

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*ALLAN JEFFERSON GUIMARÃES*

**Proteína M recombinante do *Histoplasma capsulatum*: Mapeamento de  
epítomos e aplicação no diagnóstico da histoplasmose**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientador (es):** Prof. Dr. Rosely Maria Zancopé-Oliveira  
Prof. Dr. José Mauro Peralta

**RIO DE JANEIRO**

2006

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

G963

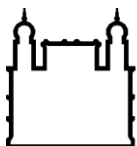
Guimarães, Allan Jefferson.

Proteína M recombinante do *Histoplasma Capsulatum* : mapeamento de epítomos e aplicação no diagnóstico da histoplasmose. / Allan Jefferson Guimarães – Rio de Janeiro, 2006.  
v, 62 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2006.  
Bibliografia: f. 57-62

1. *Histoplasma capsulatum*. 2. Histoplasmose. 3. Antígeno M. 4. Mapeamento de epítomos. 5. Diagnóstico. I. Título.

CDD 616.969



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR: Allan Jefferson Guimarães**

Proteína M recombinante do *Histoplasma capsulatum*: Mapeamento de epítomos e aplicação no diagnóstico da histoplasmose

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Rosely Maria Zancopé Oliveira**  
**Prof. Dr. José Mauro Peralta**

**Aprovada em: 04 / 05 / 2006**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Salvatore Giovanni de Simone - **Presidente**  
**Prof. Dr.** Célia Maria de Almeida Soares  
**Prof. Dr.** Marcio Lourenço Rodrigues

Rio de Janeiro, 04 de maio de 2006

## ABSTRACT

Histoplasmosis is caused by the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. Infection with this organism is often diagnosed by determining the presence of antibody to the immunodominant M antigen, but the role of the M antigen in the pathogenesis of histoplasmosis has previously not been elucidated. The function of the M protein is not known, but genetically it is homologous to fungal catalases.

In our work, we sought to determine immunodominant regions of the M antigen, create a monoclonal antibodies panel, characterize them, use them for epitope mapping, show that the M antigen was located on the cell surface of *H. capsulatum* yeasts, demonstrate the catalase activity of the protein and developed an immunoassay to detect antibodies against this protein and another one to detect the circulating M antigen in body fluids.

We could determine the peptides that have the most antigenic activity and their localization on the molecule, and characterize according to biochemical properties. We generated three fragments containing these peptides and used to evaluate the monoclonal antibodies binding and recognition to each fragment. We could see that one fragment, the F3, showed more binding to the mAbs than the other two, but additional studies have to be done to complete the epitope mapping. To evaluate the role of the M antigen on the pathogenesis of histoplasmosis, using Western blot analysis of a detergent extract of cell walls and cell membranes (CW/M) from yeast cells, we found that mAbs generated to recombinant M antigen reacted with the CW/M preparations. Immunofluorescence studies also revealed that the mAbs to the M antigen labeled the yeast cell surface. Also, we assayed the catalase activity using different cell extract fractions for the localization of the enzyme and confirmed that the major activity was present in extracts including fungal surface antigens. The ability of the M antigen to function as a catalase suggests that this enzyme is probably involved in protecting the yeast cells against the oxidative stress within the phagolysosome and escaping of the fungicidal mechanisms in the macrophages. Localization of the M antigen to the cell surface of Hc has important implications for the antigenicity of the protein since it demonstrates that it is accessible to host immune cells and for antibody interactions.

Also, the ELISA for antibody detection using purified and treated histoplasmin (ptHMIN) showed a sensitivity of 92% and a specificity of 96%, while the ELISA for antigen detection showed a sensitivity of 80% and a specificity of 91%, proving that these two methodologies could be used in the diagnosis of histoplasmosis.

## RESUMO

A histoplasmose é causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. A infecção por este organismo é freqüentemente diagnosticada pela determinação da presença de anticorpos para a proteína M, imunodominante, mas o papel deste antígeno na patogênese da histoplasmose permanece obscuro. A função do antígeno M não é conhecida, mas geneticamente esta proteína é homóloga catalases fúngicas.

Em nosso estudo, nós procuramos determinar regiões imunodominantes do antígeno M, produzir um painel de anticorpos monoclonais contra esta proteína, caracterizá-los, usá-los para o mapeamento de epítomos, mostrar a localização do antígeno M na levedura do *H. capsulatum*, demonstrar a atividade de catalase desta proteína e desenvolver imunoenaios para a detecção de anticorpos contra esta proteína e antígeno M circulante nos fluidos corporais.

Foi possível determinar peptídeos com maior atividade antigênica e suas localizações na molécula e caracterizá-los de acordo com as suas propriedades bioquímicas. Nós geramos três fragmentos que continham estes peptídeos e os utilizamos para avaliar a ligação dos anticorpos monoclonais e reconhecimento a cada fragmento separadamente. Um dos fragmentos, F3, mostrou maior ligação aos anticorpos monoclonais que os outros avaliados, entretanto estudos adicionais devem ser avaliados para um completo mapeamento. Para avaliar o papel do antígeno M na patogênese da histoplasmose, usando análise por imunoblot de um extrato de parede celular e membrana (CW/M) obtido de levedura, provamos que os mAbs gerados contra o antígeno M recombinante puderam reconhecer este antígeno no extrato utilizado. Estudos de imunofluorescência também revelaram que os mAbs reconheciam proteínas na superfície da levedura. Adicionalmente, avaliamos a atividade de catalase usando diferentes frações celulares para sugerir a localização da enzima e confirmamos que a maior atividade de catalase estava presente nos extratos incluindo antígenos de superfície. A capacidade do antígeno M em funcionar como catalase sugere que esta enzima está provavelmente envolvida na proteção pelas leveduras contra o stress oxidativo na interior do fagolisossomo e escape dos mecanismos fungicidas nos macrófagos. A localização do antígeno M na superfície do Hc tem importantes implicações na antigenicidade da proteína já que está acessível ao sistema imunológico do hospedeiro e interações com os anticorpos.

Adicionalmente, a ELISA para a detecção de anticorpos utilizando histoplasmina purificada e tratada (ptHMIN) mostrou uma sensibilidade de 92% e uma especificidade de 96%, enquanto a ELISA para a detecção de antígenos mostrou uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 91%, provando que estas duas metodologias poderiam ser utilizadas no diagnóstico da histoplasmose.

# ÍNDICE

---

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>3</b>
Epidemiologia	3
Patogenia	4
Diagnóstico	6
<b>RELEVÂNCIA</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS GERAIS</b>	<b>14</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>15</b>
Cepas de <i>Histoplasma capsulatum</i> e amostras de soros	15
Identificação, manutenção das cepas e produção de antígenos	15
<i>Preparação do antígeno histoplasmina</i>	15
<i>Purificação da Histoplasmina (PHMIN)</i>	15
<i>Processo químico de deglicosilação com metaperiodato de sódio</i>	16
<i>Dosagem de proteínas</i>	16
Estudos de modelagem molecular e mapeamento computacional da proteína M	16
Expressão e purificação da proteína M recombinante	17
Clonagem dos fragmentos do antígeno M recombinante	18
Produção de anticorpos monoclonais (mAbs)	19
Isotipagem dos mAbs	20
Avaliação da especificidade dos mAbs	20
Mapeamento de epítomos B	21
Imunolocalização do antígeno M na levedura do <i>H. capsulatum</i>	21
<i>Imunofluorescência</i>	21
<i>Deteção do antígeno M na fração parede celular/membrana</i>	22
Atividade catalítica em diferentes frações celulares	22
Ensaio imunoenzimático para a deteção de anticorpos	23
Ensaio imunoenzimático para a deteção de antígenos	24
<b>RESULTADOS</b>	<b>25</b>
Produção de antígenos	26
Modelagem molecular e mapeamento computacional do antígeno M	27

Expressão e purificação da proteína M recombinante _____	31
Clonagem, expressão e purificação dos fragmentos do antígeno M recombinante _____	32
Obtenção dos anticorpos monoclonais (mAbs) _____	34
Especificidade dos monoclonais obtidos _____	34
Isotipagem dos mAbs avaliados quanto a especificidade _____	37
Mapeamento de epítomos B do antígeno M recombinante _____	37
Imunolocalização do antígeno M recombinante do <i>H. capsulatum</i> _____	38
<i>Imunofluorescência</i> _____	38
<i>Deteção do antígeno M na fração parede celular/membrana</i> _____	38
Atividade catalítica em diferentes frações celulares _____	39
Ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos _____	41
Ensaio imunoenzimático para a detecção de antígenos _____	46
<b>DISCUSSÃO</b> _____	<b>49</b>
<b>CONCLUSÃO</b> _____	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> _____	<b>56</b>

# INTRODUÇÃO

---

A histoplasmose é uma micose sistêmica e cosmopolita tendo como agente etiológico o *Histoplasma capsulatum*. A histoplasmose humana é causada por duas variedades deste patógeno, *H. capsulatum* var. *capsulatum* e *H. capsulatum* var. *duboisii*. Ambas as variedades são heterotáticas, *mating type* (+) e (-), e se reproduzem sexualmente para formar o estágio de ascomiceto perfeito designado *Ajellomyces capsulatum*. Este organismo é um fungo dimórfico (Maresca e cols. 1989), que pode ser encontrado no meio ambiente na forma filamentosa, como saprófita de solos enriquecidos com matéria orgânica como fezes de animais (galinhas, outras aves e morcegos) ou em cultivo laboratorial a temperaturas inferiores a 35°C (Emmons 1950; Zeidberg e cols. 1952; Emmons 1956; Emmons 1956; Alteras 1966; Emmons e cols. 1966; Disalvo e cols. 1970; Smith 1971; Smith 1971). Esta relação é devida ao alto teor de ácido úrico encontrado nestes excrementos, sendo este componente utilizado como fonte de nitrogênio pelo *H. capsulatum*, imprescindível ao seu crescimento e proliferação. Além disto, tais micronichos geralmente apresentam condições de temperatura, umidade, e acidez do solo, ideais à sobrevivência deste microrganismo (Eissenberg 1991). Com raras exceções, este fungo infecta seu hospedeiro por via respiratória. Em parasitismo, ou a partir de espécimes clínicos sob cultivo a 37°C em apropriado meio de cultura o *H. capsulatum* se apresenta como leveduras unibrotantes. Este fungo apresenta duas variedades anamórficas, *H. capsulatum* var. *capsulatum* e *H. capsulatum* var. *duboisii* sendo a var. *capsulatum* a de maior importância em nosso meio devido a sua distribuição geográfica, sendo a responsável pela histoplasmose nas Américas, enquanto a var. *duboisii* é a responsável pela histoplasmose africana.

**Epidemiologia:** A histoplasmose é epidemiologicamente importante devido a sua distribuição mundial (Wheat 1989; Wheat 2003). É uma das micoses de maior importância e prevalência no continente americano devido ao seu grau de endemidade, sendo a região central da América do Norte uma das áreas mais endêmicas, com aproximadamente 500.000 indivíduos infectados a cada ano nos Estados Unidos, concentrando-se nas regiões Central e Sudeste (Cano 2001). Regiões de menor endemidade são encontradas em pontos da América Latina sendo as áreas mais prevalentes na Venezuela, Equador, Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (Ajello 1971; Goodwin e cols. 1978; Rios Fabra 1994; Wheat 1997). No Brasil, a distribuição do *H. capsulatum* no meio ambiente e as características do seu nicho ecológico têm sido muito pouco estudadas, podendo ser enumerados os



trabalhos referentes ao isolamento deste fungo do solo (Silva 1956; Fava Netto 1967; Araujo 1970; Schmidt 1973; Moraes 1976; Wanke 1985; Severo 1986; Zancopé-Oliveira 1987; Fernandes 1989), apesar de diversos inquéritos com o teste cutâneo usando histoplasmina revelarem uma prevalência bastante significativa da histoplasmose-infecção no nosso país (Fava S.C. 1997). As principais áreas endêmicas estão localizadas nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, onde as prevalências variam de 4,4 – 63,1% e 3,0 – 93,2% respectivamente (Londero e cols. 1978; Zancopé-Oliveira e cols. 2005). Geralmente, as condições ambientais presentes nas áreas hiperendêmicas são de clima moderado com umidade constante (Maresca e cols. 1989). O Estado do Rio de Janeiro apresenta áreas com altos índices de infecção, sendo consideradas como endêmicas ou hiperendêmicas (Carvalho 1949; Sandia 1974; Wanke 1985; Zancopé-Oliveira 1985; Capone 1999).

**Patogenia:** O início da infecção com o *H. capsulatum* depende de uma complexa interação entre o parasita e seu hospedeiro e, pelo menos, três condições podem ser observadas na patogenia desta micose. O desenvolvimento de infecção assintomática ou sintomática na histoplasmose é diretamente dependente do estado de competência imunológica do hospedeiro, da virulência da cepa infectante e/ou da carga parasitária adquirida (inóculo infectante) (Retallack 1999).

