das células lisadas utilizando o kit de imunoprecipitação *Dynabeads* proteína G (*beads* magnéticas) acoplado a anticorpo anti MHC-II de camundongos. Primeiramente o anticorpo foi ligado a *bead* magnética e um processo de *crosslink* foi realizado (fortalecimento da ligação para o anticorpo não ser eluído junto com o alvo). Após o *crosslink* foi adicionada a amostra, para ligação dos complexos peptídeo-MHC-II, seguido de eluição.

Para iniciar o protocolo de imunoprecipitação, as *beads* magnéticas (proteína G) foram agitadas em vortex por 30 segundos e 200 µl transferidos para tubos de 2 ml, 4 tubos no total (800 µl de *beads*). Os tubos foram encaixados na estante magnética, as *beads* se ligaram a parede do tubo e o sobrenadante foi removido. Em seguida foi adicionado o anticorpo anti-MHC-II [previamente diluído em 0,02% de Tween 20 em PBS 1X (PBST)] as *beads* (50 µg de anticorpo para 200 µl de *beads*) e incubado em agitação (rotação) por 1 hora a temperatura ambiente e o sobrenadante descartado.

Para evitar a eluição do anticorpo anti-MHC-II com o complexo MHC-IIpeptídeo, foi realizado o "crosslink" do anticorpo anti MHC-II com as *beads* utilizando BS³ 5 mM diluído no *Buffer Conjugation* (20 mM Na₃PO₄, 0,15 M NaCl, pH 7.9), o qual foi adicionado as *beads* (800 µl por tubo), seguido de incubação de 30 minutos em agitação (rotação) a temperatura ambiente. Após a incubação foi adicionado o *Quenting Buffer* (1 M Tris HCl, pH 7.5) (200 µl por tubo) e incubado por 15 minutos em agitação (rotação) para interromper a reação. Os tubos foram acoplados a estante magnética, o sobrenadante foi descartado e as *beads* ligadas ao anticorpo anti-MHC-II foram lavadas três vezes com 800 µl de PBST (por tubo).

Após as lavagens, os tubos foram colocados na estante magnética, o sobrenadante removido e foi adicionada a amostra contendo os complexos de MHC-II-peptídeo (sobrenadante do lisado de macrófagos após fagocitose), 1 ml por tubo, retirado da estante, agitado gentilmente e incubado em agitação (rotação) por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a ligação do alvo ao anticorpo (*bead*-anticorpo-MHC-II), os tubos foram acoplados a estante magnética, o sobrenadante descartado e foi realizada três lavagens com *Washing Buffer* (fornecido pelo kit) (800 µl por tubo). Após as lavagens, os tubos foram colocados novamente na estante magnética, o sobrenadante removido, adicionou-se 200 µl de *Washing Buffer* e as suspensões foram transferidas para um tubo novo.

O tubo contendo a suspensão de *bead*-anticorpo-MHC-II foi acoplado a estante magnética, o sobrenadante retirado, foi adicionado 100 µl de *Elution Buffer* (50 mM glicina, pH 2,8), a solução foi incubada em agitação (rotação) por 2 minutos a temperatura ambiente para liberação do complexo MHC-II- peptídeo do anticorpo ligado a *bead* de proteína G. Após a incubação o tubos foi colocado na estante magnética e o sobrenadante foi coletado e congelado a -80 °C para posterior análise.

4.14 Identificação dos peptídeos acoplados ao MHC-II por espectrometria de massa

A amostra proveniente da imunoprecipitação foi enviada ao laboratório de Glicoproteômica do Departamento de Parasitologia do ICB/USP para ser realizado o processo de tripsinização, dessalinização e quantificação da amostra para subsequente análise por LC-MS/MS em espectrômetro de massa (plataforma nanoLC Easy-LTQ Orbitrap Velos-ETD). A análise na plataforma nanoLC Easy-LTQ Orbitrap Velos-ETD). A análise na plataforma nanoLC Easy-LTQ Orbitrap Velos-ETD) do ICB/USP e os dados gerados foram analisados no *software* MaxQuant (https://www.maxquant.org/) após ser adicionado as sequências de proteínas, no

66

formato FASTA, de *H. capsulatum* depositadas no Uniprot (https://www.uniprot.org/) para comparação com as sequências encontradas (figura 18).



Figura 18 – Fluxo de trabalho para identificação de peptídeos por espectrometria de massa.

Proteínas provenientes de lisado de células são submetidas a centrifugações e a uma etapa de imunoprecipitação para isolamento do alvo. Em seguida a amostra obtida é tripsinizada para análise de espectrometria de massa e os dados gerados são analisados no *software* MaxQuant.

4.15 Análise de dados e testes estatísticos

Todos os dados (gráficos de barras) (cinética de fagocitose, cinética de apresentação de MHC-II, quantificação de UFC e citocinas) foram gerados com o auxilio do *software GraphPad Prism* 6 e para avaliar os resultados dos experimentos foram utilizados teste de análise de variância ANOVA e/ou teste t (t-*test*) não pareado, com pós-teste de Tukey ou Dunnett (*software GraphPad Prism* 6).

4.16 Estrutura molecular

A predição da estrutura molecular do antígeno M foi realizada a partir da sequência FASTA, depositada no GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) (GenBank: AAB84182.2), no servidor do "The Iterative Threading Assembly Refinement" (I-TASSER) (plataforma de predição e modelagem de proteínas) (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010) e a localização e marcação das sequências dos peptídeos na estrutura da proteína foi feita com o auxilio do *software* PyMOL 2.3 (software de visualização molecular) (https://pymol.org/2/).

4.17 Síntese, pureza e preparo dos peptídeos

Os peptídeos foram sintetizados pela AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento (Diadema, SP, Brasil) com pureza ≥ 95% determinada por HPLC e espectrometria de massa e com troca do contra-íon de TFA (ácido trifluoroacético) pelo contra-íon acetato e foram solubilizados em PBS 1X ou PBS 1X com 20% de DMSO, de acordo com a solubilidade de cada sequência.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão do antígeno M recombinante

Após o descongelamento e crescimento da cepa de *E. coli* M15 já transformada, as etapas de expressão a 37 °C e sonicação para extração das proteínas foram realizadas, entretanto a expressão da proteína não foi observada em gel de SDS-PAGE 12%. O processo foi repetido quatro vezes sem sucesso e alterações na técnica foram realizadas, como a variação da concentração de IPTG (sem IPTG; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,50 mM; 0,8 mM e 1 mM) (indutor de expressão de proteína recombinante), contudo, mesmo com a alteração, a proteína não foi obtida junto ao Prof. Allan Guimarães (UFF) e após a execução do mesmo protocolo, a proteína recombinante foi observada em gel **(figura 19)**.



Figura 19 – Perfil eletroforético do lisado de bactérias após expressão em gel de SDS-PAGE 12%.

Poço (1) Padrão e peso molecular; poços (2 a 5) - expressão da proteína M recombinante em destaque; poços (6 a 10) - controle da expressão sem indução com IPTG. Gel corado com coloração de Coomassie Blue.

5.2 Purificação do antígeno M recombinante por cromatografia de afinidade

A primeira purificação do antígeno M recombinante foi realizada em coluna de vidro contendo resina com afinidade para calda de histidina (Ni-NTA) (Qiagen) acoplada a uma bomba peristáltica e a eluição foi realizada com tampão contendo imidazol 500 mM (responsável por competir com a ligação da calda de histidina a resina, desta maneira liberando a proteína ligada). A **figura 20** demonstra a proteína recombinante purificada (em maior quantidade) e proteínas contaminantes proveniente da *E. coli.*



Figura 20 - Perfil eletroforético após purificação da proteína em gel de SDS-PAGE 12%.

Purificado do sonicado após expressão. Poço (1) - padrão de massa molecular; poços (2 a 9) - frações do purificado. Gel corado com coloração de Coomassie Blue.

Com o objetivo de diminuir a quantidade de contaminantes eluídos com a proteína de interesse e considerando que estes teriam baixa afinidade pela coluna, o processo de eluição foi realizado com concentrações crescentes de imidazol (100 mM, 200 mM 300 mM, 400 mM e 500 mM), para eluir primeiramente as proteínas contaminantes (descarte) e posteriormente o alvo de interesse em maiores concentrações de imidazol. Contudo a proteína recombinante foi eluída em baixas concentrações de imidazol (100 e 200 mM, concentrações mínimas utilizadas) não diminuindo os contaminantes no final do processo (Figura 21).



Figura 21 - Perfil eletroforético das frações de proteína recombinante eluída em concentrações crescentes de imidazol

Gel SDS-PAGE 12% - Eluição com concentrações crescentes de imidazol. Poço (1) - padrão de massa molecular; poços (2 e 3) - eluição com 100 mM imidazol; poços (4 a 8) - eluição com 200 mM imidazol. Gel corado com coloração de Coomassie Blue.

O imidazol é responsável por competir com as ligações das proteínas à coluna de purificação, desta maneira, sua função é eluir a amostra. Na concentração de 10 mM é utilizado para retida de contaminantes com baixa afinidade pela coluna; ao adicionar uma etapa de lavagem da coluna com tampão contendo imidazol 50 mM (10 volumes de coluna), antes da eluição da amostra, também não foi verificado diminuição de contaminantes nas frações eluídas.

Devido à toxicidade da ureia sobre células de cultura (macrófagos e linfócitos) e animais, os experimentos *in vitro* (com células) e *in vivo* (imunização de animais) foram impossibilitados. Desta maneira, na tentativa de expressar o antígeno M solúvel em tampão aquoso (sem ureia) o método de expressão foi alterado, diminuindo a temperatura de incubação para 18 °C *overnight*, conforme **item 4.3.2**, contudo não foi observada a banda característica de expressão do antígeno M recombinante **(figura 22)**.



Figura 22 - Perfil eletroforético do lisado de bactérias após expressão a 18 °C overnight

Gel de SDS-PAGE 12%. Poço (1) padrão de massa molecular; poço (2) - extrato bruto da proteína expressa após sonicação (*pellet*); poços (5 a 10) - sobrenadante da expressão a 18°C (ausência de expressão da proteína).

Desta maneira, na tentativa de retirar a ureia presente na proteína recombinante, a expressão foi realizada a 37 °C, como descrito no **item 4.3.1**, com alteração no método de purificação. Após expressão, sonicação e diluição dos corpúsculos de inclusão (contendo o antígeno M) e proteínas de *E. coli* (**item 4.3.1**), a amostra foi diluída vagarosamente (1ml/minuto) em 2 litros de tampão aquoso (**item 4.4.2**) e aplicada a uma coluna HisTrap HP (GE Healthcare) acoplada ao sistema de cromatografia AKTA (GE Healthcare) seguido de eluição linear com aumento gradual da concentração de imidazol no tampão de eluição. Essa técnica de purificação foi realizada duas vezes, entretanto a proteína foi visualizada em apenas uma fração das 40 eluídas (**figura 23**); outro problema na purificação foi não visualização de picos de proteínas eluídas nos cromatogramas (**figura 24**).


Figura 23 - Perfil eletroforético proteína recombinante purificada no sistema AKTA (SDS-PAGE 12%).

Proteína purificada em coluna HisTrap Hp (GE) acoplada ao sistema AKTA. Poço (1) – padrão de massa molecular; poços (2 a 6 e 8) - frações negativas; poço (7) - fração positiva para a proteína purificada. Gel corado com prata.

Figura 24 – Cromatograma da purificação no sistema AKTA.



Ausência de formação de picos no cromatograma de eluição de proteína.

Outra modificação de método foi a diluição de 4 ml do produto de expressão a 37 °C (item 4.3.1) em 40 ml de tampão (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,9), por gotejamento em velocidade mínima da bomba peristáltica e com agitação magnética da amostra, seguido de purificação em coluna acoplada a bomba peristáltica (item 4.4.1) e eluição com concentrações crescentes de imidazol no tampão de eluição

(100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM e 500 mM). Após análise das frações coletadas em gel de poliacrilamida (figura 25) foi verificado baixo rendimento de proteína recombinante.



Figura 25 - Perfil eletroforético após purificação da proteína em gel de SDS-PAGE 12%.

Gel SDS-PAGE 12% - Purificação da proteína diluída 10 vezes e eluição com tampão sem ureia. Poço (1) – padrão de peso molecular; poço (2) – proteína eluída com imidazol 100 mM; poços (3 a 7) proteína eluída com imidazol 200 mM.

A proteína purifica em coluna acoplada a bomba peristáltica, conforme descrito no **item 4.4.1**, também foi submetida a um processo de diálise simples (item 4.5.1) e diálise com diminuição gradual da concentração da ureia **(item 4.5.2)**, com o intuito de trocar do tampão da amostra (6 M de ureia) por tampão aquoso, entretanto, a proteína contida na mostra precipitou nas duas metodologias de diálise utilizadas, não sendo possível recupera-la.

5.3 Western Blotting do produto da expressão após sonicação e extração das proteínas

Para confirmar se a proteína expressa realmente se tratava do antígeno M recombinante, foi realizado *Western Blotting* das proteínas obtidas após o processo de sonicação [testou-se o *pellet* diluído em ureia (puro e diluído 10 x) e o sobrenadante da extração (puro e diluído 10 x)], utilizando como anticorpo primário soro de camundongo infectado com *H. capsulatum* e foi observada apenas uma

banda detectada após a revelação com o anticorpo secundário, confirmando a expressão da proteína recombinante (figura 26).



Figura 26 - Western Blotting para confirmar a expressão do antígeno M recombinante.

(1) padrão de massa molecular (Novex Sharp Pre-stained Protein Standard); (2) proteína em uréia pura (*pellet* do sonicado); (3) sobrenadante do sonicado; (4) proteína em uréia diluída 10 vezes (*pellet* do sonicado); (5) sobrenadante do sonicado diluído 10 vezes.

5.4 Predição *in silico* de peptídeos ligantes a moléculas de MHC de classe II de camundongos C57BL/6 a partir da sequência do antígeno M

Após realizar a predição *in silico* dos peptídeos a partir da sequência da proteína antígeno M [FASTA (GenBank: AAB84182.2)], na ferramenta MHC-II *Binding Predictions* (http://tools.iedb.org/mhcii/) utilizando o método Consenso (WANG et al., 2008), foram obtidos 691 peptídeos com *rank* (%) variando de 1,97 a 86,80, dos quais 54 peptídeos apresentaram *rank* (%) menor que 10. Analisando os *cores* (núcleos) das 54 sequências foram encontrados apenas 12 *cores* diferentes e escolhidos 11 peptídeo (10 *cores* diferentes com *rank* (%) menor que 10) e 1 peptídeo com *rank* (%) 11,06 (total de 12 peptídeos com 11 *cores* diferentes), contudo apresentando IC50 (NN-*align*) menor que 1000, para síntese (Figura 27, 28 e 29). Após sintetizados os peptídeos foram preparados em PBS 1X ou PBS 1X com 20% de DMSO (figura 30).



Figura 27 – Esquema de análise da sequência do antígeno M.

Figura 28 – Tabela dos 55 peptídeos considerados possíveis ligantes na molécula de MHC-II, por predição *in silico*.

Alelo	Início	Final	Peptídeo	Rank (%) Consenso	Core SMM	Core NN
H2-IAb	632	646	ITDAYAYGKPVGAVG	1.97	YAYGKPVGA	YAYGKPVGA
H2-IAb	631	645	IITDAYAYGKPVGAV	2.00	YAYGKPVGA	YAYGKPVGA
H2-IAb	630	644	RIITDAYAYGKPVGA	2.28	DAYAYGKPV	YAYGKPVGA
H2-IAb	633	647	TDAYAYGKPVGAVGD	2.51	YAYGKPVGA	YAYGKPVGA
H2-IAb	<mark>634</mark>	<mark>648</mark>	DAYAYGKPVGAVGDG	2.66	YAYGKPVGA	YAYGKPVGA
H2-IAb	635	649	AYAYGKPVGAVGDGS	5.81	YAYGKPVGA	YAYGKPVGA
H2-IAb	636	650	YAYGKPVGAVGDGSN	7.25	YAYGKPVGA	YAYGKPVGA
H2-IAb	94	108	TSYNNWSNITAASFL	4.71	NNWSNITAA	NNWSNITAA
H2-IAb	93	107	FTSYNNWSNITAASF	4.83	NNWSNITAA	NNWSNITAA
H2-IAb	<mark>97</mark>	<mark>111</mark>	NNWSNITAASFLNAA	4.89	NNWSNITAA	NNWSNITAA
H2-IAb	<mark>92</mark>	<mark>106</mark>	VFTSYNNWSNITAAS	4.99	NNWSNITAA	NNWSNITAA
H2-IAb	95	109	SYNNWSNITAASFLN	5.14	NNWSNITAA	NNWSNITAA
H2-IAb	91	105	GVFTSYNNWSNITAA	5.29	FTSYNNWSN	NNWSNITAA
H2-IAb	96	110	YNNWSNITAASFLNA	8.96	NNWSNITAA	NNWSNITAA
H2-IAb	409	423	PLNTAAYTPNSMSNG	5.03	TAAYTPNSM	YTPNSMSNG
H2-IAb	410	424	LNTAAYTPNSMSNGF	5.16	TAAYTPNSM	YTPNSMSNG
H2-IAb	407	421	FIPLNTAAYTPNSMS	7.27	TAAYTPNSM	TAAYTPNSM
H2-IAb	408	422	IPLNTAAYTPNSMSN	7.33	TAAYTPNSM	TAAYTPNSM
H2-IAb	411	425	NTAAYTPNSMSNGFP	7.88	AAYTPNSMS	YTPNSMSNG
H2-IAb	406	420	MFIPLNTAAYTPNSM	8.46	LNTAAYTPN	TAAYTPNSM
H2-IAb	412	426	TAAYTPNSMSNGFPQ	9.54	TAAYTPNSM	YTPNSMSNG
H2-IAb	565	579	AEQLRAAFNSANNKV	5.58	LRAAFNSAN	LRAAFNSAN

H2-IAb	566	580	EQLRAAFNSANNKVD	5.61	LRAAFNSAN	LRAAFNSAN
H2-IAb	564	578	IAEQLRAAFNSANNK	6.71	LRAAFNSAN	LRAAFNSAN
H2-IAb	563	577	TIAEQLRAAFNSANN	7.57	LRAAFNSAN	LRAAFNSAN
H2-IAb	567	581	QLRAAFNSANNKVDI	8.04	LRAAFNSAN	LRAAFNSAN
H2-IAb	568	582	LRAAFNSANNKVDIV	8.55	LRAAFNSAN	LRAAFNSAN
H2-IAb	562	576	FTIAEQLRAAFNSAN	8.72	AEQLRAAFN	LRAAFNSAN
H2-IAb	<mark>79</mark>	<mark>93</mark>	ERAVHARGAGAHGVF	5.97	VHARGAGAH	ARGAGAHGV
H2-IAb	80	94	RAVHARGAGAHGVFT	6.23	VHARGAGAH	ARGAGAHGV
H2-IAb	78	92	PERAVHARGAGAHGV	6.31	VHARGAGAH	ARGAGAHGV
H2-IAb	81	95	AVHARGAGAHGVFTS	7.54	ARGAGAHGV	ARGAGAHGV
H2-IAb	82	96	VHARGAGAHGVFTSY	8.73	ARGAGAHGV	ARGAGAHGV
H2-IAb	<mark>99</mark>	<mark>113</mark>	WSNITAASFLNAAGK	6.12	TAASFLNAA	TAASFLNAA
H2-IAb	98	112	NWSNITAASFLNAAG	6.43	TAASFLNAA	TAASFLNAA
H2-IAb	100	114	SNITAASFLNAAGKQ	6.59	TAASFLNAA	TAASFLNAA
H2-IAb	101	115	NITAASFLNAAGKQT	7	TAASFLNAA	TAASFLNAA
H2-IAb	103	117	TAASFLNAAGKQTPV	9.75	TAASFLNAA	TAASFLNAA
H2-IAb	102	116	ITAASFLNAAGKQTP	9.83	TAASFLNAA	TAASFLNAA
H2-IAb	<mark>432</mark>	<mark>446</mark>	HNRGFFTAPGRMVNG	6.39	FTAPGRMVN	FTAPGRMVN
H2-IAb	431	445	THNRGFFTAPGRMVN	6.46	FFTAPGRMV	FTAPGRMVN
H2-IAb	433	447	NRGFFTAPGRMVNGP	7.08	FTAPGRMVN	FTAPGRMVN
H2-IAb	434	448	RGFFTAPGRMVNGPL	8.02	FTAPGRMVN	FTAPGRMVN
H2-IAb	<mark>194</mark>	<mark>208</mark>	AWDFLSQQPSSLHAL	7.81	FLSQQPSSL	FLSQQPSSL
H2-IAb	195	209	WDFLSQQPSSLHALF	8.37	FLSQQPSSL	FLSQQPSSL
H2-IAb	193	207	TAWDFLSQQPSSLHA	9.05	FLSQQPSSL	FLSQQPSSL
H2-IAb	<mark>454</mark>	<mark>468</mark>	PSFNDVWSQPRLFYN	8.75	DVWSQPRLF	DVWSQPRLF
H2-IAb	<mark>254</mark>	<mark>268</mark>	RAGLVWEEAQALGGK	8.78	LVWEEAQAL	LVWEEAQAL
H2-IAb	253	267	GRAGLVWEEAQALGG	8.89	LVWEEAQAL	LVWEEAQAL
H2-IAb	255	269	AGLVWEEAQALGGKN	9.21	LVWEEAQAL	WEEAQALGG
H2-IAb	<mark>341</mark>	<mark>355</mark>	TEQIMFQPGHVVRGI	8.90	IMFQPGHVV	FQPGHVVRG
H2-IAb	340	354	ETEQIMFQPGHVVRG	9.25	IMFQPGHVV	FQPGHVVRG
H2-IAb	<mark>179</mark>	<mark>193</mark>	QPDSEIPQAATAHDT	9.17	EIPQAATAH	SEIPQAATA
H2-IAb	180	194	PDSEIPQAATAHDTA	9.25	EIPQAATAH	SEIPQAATA
H2-IAb	<mark>526</mark>	<mark>540</mark>	PTFYHNKATVPIGTF	11.06	YHNKATVPI	FYHNKATVP

Sequência dos 55 peptídeos com capacidade de se ligar ao MHC-II de camundongos C57BL/6 e sequência das *cores* (núcleos de peptídeos) diferentes encontrados e identificados por cores diferentes. H2-IAb – alelo do MHC-II escolhido; SMM – método de predição SMM-align; NN – método de predição NN-*align*; Consenso – método de predição Consenso, o qual calcula a média dos *ranks* gerados (NN-*align* e SMM-*align*). Início e final – posições do aminoácido que inicia e termina a sequência do peptídeo.

Peptídeo	Sequência
Peptídeo 1	DAYAYGKPVGAVGDG
Peptídeo 2	NNWSNITAASFLNAA
Peptídeo 3	PTFYHNKATVPIGTF
Peptídeo 4	VFTSYNNWSNITAAS
Peptídeo 5	ERAVHARGAGAHGVF
Peptídeo 6	WSNITAASFLNAAGK
Peptídeo 7	HNRGFFTAPGRMVNG
Peptídeo 8	AWDFLSQQPSSLHAL
Peptídeo 9	PSFNDVWSQPRLFYN
Peptídeo 10	RAGLVWEEAQALGGK
Peptídeo 11	TEQIMFQPGHVVRGI
Peptídeo 12	QPDSEIPQAATAHDT

Figura 29 - Sequência de peptídeos escolhidos para síntese e testes in vitro e in vivo.

Figura 30 – Tabela de solubilidade dos peptídeos.

Peptídeos	Sequência	Solubilidade
Peptídeo 1	DAYAYGKPVGAVGDG	PBS 1X
Peptídeo 2	NNWSNITAASFLNAA	20% DMSO + PBS 1X
Peptídeo 3	PTFYHNKATVPIGTF	20% DMSO + PBS 1X
Peptídeo 4	VFTSYNNWSNITAAS	20% DMSO + PBS 1X
Peptídeo 5	ERAVHARGAGAHGVF	PBS 1X
Peptídeo 6	WSNITAASFLNAAGK	20% DMSO + PBS 1X + 10% ácido acético 20%
Peptídeo 7	HNRGFFTAPGRMVNG	PBS 1X
Peptídeo 8	AWDFLSQQPSSLHAL	PBS 1X
Peptídeo 9	PSFNDVWSQPRLFYN	PBS 1X
Peptídeo 10	RAGLVWEEAQALGGK	PBS 1X
Peptídeo 11	TEQIMFQPGHVVRGI	PBS 1X
Peptídeo 12	QPDSEIPQAATAHDT	PBS 1X

Soluções preparadas com de 1 mg de cada peptídeo (concentração final de 1 mg/ml). PBS 1X - Tampão Fosfato salina. DMSO - Dimetilsulfóxido.

Os peptídeos estão em destaque (cores diferentes) na sequência do antígeno M (figura 31).

Figura 31 - Sequência do antígeno M em formato FASTA (GenBank: AAB84182.2) com os peptídeos em desta de cores.

MPSGQKGPLDRRHDTLSDPTDQFLSKFYIDDEQSVLTTDVGGPIEDQHSLKAGNRGPTLLEDFIFRQK IQHFDHERVPERAVHARGAGAHGVFTSYNNWSNITAASFLNAAGKQTPVFVRFSTVAGSRGSVDSA RDIHGFATRLYTDEGNFDIVGNNVPVFFIQDAIQFPDLIHAVKPQPDSEIPQAATAHDTAWDFLSQQPS SLHALFWAMSGHGIPRSMRHVDGWGVHTFRLVTDEGNSTLVKFRWKTLQGRAGLVWEEAQALGG KNPDFHRQDLWDAIESGRYPEWELGFQLVNEADQSKFDFDLLDPTKIIPEELVPFTPIGKMVLNRNPK SYFAETEQIMFQPGHVVRGIDFTDDPLLQGRLYSYLDTQLNRHGGPNFEQLPINRPRIPFHNNNRDGA GQMFIPLNTAAYTPNSMSNGFPQQANRTHNRGFFTAPGRMVNGPLVRELSPSFNDVWSQPRLFYNS LTVFEKQFLVNAMRFENSHVRSETVRKNVIIQLNRVDNDLARRVALAIGVEPPSPDPTFYHNKATVPIG TFGTNLLRLDGLKIALLTRDDGSFTIAEQLRAAFNSANNKVDIVLVGSSLDPQRGVNMTYSGADGSIFD AVIVVGGLLTSASTQYPRGRPLRIITDAYAYGKPVGAVGDGSNEALRDVLMAAGGDASNGLDQPGVY ISNDVSEAYVRSVLDGLTAYRFLNRFPLDRS

Destaque em **alaranjado** - peptídeo 1 (DAYAYGKPVGAVGDG); **verde** – peptídeo 2 (NNWSNITAASFLNAA), peptídeo 4 (VFTSYNNWSNITAAS), peptídeo 5 (ERAVHARGAGAHGVF), peptídeo 6 (WSNITAASFLNAAGK) (parcialmente sobrepostos); **azul claro** – peptídeo 3 (PTFYHNKATVPIGTF); **rosa** – peptídeo 7 (HNRGFFTAPGRMVNG); **vermelho** – peptídeo 8 (AWDFLSQQPSSLHAL) e peptídeo 12 (QPDSEIPQAATAHDT) (parcialmente sobrepostos); **cinza claro** – peptídeo 9 (PSFNDVWSQPRLFYN); **azul escuro** – peptídeo 10 (RAGLVWEEAQALGGK); **amarelo** – peptídeo 11 (TEQIMFQPGHVVRGI).