O *H. capsulatum* é adquirido por via inalatória. Ao atingir os alvéolos, as partículas infectantes são fagocitadas, levando à ativação dos fagócitos e liberação de mediadores químicos como o  $H_2O_2$  e  $NO^-$  que exporiam o fungo a um “stress” oxidativo. Entretanto, mecanismos de escape, entre os quais a produção de catalases, são desencadeados, com ocorrência do processo de multiplicação do fungo dentro dos macrófagos alveolares (Bullock 1987; Schnur 1990). Catalases, enzimas que decompõe  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  são encontradas em todos organismos aeróbicos e seu papel na proteção contra os mecanismos oxidativos é bem conhecido. Com isso, estas enzimas poderiam atuar como fator de virulência e defesa para diversos microorganismos contra mecanismos oxidativos de seus hospedeiros. Este papel têm sido demonstrado em diversos fungos como *Aspergillus fumigatus* (Paris S. 2003) e *Candida albicans* (Wysong 1998). O envolvimento de mecanismos oxidativos na patogênese das micoses têm sido demonstrado em ensaios *in vitro*, bem como o papel da catalase na inibição da fagocitose por células efetoras dos hospedeiros contra alguns fungos (Brummer 1984; McEwen 1984; Levitz 1985; Morrison 1988; Brummer 1995; Meloi-Bruneri 1996). Estes achados sugerem que catalases produzidas endogenamente podem proteger os fungos durante a fagocitose. Tem sido sugerido que o antígeno M do *H. capsulatum* é uma glicoproteína, com atividade de catalase (Hamilton e cols. 1990; Zancopé-Oliveira e cols. 1999;

Johnson 2002; Maldonado 2003), que poderia estar participando diretamente na conversão dos reativos intermediários do oxigênio (principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radical superóxido) em compostos inertes, inócuos para a célula.

O *H. capsulatum*, quando fagocitado pelos macrófagos, poderia secretar esta proteína no interior dos fagolisossomos e assim impedir a oxidação das estruturas fúngicas celulares, sendo assim um mecanismo de escape eficiente. Recentes estudos realizados por Maldonado e cols. (comunicação pessoal) demonstram que o antígeno M tem seu papel funcional como catalase, mas não evidenciaram uma direta correlação desta função na patogênese da histoplasmose. Entretanto, o estabelecimento do real papel da catalase como fator de virulência durante o mecanismo de conversão do *H. capsulatum* de sua forma filamentosa para a leveduriforme no parênquima pulmonar, bem como durante o estabelecimento da infecção através de mecanismos de escape ainda permanecem obscuros.

A inalação de partículas infectantes provenientes de solos contaminados com cepas altamente virulentas resulta na forma clínica conhecida como histoplasmose aguda. Este tipo de infecção, espontaneamente regressiva, é uma ocorrência usual em hospedeiros imunocompetentes, podendo ser observada em casos isolados ou em forma de surtos. Já em hospedeiros imunodeprimidos, mesmo cepas consideradas de baixa virulência, semelhantes à cepa "Downs" (Spitzer 1990), tornam-se virulentas, disseminando para diferentes órgãos, causando a forma clínica conhecida como histoplasmose disseminada. Esta forma clínica pode ser resultante também, da reativação endógena de focos quiescentes uma vez que fungos viáveis são encontrados dentro de granulomas, muitos anos após a infecção primária. Embora bem conhecida à associação deste fungo com o desenvolvimento desta forma clínica, pouco é conhecido sobre a epidemiologia e patogenia deste organismo em indivíduos imunocomprometidos (Brooks 1998; Woods 2001; Woods 2002).

A maioria dos casos de histoplasmose ocorre como assintomáticos e podem se apresentar como uma infecção pulmonar aguda, não requerendo uma terapia suporte. Entretanto, aproximadamente 5% dos pacientes evoluem para quadros pulmonares mais graves e doença extrapulmonar que pode ser fatal se não for diagnosticada e o tratamento iniciado rapidamente (Reiss e cols. 2000). A histoplasmose apresenta grande espectro clínico que varia desde uma infecção assintomática ou benigna até uma doença aguda fulminante, podendo até mesmo apresentar-se como uma infecção pulmonar crônica de longa duração.

A doença pode acometer todos os indivíduos, entretanto, é fator de risco potencial para pacientes imunocomprometidos, particularmente em pacientes com AIDS, onde a infecção é

caracteristicamente oportunista e em indivíduos idosos ou crianças com menos de dois anos de idade. A significância da histoplasmose como doença oportunista tem sido descrita e foi classificada como a quarta infecção mais associada a AIDS (Wheat 1989; Wheat 2003). Em algumas áreas endêmicas, a grande variabilidade de incidência tem sido determinada, e descrita na literatura como ocorrendo em 2-5% de pacientes com AIDS (Centers for Disease Control and Prevention. HIV/AIDS Surveillance Report, Feb 1993: 1-23;(Pedroza 2003), sendo que em algumas cidades norte americanas este número pode chegar a 25% . No Brasil, este índice ainda não foi corretamente determinado, mas acredita-se que possa ser encontrada em aproximadamente 1.15% dos pacientes com infecção do sistema imunológico pelo HIV(Pedroza 2003).

**Diagnóstico:** O diagnóstico da histoplasmose é baseado no isolamento e identificação de seu agente causal, o *H. capsulatum*, de materiais biológicos. Para isso, os exames diretos e o isolamento em cultivo devem ser empregados, concomitantemente. O exame direto, técnica amplamente empregada na evidencição de agentes de outras micoses, é praticamente inviável para o diagnóstico da histoplasmose. Neste procedimento, preparações a fresco de espécimes clínicos (escarro, biópsia, lavado broncoalveolar, entre outros) são tratadas com hidróxido de potássio (KOH) a 10% e analisadas microscopicamente para a observação de células leveduriformes de *H. capsulatum*. Outros métodos de coloração, como o Giemsa ou Wright, também são de baixo rendimento e difícil interpretação, porque o *H. capsulatum* em sua forma parasitária, além de reduzido tamanho, apresenta micromorfologia compatível com a de outros fungos patogênicos, sendo essencial o isolamento em meios de cultivo para sua identificação definitiva. Melhor rendimento é obtido com esfregaços submetidos à impregnação pela prata, embora persistam as dificuldades de interpretação.

No cultivo, método de complementação obrigatória no diagnóstico da histoplasmose, utiliza-se meios especiais para isolamento, tais como ágar Sabouraud, Mycosel, entre outros, e incubados a 25° C durante 6 a 12 semanas. Nestas condições, o *H. capsulatum* inicialmente aparece como colônias glabras, que com o tempo tornam-se filamentosas, aéreas, algodoadas, de coloração branca, compostas microscopicamente por uma trama miceliana, com hifas hialinas septadas e micro e macroconídios em vários estágios evolutivos. A evidência destes conídios sugere que o fungo seja o *H. capsulatum*, mas é necessária a conversão desta fase para a forma leveduriforme, visto que fungos saprófitas do Gênero *Chryso sporium* podem apresentar estruturas de propagação semelhantes às produzidas pelo agente da histoplasmose (Gaur & Lichtwardt, 1980). Entretanto, o *H. capsulatum* é um dos fungos dimórficos de difícil conversão, sendo dependente não só de meios, temperatura e metodologia especial, como também das características fisiológicas da cepa

(Eissenberg 1991). Atualmente métodos alternativos para identificação do fungo utilizando amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido desenvolvidos para este fim (Zancope-Oliveira e cols. 1999; Bialek e cols. 2001; Bialek e cols. 2002; Bialek e cols. 2002; Rickerts e cols. 2002; Bracca e cols. 2003; Guedes e cols. 2003).

Para obtenção da fase leveduriforme deste fungo, deve-se fazer repiques da fase filamentosa da colônia suspeita em meios enriquecidos, tais como Ágar sangue, Ágar infusão cérebro-coração (BHI) acrescido de cisteína, e incubados a 35-37°C. Quando convertidos, observam-se colônias glabras, lisas, branco-amareladas, apresentando, à microscopia, leveduras ovais, unibrotantes, de morfologia uniforme.

A histoplasmose é uma doença granulomatosa, e seu diagnóstico também pode ser feito também por técnicas rotineiramente usadas na histopatologia, como pela coloração com hematoxilina-eosina (H/E), onde as leveduras aparecerão como um corpúsculo levemente basofílico, esférico, rodeado por um halo claro delimitado por uma parede celular muito fina e hialina. Em técnicas especiais, tais como os métodos de Gomori ou Grocott, ou através do ácido periódico de Schiff (PAS), a parede celular do *H. capsulatum* é fortemente corada, sendo visualizado como leveduras unibrotantes pequenas, ovais ou arredondadas (Kaufman 1992). Entretanto, as estruturas são muito similares a outros patógenos e estas características podem levar a um erro durante a identificação para finalidade de diagnóstico. O diagnóstico diferencial deve ser relevado principalmente com os microorganismos da espécie *Candida glabrata*, *Penicillium marneffeii*, *Pneumocystis (carinii) jirovecii*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani* e *Cryptococcus neoformans* (Meleney 1956). Por isto, é extremamente importante ter experiência na identificação destes patógenos e as características das leveduras analisadas por diferentes métodos de coloração.

Alternativas para o diagnóstico da histoplasmose são os métodos sorológicos existentes que consistem na detecção de antígenos e anticorpos, metodologias presuntivas e rápidas para a confirmação da infecção. A detecção de antígenos em fluidos corporais é frequentemente utilizada para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes, principalmente imunodeprimidos, apresentando a forma disseminada da doença e cujos títulos de anticorpos são baixos ou ausentes. Entre estes, o método mais utilizado e avaliado até o presente é o radioimunoensaio (RIA) descrito por Wheat e colaboradores (1986) o qual pode detectar antígenos polissacarídicos na urina, lavado broncoalveolar, flúidos cerebrospinais e amostras de soros humanos (Wheat 1989; Wheat 1991; Reiss e cols. 2000). Outro método, visando o mesmo objetivo, é um ELISA de inibição (Gomez e cols. 1997). Esta metodologia tem uma maior especificidade que o RIA, devido ao uso de anticorpos monoclonais, ao invés de anticorpos policlonais, empregados no RIA. Entretanto estas duas

metodologias não apresentam especificidade e sensibilidade adequadas que permitam ser empregadas no diagnóstico confirmatório.

Evidências sorológicas são os indicadores primários de infecção por microrganismos e testes de detecção de anticorpos têm sido amplamente utilizados no auxílio do diagnóstico da histoplasmose. Até o presente, a imunodifusão radial dupla de Ouchterlony (ID) (Ouchterlony 1958) e a reação de fixação de complemento (RFC) (Kaufman 1992) tem sido os métodos de escolha na rotina de laboratórios de análises clínicas. Entretanto, a ID, técnica altamente específica, apresenta baixa sensibilidade onde os anticorpos específicos podem não ser detectáveis até 4 a 6 semanas após o aparecimento dos sintomas, fornecendo resultados falso-negativos (Pizzini e cols. 1999). Por outro lado, a RFC, embora mais sensível que a ID, pode apresentar reatividade cruzada com soro de pacientes infectados com *Blastomyces dermatitides*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis* com sua especificidade variando de acordo com o antígeno usado na reação (Kaufman 1992). Mais recentemente a técnica de *western blot* tem sido empregada como um método alternativo para a detecção de anticorpos na histoplasmose (Zancope-Oliveira e cols. 1994), particularmente nas formas agudas e disseminadas da doença (Pizzini e cols. 1999).

Os resultados obtidos nos métodos sorológicos utilizados até então somente nos dão um diagnóstico presuntivo da histoplasmose, sendo úteis na triagem e avaliação prognóstica desta micose. Entretanto, os parâmetros clínicos e epidemiológicos devem ser levados em consideração na avaliação dos resultados laboratoriais.

O principal complexo antigênico utilizado para fins de diagnóstico é a histoplasmina, um filtrado de cultura de *H. capsulatum* obtido da forma filamentosa crescido em meio sintético. Os principais constituintes antigênicos deste complexo são o antígeno C, que é um carboidrato (galactomanana, responsável pela reatividade cruzada com outros gêneros fúngicos) e os antígenos espécie-específicos H e M. Estes são potentes desencadeadores da imunidade celular e humoral, sendo considerados imunodominantes uma vez que são expressos durante toda a infecção e são capazes de induzir a formação de precipitinas (Heiner 1958) e anticorpos fixadores do complemento, sendo considerados marcadores específicos para a doença em atividade em pacientes imunocompetentes.

Na imunodifusão, as linhas de precipitação equivalentes aos antígenos H e M têm maior significado. A linha M pode ser observada logo no início da infecção, persistindo por anos após a infecção, e pode ser detectada em pacientes imunossensibilizados pela intradermoreação com histoplasmina. A linha H pode ser detectada logo após o aparecimento da linha M e é encontrada no soro de pacientes com doença ativa e progressiva, sendo então correlacionada com a forma clínica

da doença. Entretanto está presente em somente 2% dos casos de infecção ativa (Kaufman 1992). Os anticorpos anti-H podem ser detectados em algumas amostras de soro até dois anos após a infecção, mas freqüentemente se tornam não-detectáveis mais rapidamente que os anticorpos anti-M. A presença das linhas de precipitação H e M na mesma amostra de soro é altamente específica, sendo considerada como diagnóstico da histoplasmose.