5.5 Estrutura tridimensional do antígeno M com peptídeos localizados

Figura 32 – Sequência de peptídeos escolhidos a partir da predição *in silico* localizados em estrutura tridimensional da proteína.



(A) e (B) - peptídeos (12 sequências) em destaque nas estruturas. Alaranjado - peptídeo 1; vermelho - peptídeo 2, peptídeo 4, peptídeo 5, peptídeo 6; roxo - peptídeo 3; rosa - peptídeo 7;

azul – peptídeo 8; roxo claro – peptídeo 9; amarelo – peptídeo 10; azul claro – peptídeo 11 e verde – peptídeo 12.



Figura 33 – Sequência de peptídeos testados em ensaios in vivo.

(A) e (B) - peptídeos (6 sequências) em destaque nas estruturas. Alaranjado – peptídeo 1; vermelho – peptídeo 6; azul – peptídeo 8; roxo claro – peptídeo 9; amarelo – peptídeo 10 e verde – peptídeo 12.

5.6 Avaliação da viabilidade de células J774.1A em cultura com 20 µg/ml de cada peptídeos (teste de MTT)

A metodologia utilizada para mensurar a viabilidade das células foi a de MTT, descrita conforme **item 4.10.5**. A porcentagem de viabilidade dos macrófagos J774.1A tratadas com 20 µg/ml de cada peptídeo por período de 24 horas, variou de 68,8% a 93,6%, dependendo do peptídeo testado, como pode se observar na tabela abaixo **(figura 34)**. Em destaque negrito estão os peptídeos testados em ensaios experimentais *in vivo*.

Peptídeo	Concentração	Tempo	Viabilidade
1	20 µg/ml	24 horas	89,8
2	20 µg/ml	24 horas	88,6
3	20 µg/ml	24 horas	85,3
4	20 µg/ml	24 horas	86,9
5	20 µg/ml	24 horas	94,7
6	20 µg/ml	24 horas	68,8
7	20 µg/ml	24 horas	94,2
8	20 µg/ml	24 horas	76,1
9	20 µg/ml	24 horas	70,2
10	20 µg/ml	24 horas	88,1
11	20 µg/ml	24 horas	88,1
12	20 µg/ml	24 horas	93,6
RPMI		24 horas	100,0
DMSO 20%	20 µg/ml	24 horas	87,3

Figura 34 - Tabela de viabilidade celular (%) após 24 horas de exposição ao peptídeo testado.

Tabela demonstrando a média de viabilidade das células avaliadas pelo ensaio de MTT, após 24 horas de cultivo com cada peptídeo na concentração de 20 µg/ml (poços em triplicata). Em destaque negrito os peptídeos escolhidos para os testes animais. **RPMI** (meio de cultura utilizado no experimento e controle de viabilidade das células); **DMSO 20%** (diluente dos peptídeos 2, 3, 4, 6).

5.7 Ensaio de linfoproliferação

Para avaliar se houve linfoproliferação as células dos linfonodos foram marcadas com CFSE (fluorescência no canal do FITC). A proliferação das células pode ser observada pela perda de fluorescência ocorrida pela divisão celular e consequente deslocamento do pico de fluorescência no histograma. A estratégia de análise está apresentada abaixo (figura 35).



Figura 35 – Estratégia de análise do teste de linfoproliferação.

Gráficos demostrando a estratégia de análise da linfoproliferação. **Gráficos:** A [gate de seleção de células por critério de tamanho e complexidade (SSC-A x FSC-A)]; B (gate de seleção de células vivas); C (gate de seleção de células CD3+); D (gates de seleção de células CD4+ e CD8+; E (histograma de proliferação de células CD4+); F (histograma de proliferação de células CD8+).

Os ensaios de linfoproliferação foram realizados com células de linfonodos de grupos de 3 animais imunizados com 20 μ g/ml de uma mistura de 3 peptídeos (**mix**), resultando em 4 grupos de peptídeos (**mix1** – peptídeos 1,2,3; **mix 2** – peptídeos 4,5,7; **mix 3** – peptídeos 10,11,12 e **mix 4** – peptídeos 6,8,9), com adjuvante completo de *Freund* (CFA), no coxim plantar e sacrificados após 7 dias.

Após a retirada dos linfonodos inguinais e poplíteos (descrito no **item 4.9.1**), de cada grupo separadamente, foram processados, marcados (descrito no **item 4.9.2**) e plaqueados com os controles do ensaio (células sem estímulo não marcadas; células sem estímulo marcadas com CFSE; células marcadas e não marcadas estimuladas com Concanavalina A). Os estímulos específicos testados (peptídeos na concentração de 5, 10 e 20 µg/ml) foram realizados separadamente, todos em triplicata para cada peptídeo e para cada concentração. As análises estatísticas foram feitas entre o controle e cada grupo tratado, utilizando t-*test* não pareado, onde *p <0.05, **p <0.005, ***p <0.0005 e ****p <0.0001. Após testar todos os peptídeos nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/ml, não foi observado proliferação de linfócitos CD4+ e CD8+ frente ao estímulo com os peptídeos quando comparado ao controle não estimulado, resultado representado pelos gráficos de barras (figura 36, 37, 38 e 39).





Gráficos de barras referentes ao teste de linfoproliferação de linfócitos de animais vacinados com o **mix 1** (peptídeo 1, 2 e 3) nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/ml estimulados com cada peptídeos separadamente. **ConA**: Concanavalina A. **Gráficos: A** [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos

1, 2, 3 (5 μ g/ml)]; **B** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (5 μ g/ml)]; **C** [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (10 μ g/ml)]; **D** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (10 μ g/ml)]; **E** [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 1, 2, 3 (20 μ g/





Gráficos de barras referentes ao teste de linfoproliferação de linfócitos de animais vacinados com o **mix 2** (peptídeo 4, 5 e 7) estimulados com cada peptídeos separadamente. **ConA**: Concanavalina A. **Gráficos**: **A** [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 4, 5, 7 (5 μg/ml)]; **B** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 4, 5, 7 (5 μg/ml)]; **C** [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 4, 5, 7 (10 μg/ml)]; **C** [análise de CD4+

estimuladas com peptídeos 4, 5, 7 (20 μg/ml)]; **F** [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 4, 5, 7 (20 μg/ml)]; **Sem estímulo**: células que não receberam estímulo com peptídeo.



Figura 38 - Ensaio de linfoproliferação de linfócitos de animais vacinados com o mix 3 (peptídeo 10, peptídeo 11 e peptídeo 12) e estimulados com cada peptídeo específico.

Gráficos de barras referentes ao teste de linfoproliferação de linfócitos de animais vacinados com o **mix 3** (peptídeo 10, 11 e 12) estimulados com cada peptídeos separadamente. **ConA**: Concanavalina A. **Gráficos:** A [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (5 μ g/ml)]; B [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (10 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (10 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (10 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (10 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (10 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (10 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (10 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (10 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12 (20 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 10, 11, 12



Figura 39 - Ensaio de linfoproliferação de linfócitos de animais vacinados com o mix 4 (peptídeo 6, peptídeo 8 e peptídeo 9) e estimulados com cada peptídeo específico.

Gráficos de barras referentes ao teste de linfoproliferação de linfócitos de animais vacinados com o **mix 4** (peptídeo 6, 8 e 9) estimulados com cada peptídeos separadamente. **ConA**: Concanavalina A. **Gráficos:** A [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (5 μ g/ml)]; B [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (5 μ g/ml)]; C [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (10 μ g/ml)]; D [análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (10 μ g/ml)]; E [análise de CD4+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; Sem estímuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de CD8+ estimuladas com peptídeos 6, 8, 9 (20 μ g/ml)]; F (análise de

5.8 Quantificação de citocinas do sobrenadante de cultura (linfoproliferação)

Após o término do tempo de ensaio de linfoproliferação, os sobrenadantes de cultura dos poços foram congelados a -80°C para posterior pesquisa de citocinas. Para a quantificação utilizou-se o sobrenadante dos poços controles (células não estimuladas) e dos poços que receberam estímulo de 20 µg/ml de cada peptídeo.

A quantificação das citocinas está representada pelos gráficos de barras (figuras 40, 41, 42, 43, 44, 45 e 46). As amostras foram analisadas pelo método de "Cytometric Bead Array" (CBA), segundo instruções do fabricante (BD) (descrito no tópico 4.12). Os limites mínimos de detecção para as citocinas nos kits utilizados (Th1; Th2; Th17) foram 0,1 pg/ml para IL-2; 0,03 pg/ml para IL-4; 1,4 pg/ml para IL-6; 0,5 pg/ml para IFN- γ ; 0,9 pg/ml para TNF- α ; 0,8 pg/ml para IL-17A e 16,8 pg/ml para IL-10, os resultados obtidos foram obtidos em pg/ml.

No experimento foi observado o aumento da produção das seguintes citocinas em relação aos grupos não tratados: IFN-γ (figuras 40) nas células estimuladas com os peptídeos 1, 3, 5, 10 e 12; TNF-α (figuras 41) quando o estímulo foi realizado com peptídeos 1 e 3; IL-17A (figuras 42) nas células estimuladas pelos peptídeos 1, 3, 7, 10, 11 e 12; IL-6 nas células estimuladas com o peptídeo 3 (figura 43) e não foi houve diferença significante entre os grupos testados com os peptídeos e os grupos controles (não estimulados) em relação as citocinas IL-10 (figuras 44), IL-2 (figuras 45) e IL-4 (figuras 46).



Figura 40 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de **IFN**-γ, dosados no sobrenadante de cultura do ensaio de linfoproliferação de células de linfonodos estimuladas com peptídeos.

Gráficos de barras que expressam a quantificação de **IFN-**γ, dosados no sobrenadante de cultura da linfoproliferação. **Gráficos**: **A** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 1, 2, 3 e sem estímulo); **B** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 4, 5, 7 e sem estímulo); **C** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 6, 8, 9 e sem estímulo); **D** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 10, 11, 12 e sem estímulo). As análises estatísticas foram feitas entre o controle e cada grupo tratado utilizando t-*test* não pareado (**p <0.005, ****p <0.0001) e teste ANOVA (#p <0.05).



Figura 41 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de **TNF-**α, dosados no sobrenadante de cultura do ensaio de linfoproliferação de células de linfonodos estimuladas com peptídeos.

Gráficos de barras que expressam a quantificação de **TNF-α**, dosados no sobrenadante de cultura da linfoproliferação. **Gráficos**: **A** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 1, 2, 3 e sem estímulo); **B** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 4, 5, 7 e sem estímulo); **C** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 6, 8, 9 e sem estímulo); **D** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 10, 11, 12 e sem estímulo). As análises estatísticas foram feitas entre o controle e cada grupo tratado utilizando t-*test* não pareado (**p <0.005, ****p <0.0001) e teste ANOVA (#p <0.05).



Figura 42 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de **IL-17A**, dosados no sobrenadante de cultura do ensaio de linfoproliferação de células de linfonodos estimuladas com peptídeos.

Gráficos de barras que expressam a quantificação de **IL-17A**, dosados no sobrenadante de cultura da linfoproliferação. **Gráficos**: **A** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 1, 2, 3 e sem estímulo); **B** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 4, 5, 7 e sem estímulo); **C** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 6, 8, 9 e sem estímulo); **D** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 10, 11, 12 e sem estímulo). As análises estatísticas foram feitas entre o controle e cada grupo tratado utilizando t-*test* não pareado (**p <0.005, ****p <0.0001) e teste ANOVA (#p <0.05).



Figura 43 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de **IL-6** dosados no sobrenadante de cultura do ensaio de linfoproliferação de células de linfonodos estimuladas com peptídeos.

Gráficos de barras que expressam a quantificação de **IL-6**, dosados no sobrenadante de cultura da linfoproliferação. **Gráficos**: **A** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 1, 2, 3 e sem estímulo); **B** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 4, 5, 7 e sem estímulo); **C** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 6, 8, 9 e sem estímulo); **D** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 10, 11, 12 e sem estímulo). As análises estatísticas foram feitas entre o controle e cada grupo tratado utilizando t-*test* não pareado (**p <0.005, ****p <0.0001) e teste ANOVA (#p <0.05).



Figura 44 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de IL-10, dosados no sobrenadante de cultura do ensaio de linfoproliferação de células de linfonodos estimuladas com peptídeos.

Gráficos de barras que expressam a de **IL-10**, dosados no sobrenadante de cultura da linfoproliferação. **Gráficos:** A (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 1, 2, 3 e sem estímulo); B (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 4, 5, 7 e sem estímulo); C (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 6, 8, 9 e sem estímulo); D (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 10, 11, 12 e sem estímulo). As análises estatísticas foram feitas entre o controle e cada grupo tratado utilizando t-*test* não pareado (**p <0.005, ****p <0.0001) e teste ANOVA (#p <0.05).



Figura 45 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de **IL-2**, dosados no sobrenadante de cultura do ensaio de linfoproliferação de células de linfonodos estimuladas com peptídeos.

Gráficos de barras que expressam a quantificação de **IL-2**, dosados no sobrenadante de cultura da linfoproliferação. **Gráficos**: **A** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 1, 2, 3 e sem estímulo); **B** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 4, 5, 7 e sem estímulo); **C** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 6, 8, 9 e sem estímulo); **D** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 10, 11, 12 e sem estímulo). As análises estatísticas foram feitas entre o controle e cada grupo tratado utilizando t-*test* não pareado (**p <0.005, ****p <0.0001) e teste ANOVA (#p <0.05).



Figura 46 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de **IL-4**, dosados no sobrenadante de cultura do ensaio de linfoproliferação de células de linfonodos estimuladas com peptídeos.

Gráficos de barras que expressam a quantificação de **IL-4**, dosados no sobrenadante de cultura da linfoproliferação. **Gráficos**: **A** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 1, 2, 3 e sem estímulo); **B** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 4, 5, 7 e sem estímulo); **C** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 6, 8, 9 e sem estímulo); **D** (referente aos sobrenadantes de cultura estimulados com os peptídeos 10, 11, 12 e sem estímulo). As análises estatísticas foram feitas entre o controle e cada grupo tratado utilizando t-*test* não pareado (**p <0.005, ****p <0.0001) e teste ANOVA (#p <0.05).

5.9 Cinética de fagocitose e de apresentação de MHC de classe II com levedura inativada de *H. capsulatum* analisado por citometria de fluxo

Para realizar a análise da fagocitose de leveduras inativadas e apresentação de MHC de classe II foi criado um *gate* de células em um gráfico de tamanho (FSC-A) por granulosidade (SSC-A), seguidor por um *gate* de fenotipagem (células CD11b+); dentro das células CD11b+ foi criado um gráfico CD11b por levedura

(Pacific Blue) escolhendo as células duplo positivo (CD11b+levedura+) e foi criado um histograma para visualizar a expressão de MHC de classe II (Figura 47).

Ao analisar os dados gerados pelos experimentos não foi observado diferença na porcentagem total de fagocitose entre os tempos testados, contudo a porcentagem de células apresentando moléculas de MHC-II foi maior a partir de 4 horas em relação ao tempo zero, assim como a intensidade média de fluorescência (MFI) (partir de 4 horas), que significa maior número de moléculas de MHC-II na superfície das células analisadas **(figura 48)**.





Estratégia de análise para fagocitose de levedura – **(A)** macrófagos diferenciados de medula óssea foram analisados por citometria quanto a tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A); **(B)** Positividade para o marcador CD11b; **(C)** fagocitose das leveduras (macrófagos duplo positivo para CD11b e Pacific Blue); **(D)** expressão de MHC de classe II dos macrófagos CD11b+ Pacific Blue+.



Figura 48 – Cinética de fagocitose de leveduras inativada e apresentação de MHC de classe II por macrófagos diferenciados de medula óssea.

Cinética de fagocitose de leveduras inativadas (*H. capsulatum*) e apresentação de MHC-II por macrófagos diferenciados de medula óssea – (**A**) % de fagocitose em relação ao tempo; (**B**) % de células MHC II+; (**C**) Mediana de intensidade de fluorescência em relação ao tempo. As análises estatísticas foram feitas entre os tempos testados, utilizando t-*test* não pareado, onde *p<0,05, **p<0,05.

5.10 Cinética de fagocitose com levedura inativada de *H. capsulatum* analisado por microscopia de fluorescência

Para comparar o índice fagocítico com a metodologia de citometria de fluxo, foi realizada uma cinética de fagocitose, em tempos de 1, 2, 4, e 6 horas, para determinar o índice.

A cinética fagocitose foi avaliada pelo método de microscopia de fluorescência. Os macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram adicionados em placas de 24 poços em um volume final de 500 μ L, as quais foram ativadas com IFN- γ (156 U/mL) durante 12 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após o tempo de ativação as leveduras, previamente marcadas com FITC

(Sigma) e inativadas por temperatura (60 °C por 60 min), foram adicionadas aos macrófagos, na proporção de 3:1.

Após os tempos de fagocitose, foi realizada a contagem das células fagocíticas e não fagocíticas das triplicatas de cada tempo e calculado o índice fagocítico, com a média dos três poços. Para os tempos de 1, 2, 4 e 6 horas os índices fagocítico foram respectivamente 40,12%, 80,10%, 91,10% e 96,78% (figura 49). As figuras abaixo exemplificam os campos analisados (Figura 50, 51, 52, 53 e 55).

Figura 49 – Cinética de fagocitose de leveduras inativada analisado por microscopia de fluorescência.



Cinética de fagocitose

Gráfico em barras expressa a porcentagem de fagocitose nos tempos de 1, 2, 4, e 6 horas. As análises estatísticas foram feitas entre os controles e cada grupo tratado, utilizando t-*test* não pareado, onde **p <0.005, ***p <0.0005.



Figura 50 – Cultura de macrófagos após 7 dias de diferenciação.

Figura demonstrando cultura de macrófagos diferenciados de medula óssea, incubado a 37°C e 5% CO_2 sem a adição de leveduras, após 6 horas de incubação (controle).



Figura 51 – Cultura de macrófagos após 1 hora de incubação com leveduras (1:3).

Figura demonstrando cultura de macrófagos, incubado a 37°C e 5% CO₂ após 1 hora de incubação com leveduras.



Figura 52 – Cultura de macrófagos após 2 horas de incubação com leveduras (1:3).

Figura demonstrando cultura de macrófagos, incubado a 37°C e 5% CO₂ após 2 horas de incubação com leveduras.



Figura 53 – Cultura de macrófagos após 4 horas de incubação com leveduras (1:3).

Figura demonstrando cultura de macrófagos, incubado a 37°C e 5% CO₂ após 4 horas de incubação com leveduras.



Figura 54 – Cultura de macrófagos após 6 horas de incubação com leveduras (1:3).

Figura demonstrando cultura de macrófagos, incubado a 37°C e 5% CO₂ após 6 horas de incubação com leveduras.



Figura 55 – Cultura de macrófagos após 6 horas de incubação com leveduras (1:3).

Figura demonstrando cultura de macrófagos, incubado a 37°C e 5% CO₂ após 6 horas de incubação com leveduras.

5.11 Ensaios in vivo

Foram realizados ensaios *in vivo* (imunização profilática), dos quais, os dois primeiros tiveram o intuito de testar os peptídeos já sintetizados para verificar a capacidade de gerar proteção em animais frente à infecção intratraqueal com inóculo subletal de *H. capsulatum* (1x10⁶ leveduras). Após os dois primeiros ensaios experimentais de triagem, os peptídeos com melhor desempenho (peptídeos 6, 8 e 9) foram escolhidos para continuidade dos testes em animais.

Os peptídeos 1, 10 e 12 também foram avaliados em ensaios experimentais *in vivo* devido ao perfil de citocinas apresentados nos sobrenadantes de cultura de células de linfonodo estimuladas com eles (estímulo específico com cada peptídeo em animais imunizados com o peptídeo correspondente) (dois ensaios testes).

Todos os ensaios experimentais *in vivo* (profiláticos) testado foram executados conforme **item 4.11.5** e **figura 13** e **14**.

5.11.1 Ensaio *in vivo* 1 (peptídeos 1, 2, 3, 8, e 9)

Neste primeiro experimento os animais foram imunizados por via subcutânea com 20 µg do peptídeo, com adjuvante completo e incompleto de *Freund*. A mistura (40 µl) foi inoculada em cada animal em uma das patas traseiras (coxim plantar) por via subcutânea (primeira dose) com adjuvante completo de *Freund* (CFA) e duas doses posteriores via subcutânea na base da calda, utilizando adjuvante incompleto de *Freund* (IFA). As imunizações tiveram um intervalo de 7 dias entre cada dose; após 7 dias da última imunização as infecções foram realizadas e os sacrifícios executados após o mesmo período. Os camundongos controles foram injetados somente com PBS ou adjuvante sem o peptídeo **(item 4.11.5)** (**figura 13**).

Foram testados 8 grupos de animais (n=5) [grupos testes (todos com CFA/IFA): imunizado com peptídeo 1; imunizado com peptídeo 2; imunizado com peptídeo 3; imunizado com peptídeo 8; imunizado com peptídeo 9 e grupos controles: não tratado; tratado com adjuvante + PBS 1x e sham)].

Neste foi observada a diminuição de CFU nos pulmões dos grupos vacinados com os peptídeos 1, 3, 8 e 9, contudo sem diferença estatística significante (ANOVA e t-*test*) quando comparados com o controle não tratado **(figura 56)**.



Figura 56 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A) e baço (B) dos animais avaliados no ensaio 1.

Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A) e Baço (B) dos animais avaliados no modelo 1. Não tratado (animais apenas infectados); P1 (animais tratados com peptídeo 1 associado com CFA/IFA); P2 (animais tratados com peptídeo 2 associado com CFA/IFA); P3 (animais tratados com peptídeo 3 associado com CFA/IFA); P8 (animais tratados com peptídeo 8 associado com CFA/IFA); P9 (animais tratados com peptídeo 9 associado com CFA/IFA). As análises estatísticas foram feitas entre o controle e cada grupo tratado, utilizando t-test não pareado e ANOVA (p <0.05).

5.11.2 Ensaio in vivo 2 (peptídeos 4, 5, 6, 7, 8 e 9)

O experimento realizado conforme descrito no item 4.11.5 e figura 13.

Foram testados 9 grupos de animais (n=5) [grupos testes (todos com CFA/IFA): imunizado com peptídeo 4; imunizado com peptídeo 5; imunizado com peptídeo 6; imunizado com peptídeo 7; imunizado com peptídeo 8; imunizado com peptídeo 9 e grupos controles: não tratado; tratado com adjuvante + PBS 1x e sham].

Neste ensaio foi observada a diminuição da carga fúngica nos pulmões de todos os grupos tratados com os peptídeos em relação ao grupo não tratado (figura 57), com exceção do peptídeo 7.



Figura 57 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (**A**) e baço (**B**) dos animais avaliados no ensaio 2.

Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (**A**) e Baço (**B**) dos animais avaliados no modelo 2. **Não tratado** (animais apenas infectados); **P4** (animais tratados com com o peptídeo 4 associado com CFA/IFA); **P5** (animais tratados com peptídeo 5 associado com CFA/IFA); **P6** (animais tratados com peptídeo 6 associado com CFA/IFA); **P7** (animais tratados com peptídeo 7 associado com CFA/IFA); **P8** (animais tratados com peptídeo 8 associado com CFA/IFA); **P9** (animais tratados com peptídeo 9 associado com CFA/IFA). As análises estatísticas foram feitas entre o controle e cada grupo tratado, utilizando t-*test* não pareado (*p <0.05, **p <0.005) e ANOVA (#p < 0.05).

5.11.3 Ensaio in vivo 3 (peptídeos 6, 8 e 9)

Experimento realizado conforme descrito no item 4.11.5 e figura 13.

Foram testados 6 grupos de animais (n=6) [grupos testes (todos com CFA/IFA): imunizado com peptídeo 6; imunizado com peptídeo 8; imunizado com peptídeo 9 e grupos controles: não tratado; tratado com adjuvante + PBS 1x e sham)].

No ensaio foi observado a diminuição da carga fúngica no pulmão apenas dos animais tratados com o peptídeo 6 quando comparados aos grupos controles (grupo não tratado e grupo tratado com adjuvante) (figura 58).



Figura 58 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), baço (B) e fígado (C) dos animais avaliados no ensaio 3.

Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), Baço (B) e Fígado (C) dos animais avaliados no modelo 3. Adjuvante [Adjuvante Completo de Freund (primeira imunização) e Adjuvante Incompleto de *Freund* (segunda e terceira imunização)]; Não tratado (animais apenas infectados); P6 (animais tratados com peptídeo 6 associado com CFA/IFA); P8 (animais tratados com peptídeo 8 associado com CFA/IFA); P9 (animais tratados com peptídeo 9 associado com CFA/IFA). As análises estatísticas foram feitas entre o controle não tratado e cada grupo teste, utilizando t-*test* não pareado (*p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005 e ****p < 0.0001) e e ANOVA (#p < 0.05) e entre os grupos testes e o controle tratado com adjuvante, utilizando t-*test* (+p < 0.05); ANOVA (+p < 0.05).

5.11.4 Ensaio in vivo 4 (peptídeos 6, 8 e 9)

Experimento realizado conforme descrito no item 4.11.5 e figura 13.

Foram testados 6 grupos de animais (n=6) [grupos testes (todos com CFA/IFA): imunizado com peptídeo 6; imunizado com peptídeo 8; imunizado com peptídeo 9 e grupos controles: não tratado; tratado com adjuvante + PBS 1x e sham)].