Com o objetivo de tornar o diagnóstico da histoplasmose mais específico, métodos cromatográficos de purificação das frações H e M e seu tratamento com agentes oxidantes e enzimas glicolíticas com finalidade de retirar a porção glicosídica destes antígenos foram propostos (Zancopé-Oliveira 1987; Zancopé-Oliveira e cols. 1994). Os antígenos H e M, em sua forma nativa, são glicoproteínas com peso molecular de 120 e 88 kDa respectivamente, contendo epítomos protéicos específicos e glicosídicos ligados à porção *N*-terminal. As deglicosilações enzimáticas ou químicas pelo metaperiodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>) aumentaram a especificidade dos métodos imunoenzimáticos para a detecção de anticorpos, reduzindo a reatividade cruzada nas amostras de fungos de pacientes infectados com outros fungos (Zancopé-Oliveira e cols. 1994; Pizzini e cols. 1999).

Na pesquisa de métodos mais precisos para o diagnóstico da histoplasmose, bem como a necessidade de se conhecer a atividade biológica dos antígenos H e M, estes antígenos foram seqüenciados e clonados, sendo determinadas as suas seqüências gênicas codificadoras, bem como obtidas as suas respectivas proteínas de fusão (Deepe e cols. 1995; Zancopé-Oliveira e cols. 1999). Testes imunoenzimáticos (ELISAS e Western blot) utilizando estes antígenos recombinantes têm sido padronizados com o objetivo da detecção de anticorpos e antígenos. Além destes antígenos, outras proteínas recombinantes, como a GH- 17 (histona-like H2B) (Chandrashekar e cols. 1997) tem sido estudadas como antígenos específicos para serem utilizados em técnicas imunoenzimáticas.

Com a clonagem, expressão e purificação do antígeno M recombinante (rM), houve o planejamento da confecção de métodos diagnósticos altamente específicos e sensíveis, utilizando somente esta molécula como antígeno, com o objetivo da detecção de antígenos e anticorpos nos fluidos corporais.

Para aumentar a especificidade do teste em relação à ligação ao antígeno, anticorpos monoclonais podem ser produzidos. A especificidade é devido ao reconhecimento de somente um único epítomo na molécula antigênica pelo anticorpo monoclonal, dependendo também a avidez da ligação, na maioria das vezes, da conformação antigênica, resultando na maior exposição ou não do epítomo. Estes reagentes específicos possuem inúmeros usos que variam desde a padronização de

novos imunoenaios até o desenvolvimento de proteção contra infecção após sua administração (imunização passiva).

A imunidade celular é o principal mecanismo no controle da infecção humana pelo *H. capsulatum*, e a resolução da infecção é coincidente com a ativação e proliferação de linfócitos T e liberação de citocinas (Deepe 1994; Cain 1998). Vários antígenos do *H. capsulatum* podem promover o desencadeamento da resposta imune. Entre estes, somente a HSP60, uma proteína de choque térmico, e o antígeno H, uma betaglicosidase, ambos componentes da histoplasmina foram avaliados como mediadores da resposta imune e potenciais moléculas-alvo para o desenvolvimento de vacinas. Ambos, tanto em sua forma nativa, bem como proteínas de fusão apresentaram papel protetor em camundongos (Gomez 1995; Deepe 1996; Deepe 2001).

Já foi observado que os anticorpos podem auxiliar na eliminação de certos processos infecciosos provocados por patógenos intracelulares (ADCC-citotoxicidade celular dependente de anticorpo) (Chandler 1969; Debons-Guillemain 1986; Deepe 2002; Winslow 2002). O papel protetor destes anticorpos pode resultar de diversos mecanismos como: inibindo ou estimulando a fagocitose; lise mediada pelo sistema complemento (via clássica); liberação de citocinas mediadas pela porção Fc do anticorpo. Na histoplasmose, não foi descrito nenhum caso de proteção contra infecção por imunização passiva com soro imune (Tewari 1977; Segal 1987), mas sim com a transferência de células T CD4+ e altos títulos de imunoglobulinas no soro de pacientes não estão diretamente correlacionado com imunidade (Chandler 1969; Deepe 1988; Reyes-Montes 1988; Allendorfer 1993; Deepe 2001). Camundongos “knock-out” para células B não apresentam uma maior sensibilidade à infecção (Allendorfer 1999), demonstrando que a resposta humoral não é fundamental no controle da histoplasmose, embora os anticorpos possam ser detectáveis na maioria das amostras de indivíduos infectados.

Estudos utilizando anticorpos monoclonais (Nosanchuk 2003), em sua maioria IgMs, contra uma histona (histone H2B) de superfície do *H. capsulatum* provaram aumentar a sobrevivência de camundongos infectados com um inóculo letal de leveduras. Quando os anticorpos foram administrados intraperitonealmente, o efeito protetor foi menor do que quando as células foram pré-incubadas com os mAbs, antes da infecção por via intranasal, pois as IgMs não tem boa penetração pulmonar. Quando as CFUs foram comparadas em cada caso, contando-se as unidades isoladas de baço, fígado e pulmão, vemos que houve também uma redução da carga fúngica infectante, sendo os resultados correlacionados com os de sobrevivência.

## RELEVÂNCIA

---

O diagnóstico da histoplasmose apresenta certas limitações, já que a identificação do fungo através de exames diretos em material biológico é praticamente inviável, e os testes sorológicos apresentam taxas relativamente altas de resultados falsos positivos e negativos, além de requererem sensibilização prévia do sistema imunológico do indivíduo e uma resposta imune adequada. Melhorias no imunodiagnóstico dependem em parte da padronização dos reagentes e sua utilização, nas diferentes técnicas descritas principalmente em relação aos antígenos empregados que normalmente são misturas complexas de moléculas, não purificadas e que podem conter no mínimo, um epítopo comum (ou proteínas de alta similaridade), freqüentemente detectado em outros gêneros fúngicos.

Ultimamente, há um grande interesse no desenvolvimento de novas técnicas para o imunodiagnóstico das micoses endêmicas tanto para a detecção de anticorpos, bem como de antígenos, tendo sido sugerido que um diagnóstico preciso talvez exija uma sobreposição de resultados positivos de ambos os métodos (Hamilton 1998).

Nos métodos diagnósticos existentes para a detecção de anticorpos na histoplasmose são empregados antígenos nativos e/ou misturas não fracionadas dos antígenos, resultando em inevitáveis problemas de reatividade cruzada, que é o principal problema no imunodiagnóstico das infecções fúngicas. Além disso, a detecção de anticorpos tem certas limitações, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, que não apresentam títulos detectáveis (Wheat 1989; Fernandez-Andreu 1996; Wheat 2003). Problemas associados com exposições anteriores aos fungos que compartilham determinantes antigênicos também acarretam resultados falso-positivos.

Objetivando-se principalmente o diagnóstico em pacientes imunocomprometidos, métodos diagnósticos para a detecção de antígenos tem sido desenvolvidos, especialmente na histoplasmose disseminada. Entretanto, estes também apresentam uma certa reatividade cruzada, além de baixa sensibilidade, especialmente em outras formas da histoplasmose.

A utilização de moléculas recombinantes específicas, como o antígeno imunodominante M, nos métodos imunológicos poderia ser uma forma de aumentar a especificidade e sensibilidade na detecção de antígenos e anticorpos (mesmo que nestes atuem de forma indireta) nas amostras de soros de pacientes com histoplasmose.



A geração de anticorpos monoclonais (mAbs) utilizando-se o antígeno recombinante M, os quais poderiam ser usados como importantes ferramentas na identificação dos determinantes antigênicos e domínios funcionais das proteínas, bem como serem aplicados em procedimentos diagnósticos, uma vez que reconhecem um único epítopo protéico, e se específico (Seco-Mediavilla 2003), distinguiriam os antígenos fúngicos que compartilham epítomos semelhantes e assim limitariam a reatividade cruzada existente nos métodos atualmente utilizados. Além disso, os anticorpos monoclonais produzidos também poderiam ser utilizados em estudos funcionais da proteína M, através da inibição de sua função. Com isso, poderia ser determinado um dos papéis do antígeno M na fisiopatogenia da histoplasmose. Estudos estruturais dos determinantes antigênicos poderiam ser realizados, uma vez que tem sido demonstrado que a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais depende da conformação do epítopo (Renukaradhya 2002). Esta dependência conformacional poderia alterar os resultados dos testes imunoenzimáticos, portanto os epítomos deveriam primeiramente ser avaliados com relação a sua estrutura primária no imunoblot até sua estrutura terciária por ELISAs. Estes anticorpos também poderiam ser utilizados para a determinação de epítomos imunodominantes na proteína M recombinante através de um mapeamento das seqüências peptídicas mais imunogênicas, e síntese de seus peptídeos correspondentes. Outro método alternativo seria a amplificação de seqüências gênicas diferentes que codificam para o antígeno M recombinante e expressão de cada seqüência e avaliação como epítopo B através dos mAbs específicos.

Testes imunoenzimáticos de vários formatos utilizando estes mAbs, poderiam ser padronizados, consistindo principalmente em ensaios de competição, captura e inibição. O primeiro seria utilizado principalmente para a detecção de anticorpos, enquanto os demais seriam aplicados como métodos para a detecção de antígenos.

Estudos prévios sobre a avaliação da reatividade da proteína M de fusão em ELISA para detecção de anticorpos em soros de pacientes com histoplasmose comprovada micologicamente, demonstraram uma sensibilidade de 88% e uma especificidade de 85% (dados não publicados), sendo estes dados correlacionados com os previamente publicados (Pine e cols. 1978; Wheat e cols. 1986). A utilização de uma reação em cadeia da polimerase com seqüências iniciadoras desenhadas a partir do gene codificante do antígeno M (Guedes e cols. 2003) sugerem que a proteína M recombinante apresenta epítopo(s) comuns, bem como epítomos específicos, demonstrando a necessidade de um mapeamento desta proteína para completa definição dos principais sítios antigênicos desta molécula. Estes conhecimentos permitirão explorar o papel funcional deste

antígeno na relação parasito-hospedeiro, bem como serão úteis no desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais acurados.

## OBJETIVO GERAL

---

Considerando que a resposta imune desencadeada pelo antígeno M poderia estar associada com a interrupção da progressão da infecção no hospedeiro, além do seu papel antigênico ter sido demonstrado anteriormente, nosso principal objetivo seria a verificação de seu papel funcional na relação fungo-hospedeiro e efeito imunoprotetor, bem como identificação, caracterização e seleção de epítomos reativos a células B presentes na proteína M que poderiam ser utilizados para a melhoria de métodos de diagnóstico. Para tanto as seguintes etapas processuais foram desenvolvidas:

- Expressão e purificação do antígeno recombinante M (rM);
- Determinação de epítomos B por algoritmos computacionais;
- Clonagem, expressão e purificação de fragmentos antigênicos gerados a partir da sequência gênica do antígeno rM;
- Produção de anticorpos monoclonais contra a proteína rM;
- Avaliação da especificidade dos anticorpos monoclonais pela técnica do *imunoblot* ou ELISA indireto;
- Avaliação da atividade do antígeno M como catalase do *Histoplasma capsulatum*;
- Desenvolvimento de imunoenaios para a detecção de antígeno e de anticorpos anti-*H. capsulatum* em espécimes clínicos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

**1- Cepas de *Histoplasma capsulatum* e amostras de soros:** Duas cepas de *H. capsulatum* foram utilizadas neste estudo. A cepa Hc CDC 6623 (ATCC 26320) foi usada na produção de antígenos e as cepas de referência utilizadas nos estudos de virulência são cadastradas na ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA – cepa Hc ATCC G217B) e pertencem a micoteca do Albert Einstein College of Medicine. As amostras de soros são provenientes da Soroteca do Serviço de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas- FIOCRUZ. Outras amostras de soros para controle das reações também foram obtidas neste órgão.

**2- Identificação, manutenção das cepas e produção de antígenos:** A caracterização das amostras de *H. capsulatum* foi realizada a partir da observação da macro e micromorfologia do cultivo fúngico crescido em meios de cultura especiais (ágar Sabouraud). Primeiramente foram observados o tipo de colônia (filamentosa ou leveduriforme), textura, coloração e produção de pigmento. A presença de hifas hialinas, microconídeos e macroconídeos tuberculados foi determinada através de microscopia óptica. Para verificação do dimorfismo característico do *H. capsulatum*, foram feitos repiques da cultura em meio de conversão (YPD - 0,5% peptona; 2% de extrato de levedura; 15g/L de glicose; 0,1% de cisteína- HCl e /ou BHI) e incubados a 37°C. O teste de exoantígenos também foi utilizado para a identificação das culturas de *H. capsulatum* (Standard e cols. 1976).