No ensaio foi observado a diminuição da carga fúngica no pulmão dos animais tratados com o peptídeo 6, peptídeo 8 e peptídeo 9 quando comparados aos grupos controles (grupo não tratado e grupo tratado com adjuvante) e diminuição de UFC nos baços de animais tratados com peptídeo 6 e peptídeo 9 quando comparados ao grupo não tratado **(figura 59)**.

Figura 59 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), baço (B) e fígado (C) dos animais avaliados no ensaio 4.



Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), Baço (B) e Fígado (C) dos animais avaliados no modelo 4. Adjuvante [Adjuvante Completo de Freund (primeira imunização) e Adjuvante Incompleto de *Freund* (segunda e terceira imunização)]; **Não tratado** (animais apenas infectados); **P6** (animais tratados com peptídeo 6 associado com CFA/IFA); **P8** (animais tratados com peptídeo 8 associado com CFA/IFA); **P9** (animais tratados com peptídeo 9 associado com CFA/IFA). As análises estatísticas foram feitas entre o controle não tratado e cada grupo teste, utilizando t-*test* não pareado (*p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005 e ****p < 0.0001) e e ANOVA (#p < 0.05) e entre os grupos testes e o controle tratado com adjuvante, utilizando t-*test* (+p < 0,05); ANOVA (+p < 0.05).

5.11.5 Ensaio in vivo 5 (Peptídeo 6 + adjuvante MPLA)

Experimento realizado conforme descrito no item 4.11.5 e figura 13.

Foram testados 4 grupos de animais (n=6) (**grupos teste**: imunizado com peptídeo 6 associado com MPLA e **grupos controles**: não tratado; tratado com adjuvante + PBS 1x e sham).

Não foi observado diferença de UFC nos pulmões do grupo tratado quando comparado com grupos controles (figura 60).

Figura 60 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), baço (B) e fígado (C) dos animais avaliados no ensaio 5.



Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), Baço (B) e Fígado (C) dos animais avaliados no modelo 5. MPLA+PBS [Adjuvante MPLA + PBS 1x)]; Não tratado (animais apenas infectados); P6+MPLA (animais tratados com peptídeo 6 associado com MPLA). As análises estatísticas foram feitas entre os controles e cada grupo tratado, utilizando t-*test* não pareado (*p <0.05, **p <0.005, ***p <0.0005 e *****p <0.0001) e ANOVA (#p < 0.05).

5.11.6 Ensaio in vivo 6 (peptídeo 6 + Adjuvante MPLA)

Experimento foi realizado conforme o descrito no item 4.11.5 e figura 13.

Foram testados quatro grupos de animais (n=6) (**grupos teste**: imunizado com peptídeo 6 associado com MPLA e **grupos controles**: não tratado; tratado com adjuvante + PBS 1x e sham).

Não foi observado diferença de UFC nos pulmões do grupo tratado quando comparado com grupos controle tratado com adjuvante (figura 61).

Figura 61 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), baço (B) e fígado (C) dos animais avaliados no ensaio 6.



Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), Baço (B) e Fígado (C) dos animais avaliados no modelo 6. MPLA+PBS [Adjuvante MPLA + PBS 1x)]; Não tratado (animais apenas infectados); P6+MPLA (animais tratados com peptídeo 6 associado com MPLA). As análises estatísticas foram feitas entre os controles e cada grupo tratado, utilizando t-*test* não pareado (*p <0.05, **p <0.005, ***p <0.0005 e ****p <0.0001) e ANOVA (#p < 0.05).

5.11.7 Ensaio in vivo 7 (peptídeos 1, 10 e 12)

Experimento foi realizado conforme o descrito no item 4.11.5 e figura 13.

Foram testados 6 grupos de animais (n=6) [grupos testes (todos com CFA/IFA): imunizado com peptídeo 1; imunizado com peptídeo 10; imunizado com

peptídeo 12 e grupos controles: não tratado; tratado com adjuvante + PBS 1x e sham)].

No ensaio foi observado a diminuição da carga fúngica no pulmão dos animais tratados com o peptídeo 1, peptídeo 10 e peptídeo 12 quando comparados aos grupos controles (grupo não tratado e grupo tratado com adjuvante) e diminuição de UFC nos fígados de animais dos grupos testes quando comparados ao grupo não tratado (figura 62).

Figura 62 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), baço (B) e fígado (C) dos animais avaliados no ensaio 7.



Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), Baço (B) e Fígado (C) dos animais avaliados no modelo 4. Adjuvante [Adjuvante Completo de Freund (primeira imunização) e Adjuvante Incompleto de *Freund* (segunda e terceira imunização)]; Não tratado (animais apenas infectados); P1 (animais tratados com peptídeo 1); P10 (animais tratados com peptídeo 10); P12 (animais tratados com peptídeo 12). As análises estatísticas foram feitas entre o controle não tratado e cada grupo teste, utilizando t-*test* não pareado (*p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005 e ****p < 0.0001) e e ANOVA (#p < 0.05) e entre os grupos testes e o controle tratado com adjuvante, utilizando t-*test* (+p < 0.05); ANOVA (+p < 0.05).
5.11.8 Ensaio *in vivo* 8 (peptídeos 1, 10 e 12)

Experimento foi realizado conforme o descrito no item 4.11.5 e figura 13.

Foram testados 6 grupos de animais (n=6) [grupos testes (todos com CFA/IFA): imunizado com peptídeo 1; imunizado com peptídeo 10; imunizado com peptídeo 12 e grupos controles: não tratado; tratado com adjuvante + PBS 1x e sham)].

No ensaio foi observado a diminuição da carga fúngica no pulmão dos animais tratados com o peptídeo 10 e peptídeo 12 quando comparados grupos controles (figura 63).



Figura 63 - Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), baço (B) e fígado (C) dos animais avaliados no ensaio 8.

Gráficos de barras que expressam a carga fúngica em pulmão (A), Baço (B) e Fígado (C) dos animais avaliados no modelo 4. Adjuvante [Adjuvante Completo de Freund (primeira imunização) e Adjuvante Incompleto de *Freund* (segunda e terceira imunização)]; Não tratado (animais apenas infectados); P1 (animais tratados com peptídeo 6); P10 (animais tratados com peptídeo 8); P12 (animais tratados com peptídeo 9). As análises estatísticas foram feitas entre o controle não tratado e cada grupo teste,

utilizando t-*test* não pareado (*p < 0.05, **p < 0.005) e e ANOVA (#p < 0.05) e entre os grupos testes e o controle tratado com adjuvante, utilizando t-*test* (+p < 0,05); ANOVA (+p < 0.05).

5.11.9 Quantificação de citocinas do macerado de pulmões

A quantificação das citocinas está representada pelos gráficos de barras (figuras 64 e 65). As amostras foram analisadas pelo método de CBA, segundo instruções do fabricante (BD) (descrito no item 4.12). Os limites mínimos de detecção para as citocinas nos kits utilizados (Th1; Th2; Th17) foram 0,1 pg/ml para IL-2; 0,03 pg/ml para IL-4; 1,4 pg/ml para IL-6; 0,5 pg/ml para IFN- γ ; 0,9 pg/ml para TNF- α ; 0,8 pg/ml para IL-17A e 16,8 pg/ml para IL-10, os resultados obtidos foram obtidos em pg/ml.

Neste experimento foram avaliados os macerados de pulmão de animais tratados com peptídeos 6, 8 e 9 (resultados representativos de três experimentos com sacrifício após 7 dias de infecção) e os grupos controles (não tratado, tratado com adjuvante + PBS 1x) (resultados representativos de três experimentos com sacrifício após 7 dias de infecção e um experimento com sacrifício após 48 horas de infecção). Após analisarmos a quantificação de citocinas, não foi observada diferença estatística entre os grupos tratados com peptídeos e os controles (grupo não tratado e tratado com adjuvante) no momento do sacrifício (após 7 dias) (figura 64). Nos grupos sacrificados após 48 horas de infecção houve aumento de IFN-γ no grupo tratado com peptídeo 8 e IL-17A nos grupos tratados com peptídeo 6 e 9 quando comparados ao grupo controle não tratado, entretanto sem diferença estatística em relação ao grupo tratado com adjuvante (figura 65).

Nos ensaios experimentais onde os peptídeos 1, 10 e 12 foram testados, foi observado aumento de IFN- γ e IL-17 no grupo tratado com o peptídeo 12, TNF- α e IL-6 nos grupos tratados com peptídeos 10 e 12, quando comparados aos grupos controles (não tratado e tratado com adjuvante) **(figura 66)**.



Figura 64 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de citocinas no macerado de pulmão de animais sacrificados após 7 dias de infecção (peptídeos 6, 8 e 9).

Gráficos de barras que expressam a quantificação de citocinas no macerado de pulmão de animais sacrificados após **7 dias** de infecção. Gráficos: **A** (concentração de IFN- γ); **B** (concentração de TNF- α); **C** (concentração de IL-17A); **D** (concentração de IL-2); **E** (concentração de IL-6); **F** (concentração de IL-10); **G** (concentração de IL-4); **Não tratado** (animais apenas infectados); **P6** (animais tratados com peptídeo 6); **P8** (animais tratados com peptídeo 8); **P9** (animais tratados com peptídeo 9). As

análises estatísticas foram realizadas entre os controles e cada grupo tratado, utilizando t-*test* não pareado (*p <0.05) e ANOVA (#p < 0.05).

Figura 65 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de citocinas no macerado de pulmão de animais sacrificados após 48 horas de infecção (peptídeos 6, 8 e 9).



Gráficos de barras que expressam a quantificação de citocinas no macerado de pulmão de animais sacrificados após **48 horas** de infecção. Gráficos: **A** (concentração de IFN- γ); **B** (concentração de TNF- α); **C** (concentração de IL-17A); **D** (concentração de IL-2); **E** (concentração de IL-6); **F**

(concentração de IL-10); **G** (concentração de IL-4); **Não tratado** (animais apenas infectados); **P6** (animais tratados com peptídeo 6); **P8** (animais tratados com peptídeo 8); **P9** (animais tratados com peptídeo 9). As análises estatísticas foram realizadas entre os controles e cada grupo tratado, utilizando t-*test* não pareado (*p <0.05) e ANOVA (#p < 0.05).

Figura 66 - Gráficos de barras que expressam a quantificação de citocinas no macerado de pulmão de animais sacrificados após 7 dias de infecção (peptídeos 1, 10 e 12).



Gráficos de barras que expressam a quantificação de citocinas no macerado de pulmão de animais sacrificados após **7 dias** de infecção. Gráficos: **A** (concentração de IFN- γ); **B** (concentração de TNF- α); **C** (concentração de IL-17A); **D** (concentração de IL-2); **E** (concentração de IL-6); **F** (concentração de IL-10); **G** (concentração de IL-4); **Não tratado** (animais apenas infectados); **P1** (animais tratados com peptídeo 1); **P10** (animais tratados com peptídeo 10); **P12** (animais tratados com peptídeo 12). As análises estatísticas foram feitas entre o controle não tratado e cada grupo teste, utilizando t-*test* não pareado (*p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.005 e ****p < 0.0001) e e ANOVA (#p < 0.05) e entre os grupos testes e o controle tratado com adjuvante, utilizando t-*test* (+p < 0.05); ANOVA (+p < 0.05).

5.12 Identificação dos peptídeos acoplados a MHC de classe II por espectrometria de massa

Foram identificados por espectrometria de massa 9 peptídeos purificados de MHC de classe II de macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6, após fagocitose (4 horas) de leveduras de *H. capsulatum* (G217B) inativadas por calor. As sequências dos peptídeos e a identificação das proteínas, das quais os peptídeos foram provenientes, estão na tabela abaixo **(figura 67)**.

Sequência peptídeo	Proteína	Número de Acesso
DPLQLLDELIASGR	C0NUX5_AJECG Uncharacterized protein - Ajellomyces capsulatus (strain G186AR/ H82)	C0NUX5
LLVSLGAINENDSRL R	A6R6S3_AJECN Uncharacterized protein - Ajellomyces capsulatus (strain NAm1 / WU24)	A6R6S3
NLEMEQTEIATESQR	C6H592_AJECH Lipase/serine esterase - Ajellomyces capsulatus (strain H143)	C6H592
LLSRIKDGLDPLR	A6RFP0_AJECN Uncharacterized protein - Ajellomyces capsulatus (strain NAm1 / WU24)	A6RFP0
QEEMRNRSATADGS QR	A6RG97_AJECN Uncharacterized protein - Ajellomyces capsulatus (strain NAm1 / WU24)	A6RG97
NSSSNIVQFQYGDD K	C6HPI8_AJECH DNA-directed RNA polymerase subunit - Ajellomyces capsulatus (strain H143)	C6HPI8
MASQLSMLSSRMKS AAK	C0NUA6_AJECG L-isoaspartate O- methyltransferase - Ajellomyces capsulatus (strain G186AR/ H82)	C0NUA6
MSGITVATLPRMSR	F0UR97_AJEC8 Uncharacterized protein - Ajellomyces capsulatus (strain H88)	F0UR97
MAPTASSSNQATKK	F0UBQ8_AJEC8 C2H2 finger domain-containing protein - Ajellomyces capsulatus (strain H88)	F0UBQ8

Figura 67 – Sequência de peptídeos purificados de macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6, após fagocitose de leveduras inativadas de *H. capsulatum* (G217-B) inativadas por calor, identificados por espectrometria de massa.

Tabela com sequência de peptídeos purificados de macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6, após fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* (G217-B) inativadas por

calor, identificados por espectrometria de massa e número de acesso (banco de dados do UniProt) das sequências de proteínas relacionadas a esses peptídeos.

Com a identificação das proteínas, das quais os peptídeos (identificados por espectrometria de massa) foram provenientes, foi realizada predição *in silico* pelo método Consenso (IEDB) para verificar se esses peptídeos apresentariam *rank* (%) abaixo de 10, ou seja, capacidade de ligar-se ao MHC de classe II (bons ligantes), desta maneira, comparando a metodologia computacional (parâmetros de ligação definidos por algoritmos) e a metodologia *in vitro* (peptídeos isolados diretamente do MHC de classe II) (figura 68). Devido à limitação dos programas de predição, os quais geram sequências de peptídeos de 15 aminoácidos apenas, foi necessário adicionar (destaque em vermelho) ou retirar (destaque em negrito) aminoácidos (respeitando a sequência da proteína) para ser possível a comparação dos dois métodos de predição, visto que a identificação *in vitro* pode gerar peptídeos ligantes ao MHC de classe II com tamanhos variáveis (13 a 25 aminoácidos).

Foi observado que apenas uma sequência (MSGITVATLPRMSRE) identificada por espectrometria de massa apresentou *rank* (%) abaixo de 10.

Proteína	Alelo	Peptídeo	Consenso <i>rank</i> (%)	SMM <i>rank</i> (%)	NN <i>rank</i> (%)
C0NUX5_AJECG Uncharacterized protein	H2-IAb	DPLQLLDELIASGRA	75.94	70.21	81.66
A6R6S3_AJECN Uncharacterized protein	H2-IAb	LLVSLGAINENDSRLR	47.91	46.89	48.92
C6H592_AJECH Lipase/serine esterase	H2-IAb	NLEMEQTEIATESQR	63.60	57.69	69.52
A6RFP0_AJECN Uncharacterized protein	H2-IAb	LLSRIKDGLDPLR <mark>NK</mark>	55.30	46.82	63.77
A6RG97_AJECN Uncharacterized protein	H2-lab	QEEMRNRSATADGSQ R	33.33	31.30	35.36
C6HPI8_AJECH DNA-directed RNA polymerase subunit	H2-IAb	NSSSNIVQFQYGDDK	86.03	75.97	96.09
C0NUA6_AJECG L-isoaspartate O-methyltransferase	H2-IAb	MASQLSMLSSRMKSA A K	32.25	37.45	27.04
F0UR97_AJEC8 Uncharacterized protein	H2-IAb	MSGITVATLPRMSRE	9.60	14.23	4.96
F0UBQ8_AJEC8 C2H2 finger domain-containing protein	H2-IAb	MAPTASSSNQATKK <mark>S</mark>	15.50	11.73	19.26

Figura 68 – Avaliação das sequências dos peptídeos identificados por espectrometria de massa em relação à capacidade de ligação a MHC de classe II (camundongos C57BL/6) por predição *in silico* (IEDB, método Consenso).

Tabela demostrando resultado [rank (%)] da predição *in silico* pelo método Consenso. A predição realizada no banco de dados do IEDB resulta em sequências de 15 aminoácidos por peptídeo, desta

maneira peptídeos, em destaque [vermelho (aminoácidos adicionados) e negrito (aminoácidos excluídos)], foram adicionados ou retirados para ser possível a comparação com as sequências identificadas por espectrometria de massa. **Proteína** – código de acesso a sequência FASTA no UniProt e nome de depósito da proteína; **Alelo** – predição alelo específica para MHC-II de camundongos C57BL/6; **peptídeo** – sequência do peptídeo avaliada pela predição; **Consenso rank** (%) – resultado da predição pelo método Consenso; **SMM** *rank* (%) – resultado da predição pelo método NN-*align*.

Abaixo estão apresentados e localizados os peptídeos (destaque em cinza) nas sequências das proteínas correspondentes (formato FASTA); dados obtidos do banco de dados do UniProt pelo código de acesso das proteínas gerado pela identificação e sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massa.

Acesso - C0NUX5 (sequência do peptídeo identificado – DPLQLLDELIASGR) UniProtKB C0NUX5 (C0NUX5_AJECG) Nome de submissão: Uncharacterized protein Gene: HCBG 06739

Organismo: Ajellomyces capsulatus (strain G186AR / H82 / ATCC MYA-2454 / RMSCC 2432) (Darling's disease fungus) (Histoplasma capsulatum)

>tr|C0NUX5|C0NUX5_AJECG Uncharacterized protein OS=Ajellomyces capsulatus (strain G186AR / H82 / ATCC MYA-2454 / RMSCC 2432) OX=447093 GN=HCBG_06739 PE=4 SV=1

MEATRVHCLRSLSKQCPQFGRSTQESRRLLSFLHGHESSKPLARSTQSSTPNRHPNNPDNRLSASS KDTDKHLSSILDHPLFRIVPAKPLPQRDHNGNQAQNVPNAGKKLAK**DPLQLLDELIASGR**ADHNTLYR CLREYGPPSIPSKLPNVEASSVGSRIVAWYSAADFESRMLFFGSRPTMGIAMPYMVVDRLQNTVIKW VKMVYTAPSSDGLANSLLPTQRLCLINLLREFVTAEIKYGHGIQSALRYYIRVCEILPPGDKFSGSKQ

Acesso - A6R6S3 (sequência do peptídeo identificado – LLVSLGAINENDSRLR) UniProtKB - A6R6S3 (A6R6S3_AJECN)

Nome de submissão: Uncharacterized protein Gene: HCAG_05331 Organismo: Ajellomyces capsulatus (strain NAm1 / WU24) (Darling's disease fungus) (Histoplasma capsulatum)

>tr|A6R6S3|A6R6S3_AJECN Uncharacterized protein OS=Ajellomyces capsulatus (strain NAm1 / WU24) OX=339724 GN=HCAG_05331 PE=4 SV=1

MKYGDIKFCEIRADMCIEGYPDRNTPTILAYKDGDIKRQLVTLKELRGPKTTLDDLEK**LLVSLGAINEND** SRLRQGPTPKPVDSDDEYLDDWD Acesso - C6H592 (sequência do peptídeo identificado – NLEMEQTEIATESQR) UniProtKB - C6H592 (C6H592_AJECH) Nome de submissão: Lipase/serine esterase Gene: HCDG_00413 Organismo: Ajellomyces capsulatus (strain H143) (Darling's disease fungus) (Histoplasma capsulatum)

>tr|C6H592|C6H592_AJECH Lipase/serine esterase OS=Ajellomyces capsulatus (strain H143) OX=544712 GN=HCDG_00413 PE=4 SV=1

MSTLSQGLVDIEHVSHNTSTNSLTYIPTGQEKHGSGKIQAVIQEDRIVAVVPCPEDSRLTSYIWLEASD PPPPAGLPDKQKQPEYPYVLKRFEAAGECPASLREFIGSPQSHLYPAKLSASSSTNPADRNNLHIIIST LSGTHQATLFYTTLLKPLLATLHLHEHQDYCTHVTSSADTITHLTQTIFRPRAQRGIAQTIILLAGDGGLV EIIQGLTAVRAADDFVSPVVALVPMGTGNATAHSAGIVSGRDATMGLRGLVSGVAKRLPMFAARTSR GAEPLDGRLWFVHFGPLKSEAVMEVMQLAYDEGRHVVDMRDVVGYEEVEAVRIEFCEGETEERWR RICIDGMILVVQDGQQLSQGNLAGETIGTEIRSGGRDRFLSGQQLQRKKQWAESGERKTVCKGGETA EKRRRRSDCAYLTTTLRPTPSFSNARPDKCTPAQPSSLKRSVRFAKLSMLVTPRLYRLAQIPDNGSRA PFSYHPSFNTLTGWDVEPAEYERAAEMLLVHQVGSVRVGEVVRFTLTYTPFADRILPTPTELFVKVRN TSAIPLRAAYLHGPYTLYTSCYPASFDPNRKYEDHETRGLPQFEPNLKAGGAFDSVIPVPEDVQSSTS AADQQSITWIIEIASQVIFSTTAAVNFEVLVGRDLKSLELGIGNSTSLPVPGHVRELARRNSKSKHKNPP GPMKGVYSTAVKLVIDDTASLWSTPRFPSWSEKEDLR**NLEMEQTEIATESQR**DSEANSAGEAENRKK RRKVHFVVLTHGLHSNIGADMLYLKESIDAASRKAREDARNERNKAKNSHPSQPAVPTQDVSDTPSV DRQHTASEEDDDDDEHVIVRGFPGNVVRTERGIQYLGKRLAKYVLLMTYPDQPYLPLKESRSKFRAF AGNKDSTGSSGRASHSGSAIYRHEPKKSDYGYQITSISFIGHSLGGLVQTYAIAYIQKHSPEFFDCIKPI NFVALASPFLGLSNENPIYKFRNRTVYSNVVNDGIVPLRTSCLLFLDWRGLDRVEKARRESGWVGTM AEWGWAEITGANVNTNSIRSTKRPTNSVPTNSANDDTRTIRRSQTVGNNELAETPWTDGPSRSPCAE PARGDSFHQEDGHHAPPKTTILEAAGDVLKPPLPSTEYILDPSTRARTIFHDRVYHPSDIPPPPKKNR SFFPTSSTSSLPSPTETAKSIDNQSNNSLIQTTSDSVLGTTSGMKVEEKIARAYHRDLSWRKVLVRLEP DAHNNIIVRRMFANAYGWPVVKHLVDTHFANTTAAKTADEFESGAERAMPTSRSPSESGKEVIGQVD PPGKSSTLTIQQPKPENQHPPESSETMDALRALLSPATPNRILPYAKTDITNSIDPHQPTMSVSRMSSS QSKTSHADSSRWTDRYFDDEDGEGYDSQDEAHFAGSGIPEDCEVYRTAASARGVGNGRIGG

Acesso - A6RFP0 (sequência do peptídeo identificado – LLSRIKDGLDPLR) UniProtKB - A6RFP0 (A6RFP0_AJECN) Nome de submissão: Uncharacterized protein

Gene: HCAG_08456

Organismo: Ajellomyces capsulatus (strain NAm1 / WU24) (Darling's disease fungus) (Histoplasma capsulatum)

>tr|A6RFP0|A6RFP0_AJECN Uncharacterized protein OS=Ajellomyces capsulatus (strain NAm1 / WU24) OX=339724 GN=HCAG_08456 PE=3 SV=1

MGLSHVKLPGRLSRSSATSQRESPAMPPSGIQTPHKDDIEETWAYLEKGVERVMTQLEGGIDMLTYM GVYTAVHDFCTSQKAISSPGSPASHGSHRGAHLLGEELYNLLGIYLSRHLNDVYETSLNHSDEALLAF YIREWTRYTTAAQYINHLFKYLNRHWVKREVDEGKKDIYDVYTLHLVKWKEDFFKKVQKSVMDAVLKL VEKQRNGETIEQSQIKNIVDSFVSLGLDENDSTKSTLVVYQFYFEKPFIEATKVYYENESKRFVAENSV VEYMKKAESRIDEERARIDLYLHPDITKNLTETCLEVLVASHSPLLRDEFQALLDTERQEDLARMYRLL SRIKDGLDPLRNKFETHVRKAGLAAVEKVVPNGDAVEPKVYIDALLQIMTVFKYIEDKDVFQKFYSRML AKRLVHVSSVSDDAETSMISKLKEACGFEYTNKLQRMFQDIQISKDLNASYRDWQEKVLDDEDRKKLL DPHFQILGTGFWPLTPPTTQFIPPQEIVKTTERFKNFYFDKHSGRKLTWLWNLCKGEIRANYIKNTKVP YTFQVSTYQMGILLLFNESDTLSLSDIEKGTALAPEVTEPNLGILVKAKVVIPSPEDGKPCPGTSYALNY NFKAKKIKINLNISVKSEQKHETDDTHKTIDEDRKLLLQSAIVRIMKSRKKLKHVQLVQEVIQQVKARFPP KVPDIKKNIEALMEKEYIERLDGDDLAYIA Acesso - A6RG97 (sequência do peptídeo identificado – QEEMRNRSATADGSQR) UniProtKB - A6RG97 (A6RG97_AJECN) Nome de submissão: Uncharacterized protein Gene: HCAG_08663 Organismo: Ajellomyces capsulatus (strain NAm1 / WU24) (Darling's disease fungus) (Histoplasma capsulatum)

>tr|A6RG97|A6RG97_AJECN Uncharacterized protein OS=Ajellomyces capsulatus (strain NAm1 / WU24) OX=339724 GN=HCAG_08663 PE=4 SV=1