*Preparação do antígeno histoplasmina:* A histoplasmina (HMIN) foi produzida a partir da cepa *H. capsulatum* CDC 6623 (ATCC 26320) segundo metodologia descrita por Pine e colaboradores (1977) (Pine 1977). Antes do uso, a histoplasmina foi filtrada em membrana de 0,45µm, concentrada 20 vezes por ultrafiltração, e dialisada contra tampão salina fosfato (PBS), 0,01M, pH 7,2. A presença das glicoproteínas H e M na histoplasmina foi monitorada pela reação de imunodifusão dupla e através da realização do SDS-PAGE.

*Purificação da Histoplasmina (PHMIN):* Este procedimento foi o mesmo utilizado por Zancopé-Oliveira e cols (1993) (Zancopé-Oliveira e cols. 1993). A HMIN obtida foi dialisada contra tampão citrato 0,025M, pH 3,5, centrifugada e o sobrenadante foi aplicado em coluna (20 x 16cm) de CM Sepharose CL 6B, previamente equilibrada com tampão citrato 0,025M, pH 3,5. O antígeno foi eluído através de um gradiente de cloreto de sódio (NaCl), preparado a partir do

tampão citrato acrescido de 0,005, 0,5, 1M NaCl. As frações eluídas da coluna foram concentradas 10 vezes por ultrafiltração e dialisadas contra PBS. Cada amostra recebeu uma concentração final de 0,05% de timerosal. As frações foram monitoradas através de testes sorológicos para reconhecimento de sua composição (imunodifusão e immunoblot).

*Processo químico de deglicosilação com metaperiodato de sódio:* Aliquota do antígeno pHMIN foi oxidado com um igual volume de solução de metaperiodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) a 100mM por 18 horas a 4°C em câmara escura. A reação foi interrompida pela adição de quantidade equimolar de glicerol por 15 minutos a 4°C. Esta foi seguida pela adição de 100mM de borohidreto de sódio por 2 horas a 4°C. Por fim, o antígeno deglicosilado (pHMIN) foi dialisado em água destilada a 4°C por 18 horas. O material foi estocado a -20° C até o momento do uso.

*Dosagem de proteínas:* A dosagem de proteínas totais dos antígenos foi realizada segundo a técnica descrita por Bradford (1976), modificada para utilização com reagente comercial (Bio-Rad, Laboratories Richmond, CA, EUA) tendo albumina sérica bovina como padrão. Para leitura das reações foi utilizados espectrofotômetro com um filtro de 595nm de comprimento de onda.

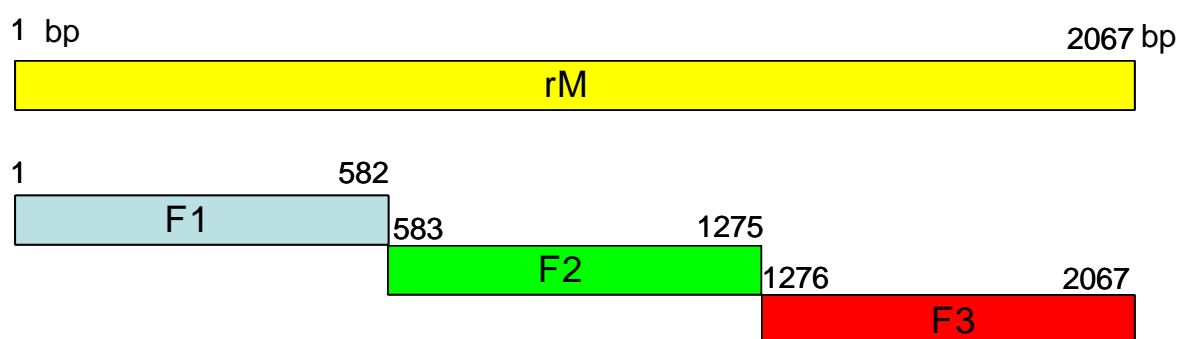
**3- Estudos de modelagem molecular e mapeamento computacional da proteína M:** O alinhamento múltiplo das seqüências polipeptídicas foi feito através do programa PILEUP (GCG versão 8.0, Wisconsin University, EUA), DNASTAR/ Meg Align (Versão 5.03) e a homologia foi determinada pelo programa FASTA, utilizando diversos bancos de dados (GenBank, EMBL, Pir-Protein, Swiss-Prot, Prosite e REBASE). A presença de seqüências com caráter antigênico foi revelada utilizando-se primeiramente algoritmos computacionais como Jamenson Wolf, SYFPEITHI, Ato-Docking e Protean Program, contidos no pacote do DNASTAR. Modelagem molecular por homologia utilizando o programa Swiss PDB Viewer foi utilizada para determinação da estrutura tridimensional e avaliação dos epítomos B na superfície desta molécula. Para determinação das propriedades físico-químicas e modificações pós-transducionais, a estrutura primária do antígeno M foi estudada pelos programas Peptidesort-GCG, ProtoParame ProtScale e entre outros, contidos no servidor [www.expasy.org](http://www.expasy.org).

**4- Expressão e purificação da proteína M recombinante:** A metodologia para esta etapa do projeto foi a mesma previamente publicada por Zancopé-Oliveira e cols. 1999 (Zancopé-Oliveira e cols. 1999), com algumas modificações. Primeiramente, o cDNA foi sintetizado e usado como amostra para a reação em cadeia da polimerase (PCR). A sequência iniciadora (“primers”) complementar à sequência codificante foi 5'-CGGAATTCAGATCTGACCCTACGGACCAG-3', e a complementar à sequência não-codificante foi 5'-ACCAAGCTTCTAGCTTCTATCCAACGGGAA-3'. O gene do antígeno M foi amplificado por PCR com estes “primers” na presença de 1,25U de *Taq* DNA polimerase (Roche), 100mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 1mM das sequências de cada “primer”, tampão de reação (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH8,3, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>). As condições foram 94°C por 45s, 55°C por 45s, e 72°C por 1min. Trinta e cinco ciclos foram realizados e o cDNA amplificado, após corrida eletroforética para determinação qualitativa e pureza (leitura em espectrofotômetro a 260/280nm). O cDNA amplificado foi digerido com *Bg/II* and *HindIII* (Gibco BRL, Grand Island, N.Y.) e ligado ao vetor de expressão pQE40 (Qiagen, Valencia, Calif.) também digerido com as mesmas enzimas. A reação de ligação foi realizada utilizando a enzima ligase (Roche Chemicals) a 4°C *overnight*. O produto foi então utilizado para transformar cepas de *E. coli* M15 (Qiagen, Valencia, Calif.). As colônias de *E. coli* foram examinadas com relação à presença do plasmídeo apropriado, utilizando reações de PCR com as sequências iniciadoras descritas acima e com as sequências Promoter region, Type III/IV e Reverse Sequence (Qiagen, Valencia, Calif.) específicos para a sequência do plasmídeo utilizado. Outra metodologia utilizada foi a análise do mapa de restrição dos clones positivos pela reação de PCR.

Após o isolamento do clone positivo, os mesmos foram crescidos em meio LB contendo ampicilina/kanamicina, até uma leitura óptica do meio 0,4 a 600nm de, e então, foi adicionado a cada cultivo, IPTG (isopropylthio-β-galactoside – Invitrogen – Carlsbad, California, USA) na concentração final de 1mM. A expressão dos fragmentos foi então induzida por 4 horas, e as células recuperadas por centrifugação e lavadas utilizando-se tampão (0,01M Tris base pH 7,2, 0,15M NaCl, 0,001M NaN<sub>3</sub>). O próximo passo foi então ressuspender o sedimento formado em um tampão de lise (5mM de imidazol, 500mM de NaCl, 20mM de Tris pH 7,9) e então a suspensão foi sonicada por 6 a 7 minutos em ciclos de 10'' no gelo. A lise celular foi então observada ao microscópio e se confirmada, a suspensão foi então centrifugada a 16300rpm por 30min. O sedimento (“pellet”) composto de partículas insolúveis foi então ressuspensão em tampão de suspensão (10mM de imidazol, 500mM de NaCl, 20mM de Tris-HCl pH 7,9, 6M uréia). O material foi centrifugado a 16300rpm por 30min e o sobrenadante coletado foi aplicado em uma coluna de Ni<sup>+2</sup>- sepharose

equilibrada com o mesmo tampão utilizado no ultimo passo de tratamento da amostra. A coluna foi lavada com 10 vezes seu volume utilizando o mesmo tampão e então os fragmentos foram eluídos da coluna com o tampão de eluição (1M de imidazol, 500mM de NaCl, 20mM de Tris-HCl pH 7,9, 6M uréia). As frações de maior concentração protéica foram determinadas ao espectofotômetro e então avaliadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

**5- Clonagem dos fragmentos do antígeno M recombinante:** O cDNA foi utilizado como amostra para a amplificação dos fragmentos do antígeno M recombinante assim determinados:



Para isto, utilizamos o seguinte “set” de seqüências iniciadoras demonstrados na Tabela 1:

**Tabela 1.** Seqüências iniciadoras utilizadas na amplificação na obtenção dos fragmentos de rM

Fragmentos	“primers”	Seqüências nucleotídicas
F1	cDNAF	5’GACCCTACGGACCAG 3’
	F1R	5’ GCCCAGAAGAGGGCATCGAATG 3’
F2	F2F	5’ATGTCAGGACATGGAAT CCCTC 3’
	F2R	5’ACGCCAGGTGCGGTGAAGAAT 3’
F3	F3F	5’ ATGGTAAATGGACCACTAGTGC 3’
	cDNAR	5’ TTAGCTTCTATCCTTCGGGAA 3’

Os fragmentos foram amplificados por PCR com estes “primers” na presença de 200ng de DNA genômico, 1,25U de *Taq* DNA polimerase (Roche), 100mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 1mM dos “primers”, tampão de reação (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH8,3, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>). As condições foram 94°C por 45s, 55°C por 45s, e 72°C por 1min. Trinta e cinco ciclos foram realizados.

Os fragmentos amplificados foram então digeridos com as enzimas de restrição *Hind*III e *Bam*HI, e separados em gel de agarose. As bandas de interesse foram obtidas de gel empregando o kit de extração de gel (Qiagen, Valencia, Calif.), dosados em espectrofotômetro a 260/280nm, e ligados ao vetor de expressão pQE40 (Qiagen, Valencia, Calif.) utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente. Cada plasmídeo contendo os fragmentos de interesse foi clonado em cepas de *E.coli* M15 (Qiagen, Valencia, Calif.). As colônias de *E. coli* foram examinadas com relação à presença do plasmídeo apropriado, utilizando reações de PCR com os “primers” anteriormente descritos na Tabela 1 e com os “primers” Promoter region, Type III/IV e Reverse Sequence (Qiagen, Valencia, Calif.) específicos para a seqüência do plasmídeo utilizado. Outra metodologia utilizada foi a análise do mapa de restrição dos clones positivos na reação de PCR (utilizando as enzimas *Hind*III e *Bam*HI). Então, após a obtenção destes clones, os plasmídeos foram seqüenciados para a confirmação da seqüência clonada.

Os clones obtidos contendo a seqüência de cada fragmento isoladamente foram expandidos, e os fragmentos extraídos e purificados pela metodologia descrita anteriormente para a obtenção da proteína M recombinante (ver Item 4 dos MATERIAIS E MÉTODOS).

**6- Produção de anticorpos monoclonais (mAbs):** Camundongos BALBc ( $n=4$ ), fêmeas, com 8 semanas de vida, foram previamente testados para a presença de imunoglobulinas no soro contra a proteína M recombinante. Após resultado negativo, eles foram imunizados primariamente com 20 $\mu$ g de antígeno M recombinante em adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich). Após 15 dias da primeira imunização, os camundongos foram imunizados novamente, com a mesma quantidade de antígeno, mas preparado com adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich). Após 15 dias, os camundongos foram sangrados no globo ocular. A seleção do camundongo que seria o doador do baço para realização da fusão foi feita através de uma reação de ELISA utilizando-se duas concentrações diferentes do antígeno recombinante M (1 e 0,1 $\mu$ g/poço) e os soros dos animais previamente imunizados para detecção da presença de anticorpos contra a proteína M recombinante e então, foram sacrificados. O baço do camundongo 3, o qual apresentou maior nível de anticorpos



anti-rM, foi retirado, macerado, e a suspensão celular lavada com HBSS (Hank's Balanced Salt Saline – 0,137M NaCl, 5,4mM KCl, 0,25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3mM CaCl<sub>2</sub>, 1,0mM MgSO<sub>4</sub>, 4,2mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,2). As células esplênicas foram contadas em Câmara de Newbaur, onde foi obtido  $1 \times 10^8$  células. Para fusão, foi respeitado o índice de  $1 \times 10^8$  células esplênicas para  $1,2 \times 10^7$  células de linhagem mielóide SP2/0. Estas células foram fusionadas utilizando-se polietilenoglicol. Cabe salientar que as células mielóides, bem como os macrófagos utilizados como “feeders” foram previamente pré-cultivados conforme metodologia rotineiramente usada para a produção de monoclonais. Os hibridomas assim formados foram selecionados em meio HAT 1X (hipoxantina, aminopterina e timidina), onde somente as células com fenótipo HGPRT+/ imortais sobreviveriam. Então, foi realizada contagem das células em meio HAT, feita a técnica de diluição limitante a fim de se relizar o plaqueamento de um único clone em um poço da placa de 96 poços para cultura de células (Nunc-Immuno Starwell, Cloning), e então, após o crescimento, o sobrenadante foi testado para a presença de anticorpos monoclonais contra a proteína M recombinante. Este é um protocolo padrão em laboratórios de diagnóstico para a produção de anticorpos monoclonais (Hamilton e cols. 1990).