MHRMKSLVHREPREPKKSESSIERERSTRKSNAVLAGQGSHLADLRSDWESEKVQPRYPDEEAAFS SRSSSPELRHRRIDSGVAGLELSQQKNKESANGRPTGSTATASTREQNVPMRDDNQRNQGRFPVS MRSGDVSSGQKQQSAQRKVGEAAAFAAATAYFHRRPNEPVEVMRSGEAIHRLHKSKEPPPMSAWG KARECRPLAHDPLAGVPRRDSSTLGSFESPDPTPSTEQKSAPQRAAQTEPAAADTALIEESGFRPEG YSGTMQEPDRREYEGEYENPSGPDAPMDEKGYDKPVSGGPGKALETPMQEKQNEGLSNDGQWLR QEDPTVQSPRLTHVTTSEHEPEEIAAREEATRRAVVEEAAARRKAAEEVAAREAVSREAATKENIARE TAQGEVSAMEDAIREAYANENVARESASAEISMLEEETWQAMARETAAREAAIASIQSAEIDTREAIER EALMKQKAAEEIATREAVTSEAVASEVAAREAANRETAIKQANTREVAAEEVAAREALRAGGFDEAVA RDAALREVAAEETTAMQAEGRASMPQEPGSRGIHVYETGPGPVTTGGAFAEEPRKEQIMTCGAAPC AQPADIGVSSAPTAQPVTQTSHAEQDPGAHAQEQRQDGVEPEGRGSFKEEKELRKQISKEEKAILKE RNKMEKKLDRERAKEKKTHQAQLKKEERANRQRQKLEKKQEKEAKR**QEEMRNRSATADGSQR**EDR LLAKIRRLWRSEKQ

Acesso - C6HPI8 (sequência do peptídeo identificado – NSSSNIVQFQYGDDK) UniProtKB - C6HPI8 (C6HPI8_AJECH)

Nome de submissão: DNA-directed RNA polymerase subunit Gene: HCDG_08119 Organismo: Ajellomyces capsulatus (strain H143) (Darling's disease fungus) (Histoplasma capsulatum)

>tr|C6HPI8|C6HPI8_AJECH DNA-directed RNA polymerase subunit OS=Ajellomyces capsulatus (strain H143) OX=544712 GN=HCDG_08119 PE=3 SV=1

MQSAEAVQIDLGKAQVVDRVPKVIKEIKFGVLSTQDIVSQAVVEVSDRKLFDLDNDRAVAPHGPLDGR MGISSKSGTCDTCGGALQECSHILLPETERRAFLRELRRPGIDNLRRMQIAKKINERCRKTRTCYKCN AVNGVVKKAGTSALKITHEKFRAFNASTSVKKIPPPSKVVFDKSFEEAKKSNPDIDKHFKKAHDDLHPL RVLRLFRSVSNEDCELLSLNPEEARPEVFLWQYVPAPPVCIRPSVGQEAASTEDDLTAKLGDIIQSNIN LKNALIKGAPVQTIIECWDYMQLQLAVYINSDVPGLQKADFGKPIRGFCQRLKGKQGRFRGNLSGKRV DFSGRTVISPDPNLRVNEVAVPQLVAMNMTYPEQVTRYNKEKLRQRIRNGTKTWPGANYVLKKSQNF KMNLKFGNPNLVANELEEGDIVERHIEDGDIVLFNRQPSLHKLSILSHFAKVRPHRTFRLNECVCNPYN ADFDGDEMNLHVPQTEEARAEAMELMGVKNNLATPKNGEPIISAIQDFITAAYLLSSKDVFYDRKTFTH ICLYMLESDTLFDLPPPSVLKPQILWTGKQVFNVLMRPNKQSPVLINLDAACREFKAPKGTPRDLDAN DGWLCIRNSEIMCGVMDKSTIGSGKKDSVFYVMLRDFGPDVASEGMNRLSRLSARWLTNLGFSIGIT DVYPGEKLLEEKHHIVEHAYAQCDEVIQLFKNGKLEKAPGCDEQMTMENAISGLLSKVRQQAGEICIA ELSRWNSPLIMATSGLMKSLEDLSTRYDDTVR**NSSSNIVQFQYGDDK**LDPVDMEGRAKPVHFDRTFT HAEVTTFDNSDKGLLPDEIITLCQNLLAPERAKLARFDLLGKKLEYNDRSDHGIDQLESARDFLQSIEDY VCAKAEKLRSIDSGTKQRGKGVIHTAKVSTRALTSFITACLTKYKRAQVEPGHAVGAVGAQSIGEPGT QMTLKTFHFAGVAGMSITQGVPRIKEIINASKEISTPVITCELVNKQDLRAAQIVKGRVEKTFVRDIIYYIE EDWTGNEAYINIKIDFSTIQNLQLELTLQDILMAIKKHKRFKSADLKFRSFGSHIHIFVDQQTTRTALSKT EEAATGADPYIRLKHLKRLIPNIQVIGHPQCARAIIRTDETNTTNTLLVEGYGLRDCMTTDGINGHHTRT NNIMETRAVLGIEAARTTIVEEIGEVMKDMAIDPRHMQLLADVMTYKGEVLGITRFGLAKMRDSVLQLA SFEKTADHLFDAGGAGRTDLIEGVSECIIVGKSVSLGTGAMEVVRALNFYEGQIGRRKTTFEDAWEGI CEARGRSIGAVGKGVVPRVMKKRRKEAV

Acesso - C0NUA6 (sequência do peptídeo identificado – MASQLSMLSSRMKSAAK) UniProtKB - C0NUA6 (C0NUA6_AJECG)

Nome de submissão: L-isoaspartate O-methyltransferase Gene: HCBG_06937 Organismo: Aiallomycos, cansulatus, (strain, G186AP, / H82, / ATCC, MXA-24/

Organismo: Ajellomyces capsulatus (strain G186AR / H82 / ATCC MYA-2454 / RMSCC 2432) (Darling's disease fungus) (Histoplasma capsulatum)

>tr|C0NUA6|C0NUA6_AJECG L-isoaspartate O-methyltransferase OS=Ajellomyces capsulatus (strain G186AR / H82 / ATCC MYA-2454 / RMSCC 2432) OX=447093 GN=HCBG_06937 PE=4 SV=1

MASQLSMLSSRMKSAAK VLPPIINTSFGSNFDQFGDYKVVLIGDGSHGTSEFYQARAEITKHLIEHHG FDTVAVEADWPDAESVDRYVRLRPGVKSKLDPSPEPAFRRFPTWMWRNKEMQEFVHWMRDHNAH LPKERRAGFYGLDLYSMGLSIQAIIKYLSRVDPPMAKLARQRYGCLQPWVEDPSQYGLATLTNPRME SCEKNVIQMLRDLLNKRLEYSANEHNGEEFHSSEQNAYLVADAEAYYKAMYSRSADSWSLRDSHMF ETLRRLLNVKSESSKAVVWAHNSHIGDARYTSMGTRRGELNVGQLCRENLGQENVALVGCFTHTGT VAAAHDWDEDVQVMKVNPSRPDSWEYVAHESGIPSFLLDLRPNQADPELRRALAQERKERFIGVVY RPQTEMRSHYSAASLSLQFDAMVWFDETHAVTPFEIAQPHTALGVDETYPFGL

Acesso - F0UR97 (sequência do peptídeo identificado – MSGITVATLPRMSR) UniProtKB - F0UR97 (F0UR97_AJEC8)

Nome de submissão: Uncharacterized protein **Gene**: HCEG_07639

Organismo: Ajellomyces capsulatus (strain H88) (Darling's disease fungus) (Histoplasma capsulatum)

>tr|F0UR97|F0UR97_AJEC8 Uncharacterized protein OS=Ajellomyces capsulatus (strain H88) OX=544711 GN=HCEG_07639 PE=4 SV=1

MSGITVATLPRMSRETLAAMLLAPTNPNQLAIVDVRDSDHIGGHISTSTWHPSSTLSKHMPDLINKLRG KEKVVFHCALSQERGPSAALKYIREREQVLGKEESAKQAVFVLEGGFVQWQKKYGEDKRLTQAYVK DIWEED

Acesso - F0UBQ8 (sequência do peptídeo identificado – MAPTASSSNQATKK) UniProtKB - F0UBQ8 (F0UBQ8_AJEC8) Nome de submissão: C2H2 finger domain-containing protein Gene: HCEG_03122 Organismo: Ajellomyces capsulatus (strain H88) (Darling's disease fungus) (Histoplasma capsulatum)

>tr|F0UBQ8|F0UBQ8_AJEC8 C2H2 finger domain-containing protein OS=Ajellomyces capsulatus (strain H88) OX=544711 GN=HCEG_03122 PE=4 SV=1

MAPTASSSNQATKK STGAPEKKYKCQFCNRAFSRSEHRSRHERSHTKERPFKCLKCRSTFVRRDLL LRHDRTVHAKDGGIPLVTEGRRRGGQKAATTSNTPSKPSITIDPAALGQIEASSDGMVDIETAAMLMT DFQHKAAAAATNQTHDGDCRDTYSPDRAVILEPSVAYLSGNATLPQMPWDTFMSTPDVKSHSISSSL TSQDSNRNHHHRSSLDRHGMGTDSLTPALHSLVNSLPVSGNSTPNALSPFPSMTGPLSPVNYRRSP GPSQALTLPKAPQIADDAERDAIIEHVKSNDAVGSLPDTFQLPSTAALNRYLATYFNLYHHHLPFLHQE SFAPSEVSPPLLLAVLSIGALYTFEREHAFMLHIGSKVLVNQFLQHKENFDSRKCPLWAMQSTLLNMIF ESWSGDPKGLEWTCSIKSLLANMVAGNRYQLKLRIDAREGARPTREQWIEDEGCRRTYYAVYIFFGM LTLTFNHTPAISFDEIESLELPSSESMWNLEISNEDAWRRCLGSAAPTVTVREAHDSLFRGESLRYSAF ATRVMINALFLQVWSHKRSFQALQDVVTEFKLRLAIETWESSLELCEPETIVVPLSTPQKSHPLIFNSM AVYRNTRARLEVDLKSIQEALRYHSSYEVAAAMTVAREKVKRSQEMNKVIQQCFECIEIAAIQGINWVA KTSATNWSVEHPLCGLDMMVILSLWLYRLEHDEEQATEAEMAIYNKVRNLFDDDAVDACASNLSSTV ARVWGNILDGVVVWGITKLMGESFKLHSQALVGYEDSMVTSTSEHVLEPMPTQGLASVGTAY

6 DISCUSSÃO

Pesquisas em busca de moléculas protetoras contra a histoplasmose estão sendo desenvolvidas há décadas. Em 1971 já se realizavam testes com extrato da parede do fungo em modelos experimentas (GARCIA; HOWARD, 1971). Recentemente foram publicados trabalhos com outras substâncias provenientes de *H. capsulatum*, como HSP60 (GOMEZ; ALLENDOERFER; DEEPE, 1995a) e o antígeno H recombinante (DEEPE; GIBBONS, 2001), os quais demonstraram ser importantes candidatos a imunógenos protetores contra a doença.

O antígeno M e H são glicoproteínas presentes na parede do fungo e estão relacionadas a patogênese da doença, sendo que o primeiro é considerado imunodominante por ser detectado em todos os estágios da doença (HARRIS; DEEPE, 1988; WHEAT et al., 1982). Desta maneira, visto a importância dessa glicoproteína, em 2008, Guimarães e colaboradores (2008) expressaram e purificaram a proteína, antígeno M recombinante com o objetivo de caracterizar sua função na virulência e demonstrar sua localização na célula fúngica além de produzir ferramentas imunológicas como os anticorpos monoclonais.

Com a possibilidade de trabalhar com essa proteína recombinante e avaliar sua capacidade vacinal, em colaboração com o professor Allan Guimarães (Universidade Federal Fluminense) e Professor Josh Nosanchuk (Albert Einstein College of Medicine), foi recebido pelo Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos (ICB/USP) uma alíquota da cepa *E. coli* M15 já transformada e a partir desse ponto iniciou-se o protocolo de expressão. Inicialmente observou-se a ausência de produção da proteína, levando a repetições dos ensaios e revisão do protocolo na busca por erros na metodologia. Entretanto, mesmo após várias tentativas e mudanças de protocolos [teste de concentrações diferentes do indutor (IPTG), alterações na molaridade dos reagentes dos tampões, alteração da temperatura da incubação], a expressão não foi observada, sendo necessário solicitar uma nova alíquota transformada do Rio de Janeiro.

Teoricamente os passos necessários para se obter uma proteína recombinante são bem definidos e diretos. Primeiramente, o gene de interesse é clonado no vetor de escolha e transformado na bactéria compatível ao vetor, em seguida é realizado o processo de expressão e a proteína está pronta para ser purificada e caracterizada. Entretanto, na prática, alguns fenômenos podem ser inesperados, como o pouco crescimento da bactéria, a formação de corpúsculos de inclusão, inativação da proteína expressa e até a ausência de expressão (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Após a obtenção da proteína expressa, o principal objetivo foi purificar e realizar o *refolding* da amostra pela retirada do agente desnaturante, a uréia, e consequentemente trocar o tampão para possibilitar a realização dos testes *in vitro* (ensaios celulares).

Segundo Tsumoto e cols. (2003) existem várias opções para expressão heteróloga recombinante, entre as quais, a expressão em *E. coli* é a mais conveniente e frequentemente usada, entretanto, esse processo geralmente leva a produção de proteínas em corpúsculos de inclusão insolúveis e o *refolding* destes não é um processo simples, necessitando de uma extensiva abordagem de tentativas.

O refolding é iniciado pela redução da concentração do agente desnaturante utilizado para solubilizar os corpúsculos de inclusão, no entanto, não é uma reação única e compete com outras, como *misfolding* e agregação, levando a inativação e/ou precipitação da proteína. A relação do *refolding* e outras reações é determinado tanto pelo procedimento de redução da concentração do desnaturante quanto as condições do solvente e existem diversos métodos que podem ser utilizados para atingir o objetivo de retirar o agente desnaturante, como, diálise direta (*one-step dialysis*), diálise com diminuição gradual da concentração do desnaturante (*step-wise dialysis*), diluição simples, diluição pulsada, troca do tampão por gel filtração, entre outros (TSUMOTO et al., 2003).