**7- Isotipagem dos mAbs :** Os anticorpos monoclonais obtidos no item anterior foram classificados pelo método de ELISA indireto utilizando o *Isotyping Kit Enzyme Immunoassay* (Boehring Mannheim, Germany), de acordo com o protocolo determinado pelo fabricante. Foi utilizado também para determinação das classes de imunoglobulina a metodologia descrita por Casadevall e colaboradores (Casadevall e cols. 1992).

**8- Avaliação da especificidade dos mAbs:** Para este propósito, foi utilizado imunoblot com diversos antígenos fúngicos, entre os quais o antígeno M recombinante (AgMr), antígeno citoplasmático de levedura (*H. capsulatum* CYA), histoplasmina purificada e tratada com metaperiodato de sódio (ptHMIN), *P. brasiliensis* CYA, filtrado de cultura de *P. brasiliensis*- Pb(f), *S. schenkii* CYA, *B. dermatitides* CYA. Os antígenos foram dissociados a 100°C por 10 min em tampão 0.125 M Tris-HCl Buffer (pH 6.8) contendo 2% dodecil sulfato de sódio (SDS), 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol e 0,025% azul de bromofenol. Eletroforese em gel de poliacrilamida com diferentes concentrações no gel de empacotamento e de resolução (4 e 10% , respectivamente) foi conduzida em uma célula eletroforética (Mini-Protean II, Bio-Rad Laboratories, Richmond California) a 10mA para o gel de empacotamento e 20mA para o gel de resolução. O conteúdo dos géis foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose em uma Mini Transfer-Blot Cell (Bio-

Rad) contendo tampão de transferência com 25mM Tris-HCl, 192mM glicina e metanol (20% vol/vol, pH 8,3) e operada a 400mA por 1h. As membranas foram então, bloqueadas com 5% leite desnatado em 20mM Tris-HCl (pH5,8), 500mM NaCl, 0,2% Tween (TTBS). Os mAbs foram incubados com cada antígeno por 1h a 37°C. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com conjugado anti-imunoglobulina de camundongo marcado com fosfatase alcalina. As reações foram posteriormente reveladas pela adição do substrato (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato [BCIP 15mg/mL em dimetilformamida] e nitroblue tetrazolium [NBT; 30mg/mL em 70% DMF aquoso]) diluída em tampão Tris/NaCl [100mM Tris-HCl (pH9,5), 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>]). As reatividades foram então avaliadas com relação a presença das bandas em cada amostra antigênica/ anticorpo primário utilizado.

**9- Mapeamento de epítomos B:** O painel de mAbs produzido foi utilizado no mapeamento de regiões no antígeno M recombinante carreando epítomos B usando mutantes/ fragmentos (não-sobrepostos) deste antígeno recombinante que foram expressos em *E. coli* M15. As regiões do antígeno recombinante expressas e purificadas foram utilizadas em imunoenaios para avaliação da presença de epítomos descontínuos (sequência linear – primária) nesta proteína reconhecidos pelos mAbs na reação de imunoblot, como protocolo descrito anteriormente.

**10- Imunolocalização do antígeno M na levedura do *H. capsulatum*:** Foram realizadas, duas técnicas utilizando os anticorpos monoclonais contra a proteína M recombinante:

*Imunofluorescência (Método em tubo):* Primeiramente, foi realizado o crescimento das leveduras do *H. capsulatum* em meio de cultura HAM F-12, entre 3 e 5 dias a 37°C, com agitação a 150rpm. Após este crescimento, as leveduras foram centrifugadas a 2.000rpm por 10min e as células sedimentadas foram lavadas três vezes com PBS e centrifugadas nas mesmas condições. O número de leveduras/mL foi então determinado por contagem em câmara de Neubauer e uma alíquota contendo  $5 \times 10^6$  organismos foi transferida para um tubo de microcentrífuga tipo eppendorf, e então centrifugado novamente para a remoção do excesso de líquido. A seguir, o sedimento foi ressuspenso em 100µl de uma solução dos anticorpos monoclonais em tampão de bloqueio (BSA 5% 5m tampão PBS) na concentração de 100 µg/ml e incubados por 1h a 37°C. Em seguida, os “pellets” foram lavados três vezes com PBS e ressuspenso em 100µl de uma solução do conjugado anti-IgG de camundongo/FITC diluído de 1:100 em tampão de bloqueio e incubados por 1h a 37°C. Novas lavagens das células foram realizadas 3X com PBS e ressuspenso em 50 µl da solução de

montagem, composta de 50%PBS/50%glicerol e 0.01M de *N*-propil galato. As preparações foram examinadas em microscópio de fluorescência utilizando um filtro de 495nm, apropriado para o fluorocromo utilizado, em aumento de 100X.

*Detecção do antígeno M na fração parede celular/membrana:* Um extrato de parede celular foi produzido através da metodologia descrita por Gomez e cols. em 1991 (Gomez e cols. 1991). Primeiramente, as células foram cultivadas em meio HAM-F12 contendo cisteína (8,4ug/ml), N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido tanesulfônico (6g/litro), ácido glutâmico (1g/litro), e glicose (18,2g/litro) e foram crescidas a 37°C em agitador orbital por 48h. As leveduras foram recuperadas e mortas por incubação em PBS (pH 7,2), contendo timerosal (1:10.000, wt/vol) à temperatura ambiente por 1h. Estas células foram lavadas em PBS contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 5µM de leupeptina, e 5X10<sup>-4</sup> M de EDTA a uma concentração de 1 volume de células para 1 volume de tampão. As células foram rompidas em “beadbeater” (Biospec Products, Bartlesville, Okla.) a temperatura ambiente por 6min. O homogenato foi centrifugado a 450xg por 5min, e o sobrenadante e os sedimentos foram recuperados. O sobrenadante foi centrifugado a 11.000g por 20min a 4°C e decantado. Os sedimentos foram então reunidos e lavados três vezes com PBS. O material particulado foi fervido em 125mM Tris (pH 6,9) contendo 6M de uréia, 20mM 2-mercaptoetanol, e 1% Tween 20 (vol/vol) e então incubado “overnight” a 4°C. O material solúvel foi separado por centrifugação a 11.000g por 20min e dialisado contra PBS por 36h. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford.

O extrato foi então submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, como descrito anteriormente, e transferido para uma membrana de nitrocelulose para realização de imunoblot. Como anticorpo primário, foram utilizados os monoclonais contra o antígeno M recombinante (8H2/6F12) e como controle positivo os monoclonais contra a HSP-60 e histona (H2B) de *H. capsulatum*.

**11- Atividade catalítica em diferentes frações celulares:** Para confirmar a presença de catalase na superfície do *H. capsulatum*, a atividade de catalase foi avaliada através do kit *Catalase Assay* (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) nas seguintes frações obtidas durante o crescimento do *H. capsulatum*: 1 - sobrenadante, 2 - células intactas, 3 – células permeabilizadas com acetona, 4 – células rompidas, 5 – células rompidas mais sobrenadante, 6 – sobrenadante após centrifugação (células rompidas), 7 - sobrenadante após centrifugação (células rompidas + sobrenadante). Para geração destas frações, primeiramente 10<sup>6</sup> leveduras foram inoculadas em 100mL de meio HAM-

F12 e diariamente, alíquotas de 1mL foram retiradas durante o crescimento (24, 48, 72, 96, 120, 144 h) e contadas em câmara de Neubauer para determinação da concentração celular. Para obtenção do sobrenadante, cada alíquota de um determinado intervalo de tempo foi centrifugada por 10min a 3.500rpm e então os sobrenadantes foram separados dos sedimentos celulares e ambos foram guardados. A atividade de catalase total foi avaliada nos tubos contendo sobrenadante + células rompidas. A geração das frações células intactas e rompidas foram provenientes do sedimento obtido previamente. O rompimento celular foi executado em “bead beater” em cinco ciclos de 1min com intervalos de 1min em gelo. As células rompidas foi centrifugada por 10 min a 11.000 rpm para gerar a fração denominada “sobrenadante após rompimento”.

## **12- Ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos:**

*Elisa Indireto:* Esta técnica foi realizada de acordo com metodologia descrita (Kostiala e cols. 1981; Guimarães e cols. 2004). Antígenos histoplasmina purificada e tratada (ptHMIN) ou somente purificada (pHMIN) foram adicionados (1µg/well) a placas de 96 poços (Nunc-Immuno Starwell, MaxiSorp Surface) diluídos em 100µL de tampão carbonato (63mM; pH 9,6) e incubados por 1h a 37°C e “overnight” a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com tampão de lavagem (10mM PBS, 0,1% Tween 20, pH 7,3) e bloqueadas com 200µL de tampão de bloqueio (tampão de lavagem contendo 5% de leite desnatado) por 2h a 37°C. As placas foram lavadas novamente 3X com tampão de lavagem e as amostras de soro foram adicionadas a cada poço em uma diluição de 1:1.000 em 100µL de tampão de bloqueio. As placas foram então incubadas novamente por 1h a 37°C. Após três lavagens adicionais com o mesmo tampão, as placas foram incubadas com anti-imunoglobulina G humana conjugada com peroxidase (Jackson Immunoresearch; peroxidase-conjugated affini-pure goat anti-human IgG, Fc fragment specific) na diluição de 1:16.000 em tampão de bloqueio, por 1h a 37°C. Após três lavagens subsequentes, a reação foi revelada com 100µL por poço de dihidroclorato de o-fenilenodiamina [OPD; 0,4 mg/ml em 0,04%(w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] diluído em 0,01M de tampão citrato de sódio, pH 5,5. A reação foi interrompida pela adição de 50µL de HCl 3M. As densidades ópticas (ODs) foram então determinadas empregando um leitor de ELISA (Bio-Rad model 550) a 490nm. O ponto de corte (cut-off point) para a reatividade dos soros a pHMIN e ptHMIN foi determinado utilizando a média das ODs somada de três vezes o desvio padrão (SD) dos valores de log dos indivíduos controle sadios. As amostras de soros com valores de ODs acima do “cut-off” foram consideradas positivas.

**13. Ensaio imunoenzimático para a detecção de antígenos:** Os anticorpos monoclonais também foram utilizados na padronização de métodos diagnósticos para a detecção de antígenos.

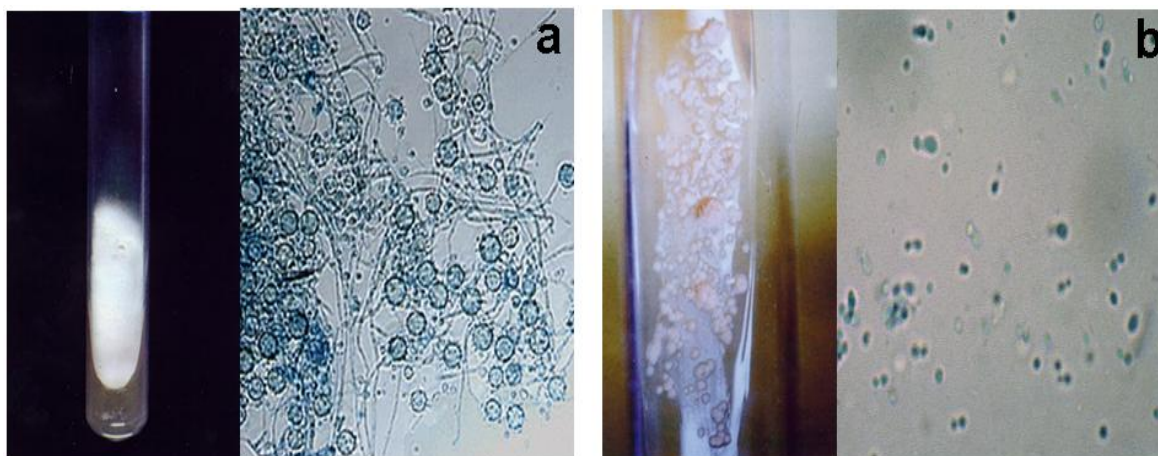
*Elisa de captura:* No método de captura, as imunoglobulinas de soro de coelho previamente imunizado com a proteína M recombinante foram adsorvidas à placa de ELISA e então, se adicionou o antígeno M recombinante e o anticorpo monoclonal em diferentes concentrações.

Após a determinação da melhor concentração de anticorpo primário (de captura)/secundário, procedemos então a realização do teste. Neste protocolo, primariamente 100µL de soro de coelho na diluição de 1:1.000 em tampão carbonato (63mM; pH 9,6) foram adicionados a placas de 96 poços (Nunc-Immuno Starwell, MaxiSorp Surface) e incubados a 37°C por 1h e “overnight” a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (10mM PBS, 0,1% Tween 20, pH 7,3) e bloqueadas com 200µL de tampão de bloqueio (tampão de lavagem contendo 5% de “skin-milk”) por 2h a 37°C. As placas foram então lavadas novamente 3X com tampão de lavagem e então o antígeno M recombinante foi adicionado em diferentes concentrações com o objetivo de construirmos uma curva padrão absorvância/concentração de antígeno. As amostras de soro de diferentes pacientes de histoplasmose confirmada micologicamente (cultura +) foram também adicionadas com o objetivo de serem comparadas com uma curva padrão. Após 1h de incubação a 37°C, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e então 100µL do mAb 8H2 diluído de 1:100 em tampão de bloqueio foram adicionado aos poços. Após 3 lavagens consecutivas, 100µL de anti-imunoglobulina G de camundongo conjugado com fosfatase alcalina diluído de 1:2.000 em tampão de bloqueio foram adicionados e incubado por 1h a 37°C. Após três lavagens subseqüentes, as placas novamente incubadas com o substrato pNPP (p-Nitrophenyl Phosphate), a reação parada com 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1 N e as placas lidas a 405nm em um leitor de ELISA (Bio-Rad model 550). O ponto de corte (cut-off point) para a reatividade dos soros foi contruído utilizando a media das ODs somada de três vezes o desvio padrão (SD) dos valores de log dos soros de indivíduos controle sadios. As amostras de soro com valores de OD acima do “cut-off” foram consideradas positivas.

## RESULTADOS

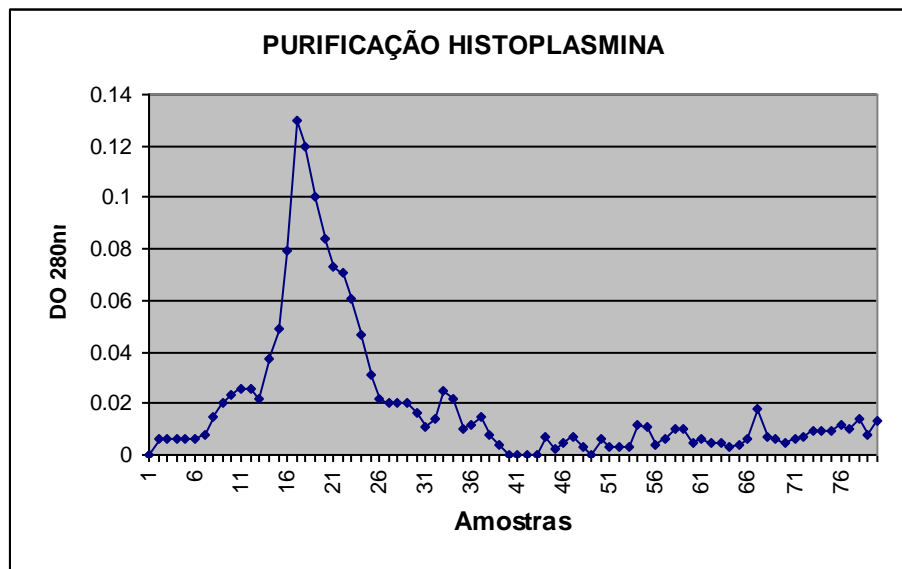
---

**1. Identificação do *H. capsulatum*:** As cepas de *H. capsulatum* após serem recebidas e cadastradas no Setor de Imunodiagnóstico, Serviço de Micologia, Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, foram primeiramente identificadas por exame direto. Em crescimento a 25°C, na microscopia foram observadas a presença de microconídeos e macroconídeos tuberculados, e a presença de hifas hialinas septadas (Figura 1a - painel direito). Macroscopicamente, as culturas apresentavam um aspecto algodoado, com a coloração variando de branco a castanho (Fig 1a – painel esquerdo). Após a confirmação da fase filamentosa, foi feito um repique para o meio Ágar infusão cérebro-coração (BHI) acrescido de cisteína, e incubados a 35-37°C. Então, obtivemos colônias glabras, lisas, branco-amareladas (Figura 1b – painel esquerdo), apresentando, à microscopia, leveduras ovais, unibrotantes, de morfologia uniforme (Figura 1b – painel direito).



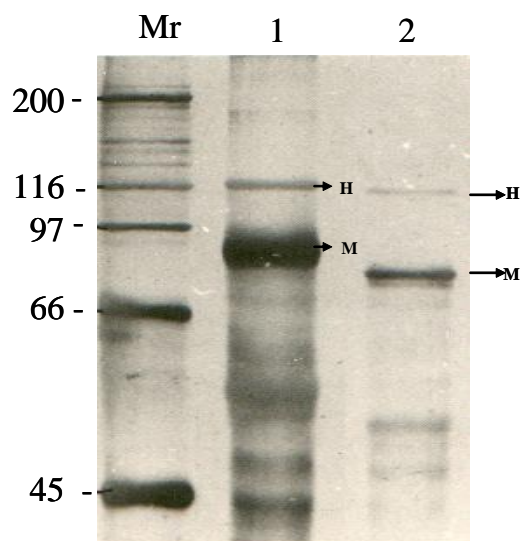
**Figura 1:** *Histoplasma capsulatum*: a) forma filamentosa (cultura e microscopia); b) forma leveduriformea 37°C (cultura e microscopia respectivamente). Aumento 40X

**2. Produção de antígenos:** A histoplasmina foi purificada e as frações coletadas e lidas no espectrofotômetro a 280nm. O cromatograma é apresentado na Figura 2, contendo as frações de maior densidade óptica que foram então reunidas no mesmo tubo.



**Figura 2:** Cromatograma da purificação do antígeno histoplasmina

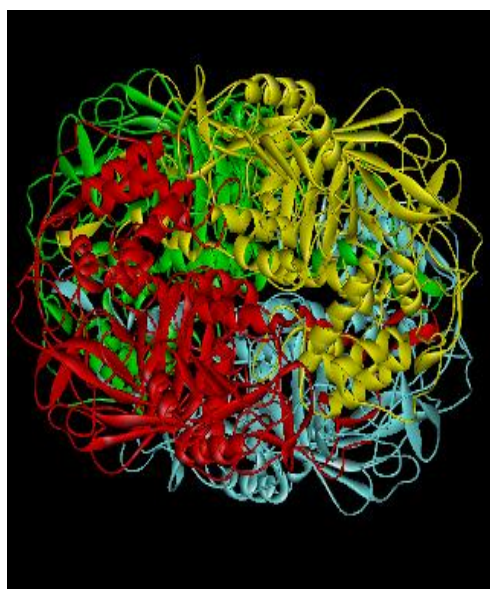
A análise por SDS-PAGE da histoplasmina purificada e (pHMIN), e histoplasmina purificada e tratada (ptHMIN) a serem utilizadas nas ELISAS é mostrada na Figura 3. O antígeno não-tratado contém glicoproteínas de 94 (M antígeno) e 116 (H antígeno) kDa. Estas massas moleculares são reduzidas para 88 e 114 kDa, respectivamente, após tratamento com metaperiodato.



**Figura 3.** SDS-PAGE. 1. Histoplasmina purificada (pHMIN), 2. Histoplasmina purificada e tratada (pHMIN). Números a esquerda correspondem ao padrão de peso molecular.

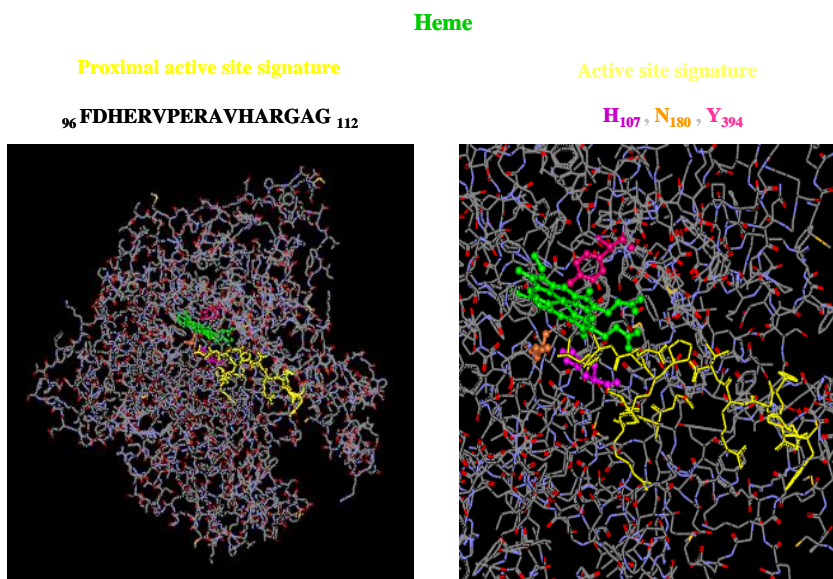
**3. Modelagem molecular e mapeamento computacional do antígeno M:** As catalases são oxiredutases envolvidas no mecanismo molecular de defesas dos microorganismos contra os reativos intermediários do oxigênio (RIO). Com isso, em um primeiro momento o antígeno M foi comparado com outras catalases, principalmente da família *CATB*, onde se observou 78% de homologia com catalases do *Aspergillus niger*. Estes resultados nos permitiram desenvolver um modelo molecular do antígeno M através do Programa Swiss PDB View ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). As catalases podem se apresentar em solução tanto como dímeros e/ou tetrâmeros. Na Figura 3, o antígeno M na sua forma hipotética de tetrâmero apresenta as 4 estruturas distintas de uma catalase: *N*-terminal (azul), domínio em forma de barril (vermelho), domínio de ligação (amarelo) e domínio helicoidal (verde).





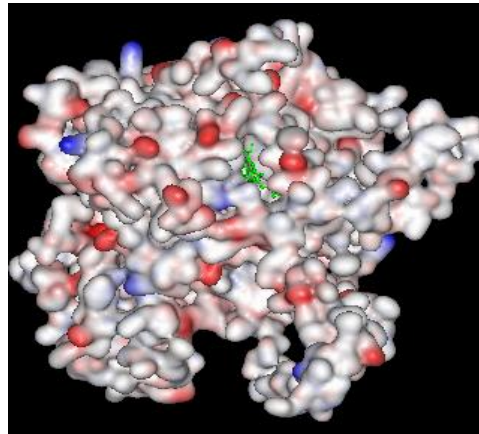
**Figura 4.** Modelo hipotético do antígeno M como um tetrâmero.

Outro modelo computacional foi gerado para o antígeno M recombinante, no qual o grupamento heme foi adicionado por docking (Fig. 5). Funcionalmente, catalases apresentam alguns resíduos conservados na área adjacente ao ligante de heme como histidina, asparagina e isoleucina. Na proteína M histidina se encontra na posição 107, asparagina na posição 180 e fenilalanina na posição 394.



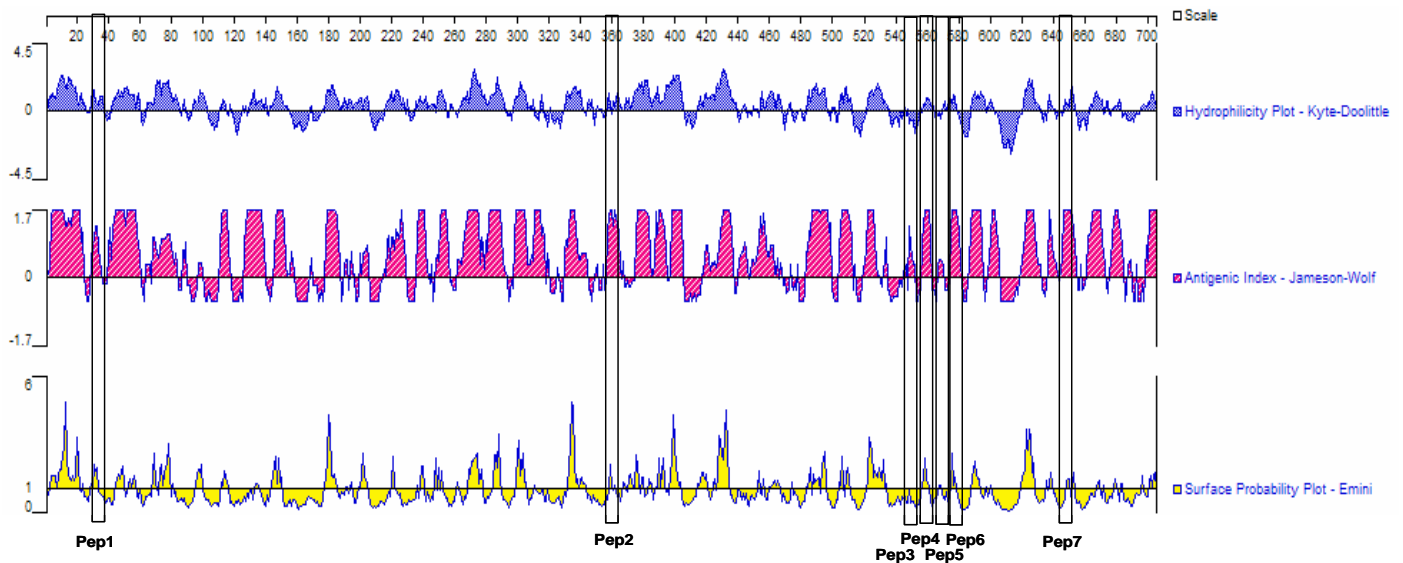
**Figura 5.** Modelo computacional do antígeno M demonstrando o sítio de assinatura de catalases e a inserção do grupamento Heme .