No presente trabalho, foram utilizadas as técnicas de diálise direta, diálise com diminuição gradual da concentração do desnaturante, diluição simples, diluição pulsada. No entanto, foi observada a precipitação total da proteína nos métodos de diálise simples e com diminuição gradual da concentração do agente desnaturante (ureia). Já no processo de diluição simples e diluição pulsada foram observados os melhores resultados, mas com baixo rendimento de proteína (0,070 mg/ml e 0,038 mg/ml respectivamente), contudo a diluição simples (1:10) demonstrou-se mais eficiente e vantajosa devido ao menor tempo necessário e por não ser necessário a utilização do sistema de cromatografia AKTA.

Outro problema apresentado no desenvolvimento do projeto foi a presença de contaminantes após a purificação na coluna de afinidade por calda de histidina,

impossibilitando a realização de testes, como a linfoproliferação, pois não seria possível saber o verdadeiro estímulo, devido a presença de proteínas contaminantes.

Para confirmar a especificidade da proteína expressa (banda em gel de SDS-PAGE), foi realizado *Western Blotting*, utilizando como anticorpo primário, soro de camundongo infectado pela levedura de *H. capsulatum* e um anticorpo secundário ligado a peroxidase. Sendo este passo importante para continuidade do trabalho.

Devido aos problemas encontrados, não foi possível realizar os testes *in vitro* e em animais para avaliar a capacidade vacinal da proteína, pela necessidade de pureza para ensaios como o de linfoproliferação (evitando proliferação inespecífica), e a ausência de agentes tóxicos no tampão, como a ureia, a qual é toxica para as células, impossibilitando os ensaios de fagocitose e expressão de MHC de classe II e consequentemente impedindo a triagem de peptídeos gerados a partir do antígeno M processado pelos macrófagos e candidatos ao teste de proliferação de linfócitos.

A bioinformática engloba disciplinas da computação e da biologia, como genética e proteômica com objetivo de organizar dados gerados pelos estudos científicos e disponibiliza-los para análise, desta maneira, um dos principais papeis da bioinformática é disponibilizar informações de bancos de dados organizados e fornecer ferramentas computacionais que auxiliem o desenvolvimento de tratamentos contra doenças, incluindo vacinas (BRUSIC; FLOWER, 2004; SORIA-GUERRA et al., 2015).

Uma ferramenta computacional utilizada neste trabalho foi a de predição de peptídeos ligantes a moléculas de MHC de classe II (IEDB), pela análise de sequência da proteína antígeno M. Por meio dessa predição foram gerados 54 peptídeos com capacidade de ligação ao MHC-II de camundongos C57BL/6 (entre 691 sequências de peptídeos geradas), contudo, ao analisar os *cores* (núcleos) dos 54 peptídeos, apenas 12 *cores* diferentes foram identificados. Em seguida 12 sequências foram escolhidas para síntese e subsequente testes *in vitro* para verificar a capacidade de gerar resposta de células T em ensaios de proliferação de linfócitos, nesse testes foram utilizadas três concentrações (finais) diferentes de cada estímulo específico (peptídeos) (5, 10 e 20 µg/mI) em células de linfonodos retirados de camundongos previamente imunizados com os peptídeos e não foi detectado proliferação de células T (CD4 ou CD8) nos ensaios realizados. A técnica utilizada (ensaio de linfoproliferação) é uma das mais utilizadas para avaliar resposta

antígeno específica, assim como a quantificação da produção de citocinas de resposta das células T ao antígeno (sobrenadante de cultura de ensaios de linfoproliferação) (TEN BRINKE et al., 2017).

O tipo de citocina detectado em culturas de células T permite distingui-las entre células T *naive* e células T de memória, as quais produzem IFN- γ a partir de 20 horas após o estímulo com antígeno específico; a citocina IL-2 é produzida principalmente após o TCR reconhecer o estímulo, seguido de proliferação das células T que em seguida diferenciam-se em células efetoras produtoras de IFN- γ ou IL-4, produzindo uma resposta do tipo Th1 ou Th2 (ANTHONY et al., 2012). Os sobrenadantes de cultura dos ensaios de linfoproliferação foram analisados pela metodologia de CBA para quantificar as citocinas produzidas, comparando as concentrações obtidas das células estimuladas aos controles sem estímulo e foi verificado o aumento da produção de IFN- γ nos sobrenadantes estimulados com os peptídeos (estímulos individuais) 1, 3, 5, 10 e 12 (20 µg/m) e não foi detectado aumento de IL-2 nas células estimuladas quando comparadas aos controles sem estímulo.

Os ensaios experimentas em animais foram iniciados com os peptídeos disponíveis já sintetizados. Inicialmente foram testados os peptídeos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 em dois ensaios, onde grupos tratados com os peptídeos 6, 8 e 9 tiveram diminuição de UFC nos pulmões, desta maneira foram escolhidos para confirmação dos resultados por repetições; após os testes, apenas os grupos tratados com o peptídeo 6 apresentaram resultados, de diminuição de UFC no pulmão, reprodutíveis.

Para caracterizar o perfil de citocinas nos grupos tratados com os peptídeos 6 8 e 9, as citocinas do macerado de pulmão foram quantificadas, entretanto não foi observado diferença estatística significante entre as concentrações de citocinas dosadas nos grupos testes (tratados) quando comparadas aos grupos controles (não tratado e tratado com adjuvante), deste modo, foi realizado outro experimento com dias de sacrifícios diferentes (48 horas e 7 dias) com objetivo de detectar citocinas produzidas nos pulmões dos animais sacrificados após 48 horas da infecção, contudo não foi detectado aumento de citocinas relacionadas a resposta protetora contra o fungo (IFN- γ , TNF- α e IL-17).

Em relação aos ensaios onde foram testados os peptídeos 1, 10 e 12 (dois experimentos), apenas os grupos tratados com os peptídeos 10 e 12 apresentaram

reprodutibilidade nas replicatas, com diminuição de UFC nos pulmões dos grupos testes (tratados com peptídeos) em relação aos grupos controles (não tratado e tratado com adjuvante). Quanto ao perfil de citocinas nos macerados de pulmões, foi detectado aumento de IFN- γ , TNF- α , IL-17A e IL-6 nos grupos tratados com o peptídeo 12 e TNF- α e IL-6 nos grupos tratados com o peptídeo 10 quando comparados com os grupos controles (não tratado e tratado com adjuvante).

Estudos já demonstraram que a produção de citocinas como IL-12, IFN-γ e TNF-α, perfil de resposta do tipo Th1, e citocinas regulatórias como IL-6 são essenciais para controle da infecção causada por *H. capsulatum*. Neutrófilos e células dendríticas são os principais produtores de IL-12 na histoplasmose, sendo essa citocina responsável por estimular a produção de IFN-γ pela células T (CD4 e CD8) que tem a função de ativar macrófagos (IFN-γ) no local da infecção, desencadeando a produção de NO e consequentemente inibindo o crescimento do fungo dentro das células (macrófagos) (CAIN; DEEPE, 1998; KROETZ; DEEPE, 2012).

TNF-α é outra citocina importante durante a infecção e está envolvida no controle da secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias (KROETZ; DEEPE, 2012), além de já ter sido demonstrado que na ausência de IFN-γ, em infecção secundária com o fungo em camundongos, sua produção aumentada é a principal responsável pelo controle da doença (ZHOU; MILLER; SEDER, 1998).

Citocinas da família IL-17 têm demonstrado importância na regulação do equilíbrio entre a resposta Th1 e Th2, em trabalho realizado por Deepe e Gibbons (2009) foi demonstrado que a ausência de IL-17, por tratamento dos animais com anticorpos monoclonais, prejudica a eliminação (*clearence*) do fungo durante infecção primária. Outro trabalho que reforça a importância da resposta do tipo Th17 na infecção por *H. capsulatum* é o de Nanjappa e colaboradores (2012), onde animais imunossuprimidos, com falta de células T CD4, imunizados com vacina indutora de células Tc17 (células CD8 produtoras de IL-17) foram resistentes a infecção, demonstrando que esse tipo de resposta é indispensável para sobrevivência dos animais na falta de células T CD4 e com resposta do tipo Th1 prejudicada (NANJAPPA et al., 2012).

O monofosforil lipídeo A (MPLA) é um adjuvante proveniente do LPS (lipopolissacarídeo) de bactérias, sem seus efeitos tóxicos. Essa molécula possui propriedades imunomoduladoras e suas preparações estão associadas com o

estímulo de respostas do tipo Th1 e resposta mista (Th1 e Th2) (CASELLA; MITCHELL, 2008). Com o intuito de testar o efeito do MPLA associado ao peptídeo 6 na imunização profilática de animais (camundongos C57BL/6) foi realizado dois ensaios experimentais, onde, no primeiro, não foi observado diminuição de UFC nos animais tratados com o peptídeo associado a MPLA e o grupo controle não tratado e no segundo experimento, não houve diferença estatística na diminuição de UFC entre o grupo tratado com o peptídeo associado ao MPLA e o grupo controle tratado com o adjuvante.

Os ensaios de cinética de fagocitose e apresentação de MHC de classe II com macrófagos foram executados com o objetivo de determinar o melhor tempo para extração dos complexos MHC-II-peptídeo das células. Após analisar os resultados obtidos, foi determinado que os complexos seriam extraídos após 4 horas de fagocitose, seguido da imunoprecipitação e envio das amostras para sequenciamento das proteínas e peptídeos por espectrometria de massa, o qual foi realizo em colaboração com o Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Parasitologia do ICB/USP.

Diverso trabalhos que utilizam metodologias de bioinformática e/ou imunoproteômica para identificação de peptídeos ligantes a moléculas de MHC de classe I e II vêm sido realizados (ALMEIDA et al., 2018; BÄR et al., 2012; BOZZACCO et al., 2011; CREECH et al., 2018; ELHASSAN et al., 2019; HUNT et al., 1992; JOHNSON et al., 2009; JOSHI et al., 2019).

Joshi e colaboradores (2019) utilizaram metodologia computacional (IEDB) para identificar peptídeos com capacidade de estimular linfoproliferação e produzir citocinas características de resposta do tipo Th1 em hamsters desafiados com *Leishmania* (JOSHI et al., 2019). Em outro trabalho, com foco no desenvolvimento de vacina de peptídeos, provenientes da proteína *heat shock* 70 kDa, a partir de predição *in silico* (IEDB), contra *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, foram encontradas 10 sequências de peptídeos candidatos a vacina com capacidade de desencadear resposta de células T e células B pelas predições *in silico*, sendo ainda necessários validação por testes *in vitro* (ELHASSAN et al., 2019). Almeida e colaboradores (2018) descreveram três peptídeos (ZR3, ZR4 e ZR8), obtidos por predição *in silico* (ligantes de MHC de classe II de camundongos), provenientes da proteína GP70, que foram capazes de promover proliferação de células T CD4 e diminuir o tamanho da lesão de animais infectados com *Sporothrix brasiliensis* após

o tratamento com os peptídeos (ALMEIDA et al., 2018). Esses dados demonstram a utilidade das ferramentas computacionais no desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas, a partir de sequências de proteínas imunogênicas, para diversas doenças causadas por micro-organismos diferentes.

A identificação de peptídeos ligantes a moléculas de MHC, por espectrometria de massa, tem grande utilidade na caracterização de antígenos processados, apresentados e reconhecidos por células T. Essa técnica pode ser utilizada tanto para identificação de peptídeos provenientes de células infectadas por vírus, células com alterações associadas a doenças autoimunes (MHC de classe I) e peptídeos provenientes do processamento de micro-organismos como, bactérias e fungos (MHC de classe II) possibilitando a identificação de sequências de aminoácidos candidatos a vacinas. Essa estratégia para o desenvolvimento de vacinas já foi utilizada por autores com Bar e colaboradores (2012), que isolaram e sequenciaram moléculas de MHC de classe II de células APCs infectadas com *Candida albicans* e identificaram um peptídeo, proveniente do fungo, que promoveu proteção dos animais (camundongos) contra candidíase fatal quando imunizados (BÄR et al., 2012).

Neste trabalho foi utilizada a estratégia de identificação de peptídeos ligantes ao MHC de classe II por espectrometria de massa. Macrófagos infectados com *H. capsulatum* foram submetidos a um protocolo de extração e isolamento das moléculas de MHC de classe II (acopladas aos peptídeos apresentados), por imunoprecipitação, e após processamento foram sequenciadas e identificados 9 peptídeos provenientes de proteínas do fungo.

As sequências das 9 proteínas de onde os peptídeos tiveram origem foram submetidas a análise computacional no IEDB com o objetivo de comparar as duas metodologias [(imunoproteômica (*in vitro*) e computacional (*in silico*)], pois, por terem sido isoladas diretamente da molécula de MHC de classe II (foram naturalmente processadas e apresentadas), acreditávamos que na predição *in silico* seriam geradas as mesmas sequências apresentando rank (%) abaixo de 10 (bons ligantes), contudo, apenas um dos peptídeos (MSGITVATLPRMSRE) foi considerado bom ligante pelo método computacional.

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: bimonthly 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.