Outra evidência foi a determinação de um importante sítio proximal de assinatura de catalases ( $_{96}$ FDHERVPERAVHARGAG $_{112}$ ) e a observação da fenda catalítica onde o grupamento heme se encaixaria perfeitamente é mais outra evidência computacional que a proteína M poderia ser uma catalase (Fig. 6).



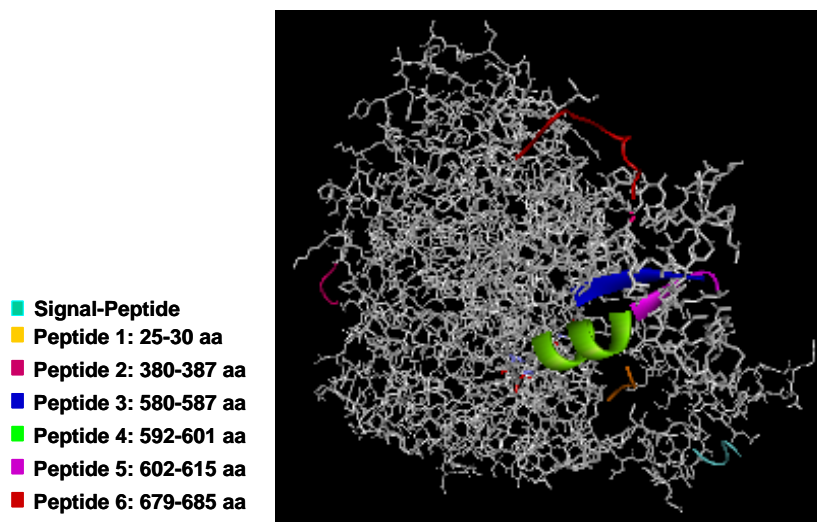
**Figura 6.** Modelo computacional do antígeno M demonstrando a fenda catalítica com inserção do grupamento Heme.

Os resultados obtidos pelo alinhamento das seqüências do antígeno M com o de outras catalases demonstraram uma baixa homologia existente entre elas, principalmente com catalases humanas. Para a determinação dos epítomos B, utilizamos o programa DNA star, através do uso do algoritmo Jameson-Wolf, no qual nos fornece informações sobre os índices antigênicos (tal programa prediz determinantes antigênicos potenciais por combinar métodos existentes para predileção estrutural de proteínas). Combinando-se o índice de hidrofobicidade (Algoritmo de Kyte-Doolittle) e a probabilidade de superfície, pode-se determinar as seqüências que poderiam estar localizadas na superfície, e tendo um alto valor de índice antigênico, poderiam ser epítomos B em potencial.



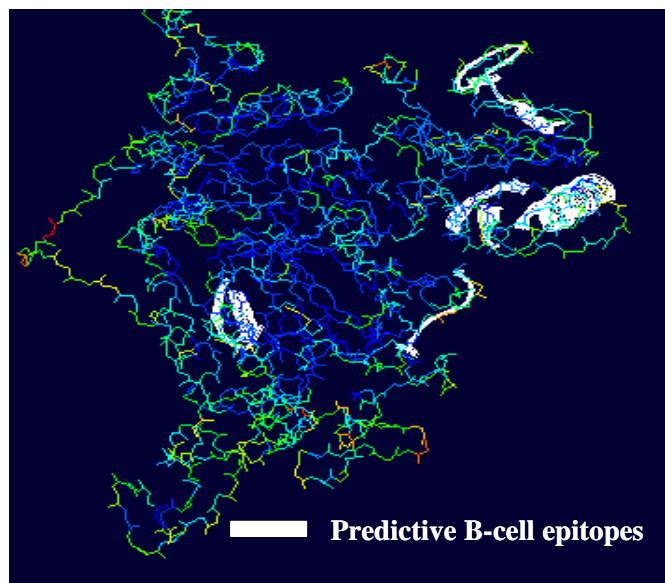
**Figura 7:** Probabilidade de superfície (algoritmo Plot-Emini) e índice antigênico (algoritmo Jameson-Wolf).

De acordo com os dois algoritmos apresentados, observamos a presença de sete prováveis regiões antigênicas distribuídas na proteína, que apresentaram os maiores índices antigênicos. Estas estão localizadas na superfície, sendo que um destes sítios corresponde aos primeiros 40 aminoácidos da porção N-terminal, podendo, portanto, ser um peptídeo sinal. No modelo desenhado para a proteína M, por homologia com outras catalases, teríamos sete regiões antigênicas principais como descritas na figura 8 (e também rachuradas na figura 7):



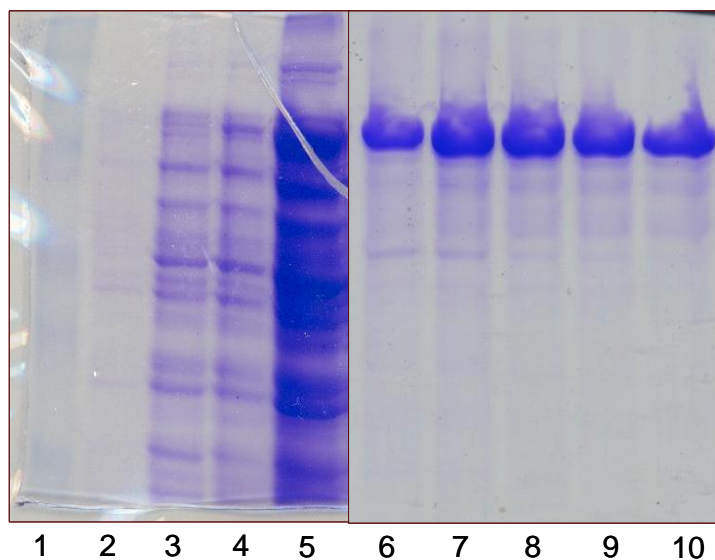
**Figura 8:** Regiões antigênicas distribuídas na proteína M.

Destes sete sítios descritos, somente seis foram analisados como seqüências imunologicamente importantes pelo uso de programas de livre acesso, como os da plataforma ExPASy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org) – SYFPEITH), onde a análise de hidrofobicidade, índice antigênico, e posicionamento na superfície da molécula sugeriram que as regiões estudadas são possíveis epítomos B (Fig. 9).



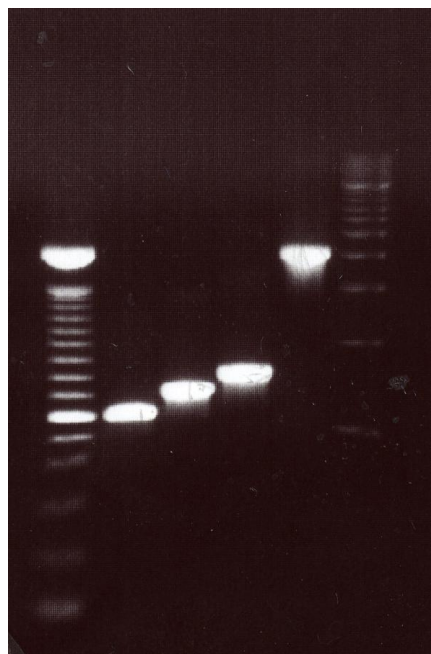
**Figura 9:** Localização dos epítomos B na proteína M (acessibilidade e superfície)

**4. Expressão e purificação da proteína M recombinante:** O antígeno M recombinante foi purificado, as frações obtidas foram coletadas e lidas em espectrofotômetro e avaliadas por SDS-PAGE.



**Figura 10.** A proteína M recombinante foi analisada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 10%. Linha 1 - Peso Molecular (Invitrogen); linha 2 - cultura antes da indução com IPTG; linha 3 – 1h pós indução com IPTG; linha 4- 4h após indução com IPTG; linha 5 – sobrenadante antes da purificação; linhas 6 a 10- proteína M recombinante purificada.

**5. Clonagem, expressão e purificação dos fragmentos do antígeno M recombinante:** Na figura 11 são demonstrados os produtos de amplificação gerados após PCR do cDNA do gene codificador da proteína M com os “primers” previamente desenhados (Tabela 1).



**1 2 3 4 5 6**

**Figura 11:** Resultado de PCR após amplificação utilizando os primers determinados pelo programa DNASTar.

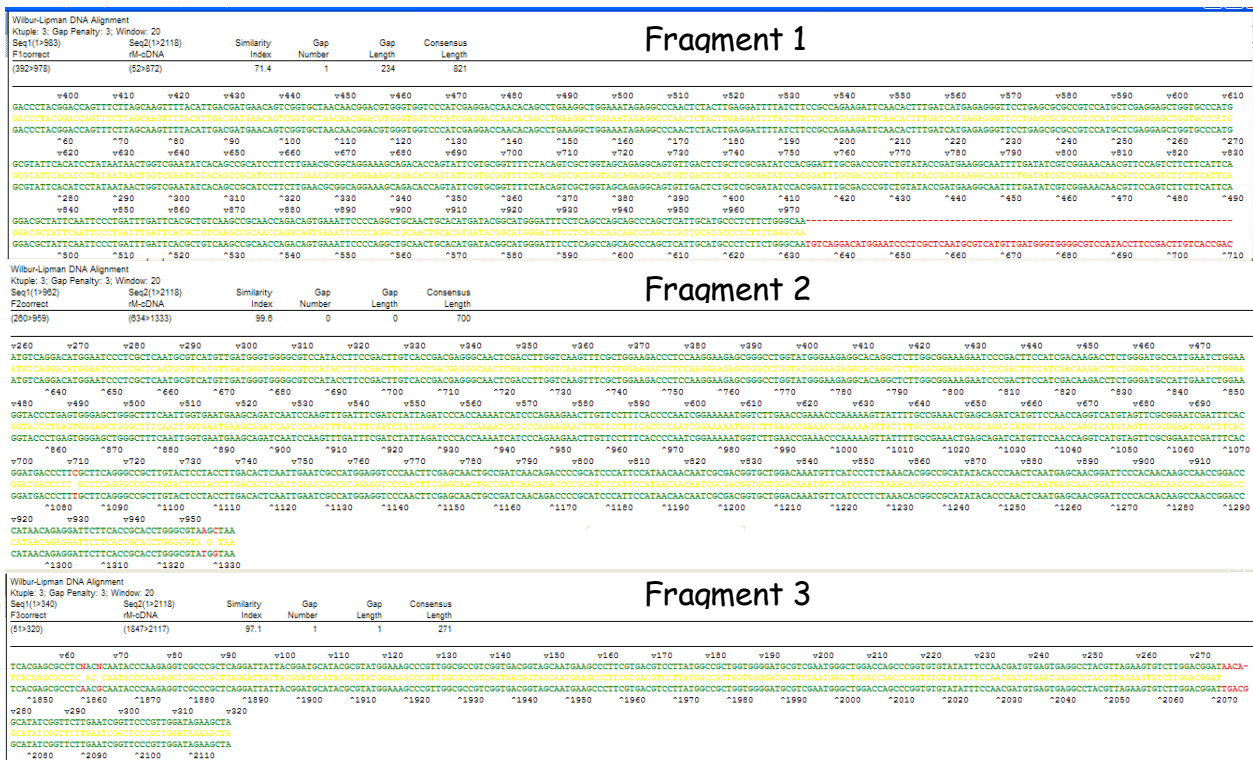
Legenda:

- 1- MWM (Ladder 100)
- 2- F1 (582bp)
- 3- F2 (693bp)
- 4- F3 (792bp)
- 5- rM (2067bp)
- 6- MWM (Ladder 500)

Subsequente digestão foi realizada com as enzimas *Hind*III e *Bgl*II (dados não mostrados) e clonagem em vetor pQE40.

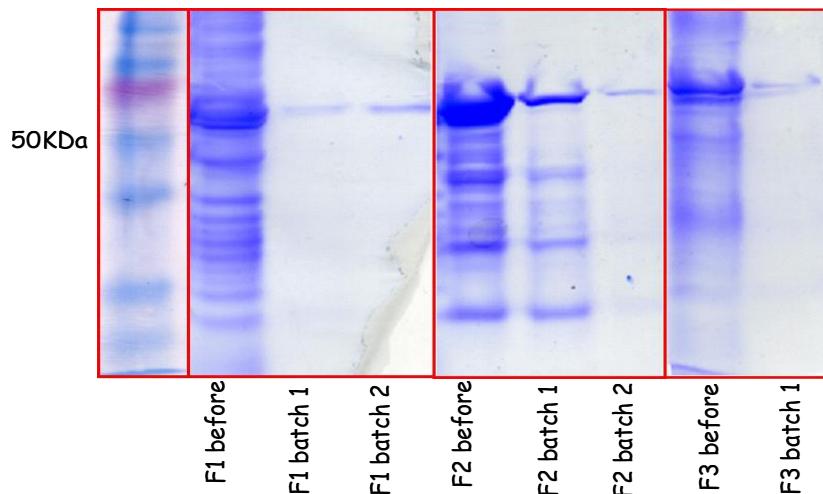
Após clonagem e transformação em *E.coli*, as bactérias foram crescidas em meio LB com Ampicilina/Kanamicina, e triadas por PCR de colônia para avaliação da presença do plasmídeo e positividade das colônias (dado não disponível). Após este procedimento, uma colônia fortemente positiva na reação de PCR com cada fragmento foi crescida em meio LB, e o plasmídeo extraído para seqüenciamento e comparação com a seqüencia nucleotídica do gene codificador do antígeno M recombinante. O seqüenciamento foi feito com os primers Type III/IV e Promoter Region, os quais seqüenciavam parte do vetor e uma região de 300Kb do gene inserido no plasmídeo, para a avaliação da clonagem do gene na posição correta (Figura 12).





**Figura 12:** Alinhamento das seqüências clonadas e seqüenciadas (Fragmentos F1, F2, F3) com a seqüência do gene codificante do antígeno M.

Após a triagem correta dos clones positivos, as bactérias foram crescidas e expressão dos fragmentos induzida com IPTG. Como o plasmídeo pQE-40 confere uma cauda de histidina a proteína de fusão formada, então, após extração, obtivemos um alto grau de purificação de cada fragmento, após realização de cromatografia de afinidade Ni<sup>2+</sup> – Histidina. Na figura 13, podemos observar o rendimento e alto grau de funcionalidade desta metodologia.

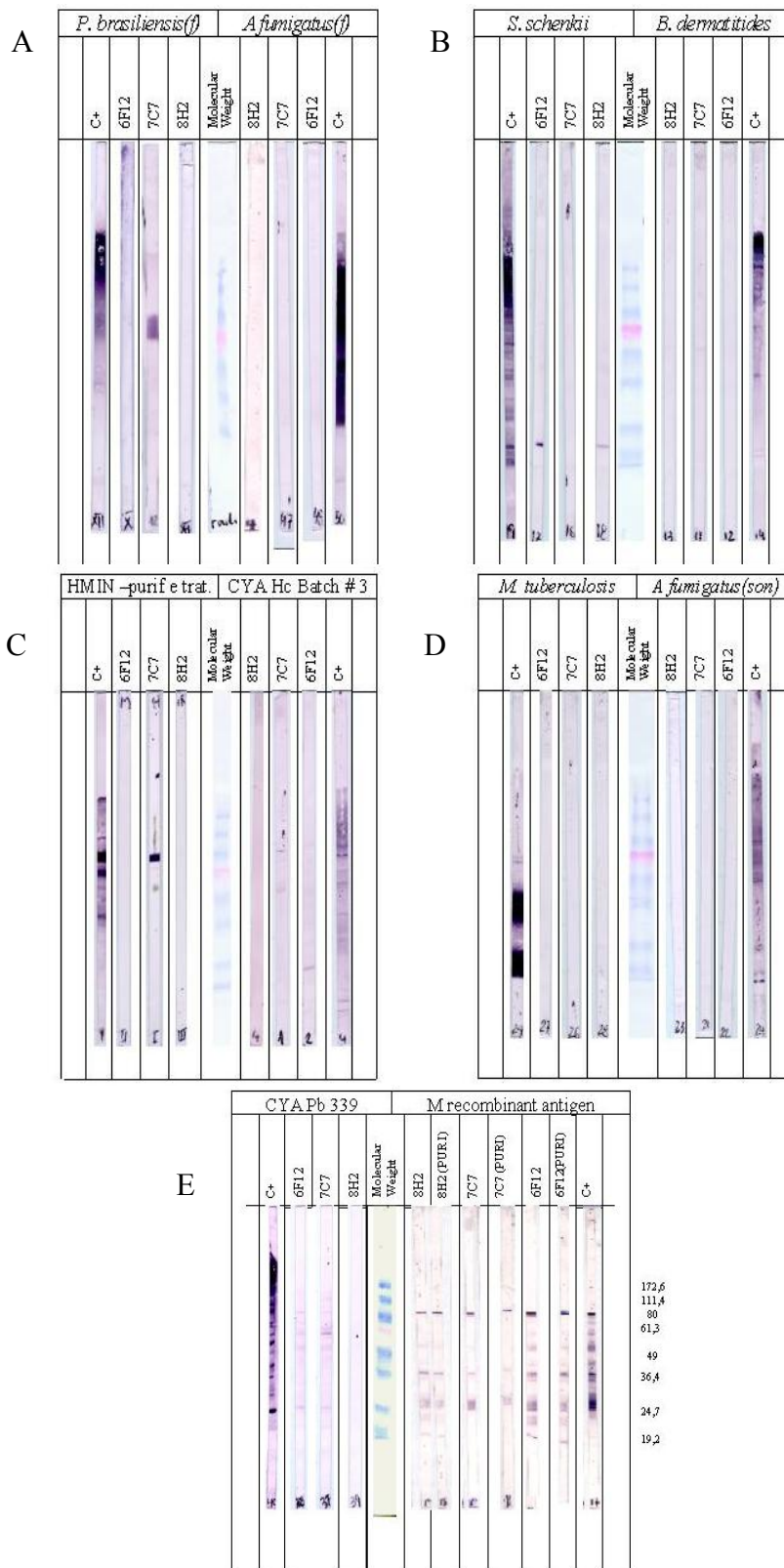


**Figura 13:** Purificação dos fragmentos gerados a serem usados no mapeamento do antígeno M recombinante. *Before* – extrato de *E. coli* antes da purificação/ *Batch 1* e *2* – diferentes purificações.

**6. Obtenção dos anticorpos monoclonais (mAbs):** Foi obtido um painel de anticorpos monoclonais composto de 5 IgM, 4 IgG1 e 3 IgG2a. Os mAbs mais reativos frente ao antígeno M recombinante foram isotipados e as classes de imunoglobulinas determinadas segundo metodologia descrita por Casadevall e colaboradores (Casadevall e cols. 1992).

			<b>7H11</b>
			<b>7C3</b>
	<b>5H10</b>	<b>IgG1</b>	<b>10D5</b>
	<b>3A11</b>		<b>8B6</b>
<b>IgM</b>	<b>10G10</b>		
	<b>5E11</b>		<b>3H2</b>
	<b>7C7</b>	<b>IgG2a</b>	<b>8H2</b>
			<b>6F12</b>

**7. Especificidade dos monoclonais obtidos:** Os monoclonais foram testados primeiramente com o antígeno M recombinante. Depois de observada a reatividade por imunoblot, os que obtiveram maior intensidade de reação foram selecionados e testados contra as outras preparações antigênicas provenientes de outros microorganismos para avaliação da especificidade. Os mAbs 6F12, 8H2 e 7C7 reagiram fortemente com o antígeno M recombinante, sendo o 8H2 o mais específico, uma vez que não reconheceu nenhuma proteína nos extratos antigênicos de *P. brasiliensis*, *A. fumigatus*, *S. schenkii*, *B. dermatitides* e *M. tuberculosis* (Figura 14). Já o mAb 6F12 reagiu com um proteína de 60kDa quando testado com antígeno de *S. schenkii* (Figura 14 – Painel B) e o mAb 7C7 reagiu inespecificamente com ambos os antígenos CYA e filtrados de cultura de *P. brasiliensis* (Figura 12, Paineis A e C).



**Figura 14** – Determinação da reatividade cruzada frente a diferentes preparações antigênicas. Ag Mr-antígeno M recombinante de *Histoplasma capsulatum*, CYA Hc-antígeno de *Histoplasma capsulatum* fase leveduriforme (sonicado), pHMIN-antígeno histoplasmina purificado e tratado com periodato, Pb339 CYA - antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis* fase leveduriforme (sonicado), Pb (f)- antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis* (filtrado), Ss-antígeno citoplasmático de *Sporothrix schenki*, Bd-antígeno leveduriforme de *Blastomices dermatitidis*.



O perfil de reatividade dos monoclonais acima discriminados foi determinado com relação as bandas aparentes após desenvolvimento do imunoblot e os seus respectivos pesos moleculares determinados (Tabela 2):

**Tabela 2:** Retividade dos monoclonais selecionados e testados frente a diferentes preparações antigênicas.

ANTÍGENO	ANTICORPOS MONOCLONAIS		
	8H2	7C7	6F12
Ag rM	100,80,60,50,40,35,30,25- 24,22-20kDa	100,80,35,25,24kDa	100,80,60,50,40,35,30,25- 24,22-20kDa
Hc CYA	X	80, 50kDa	100,90,70,61,25kDa
pHMIN	X	100,80kDa	X
Pb339 CYA	X	90,80,70,61,52- 50,20kDa	61,55,50,40,20kDa
Pb(f)	X	80-60kDa	X
Ss	X	X	60,20kDa
Bd	X	50kDa	X

Ag Mr-antígeno M recombinante de *Histoplasma capsulatum*

CYA Hc-antígeno de *Histoplasma capsulatum* fase leveduriforme (sonicado)

pHMIN-antígeno histoplasmina purificado e tratado com periodato

Pb339 CYA - antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis* fase leveduriforme (sonicado)

Pb (f)- antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis* (filtrado)

Ss-antígeno citoplasmático de *Sporothrix schenckii*

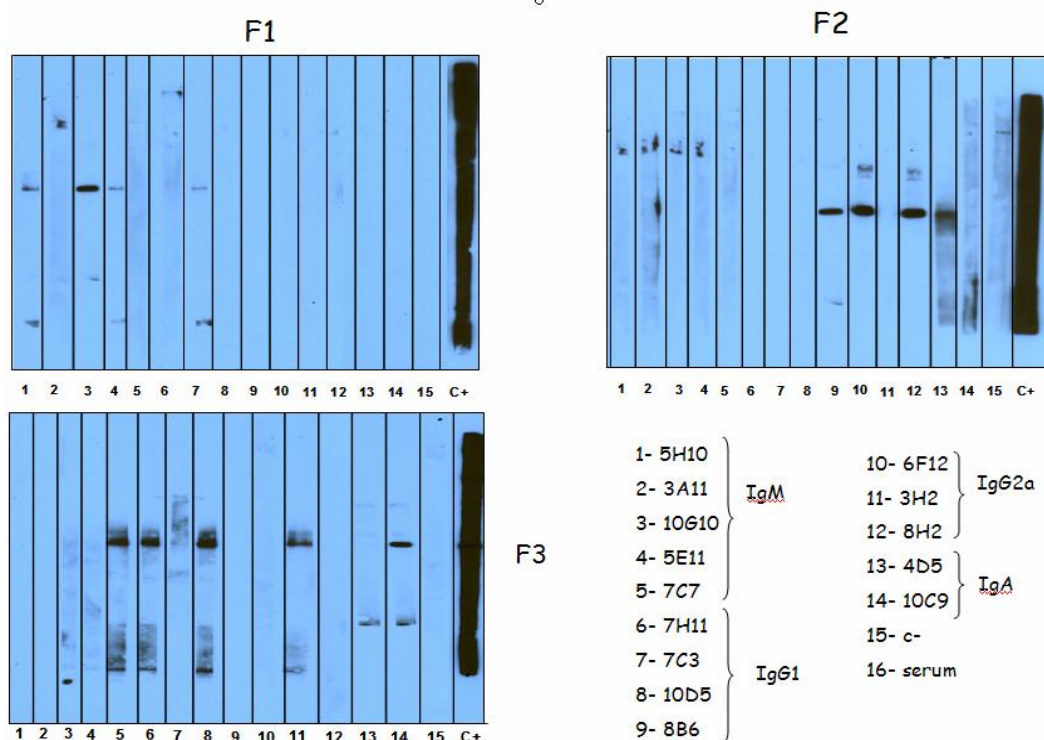
Bd-antígeno leveduriforme de *Blastomices dermatitides*

**8. Isotipagem dos mAbs avaliados quanto a especificidade:** Na tabela 3, são demonstrados os resultados da isotipagem, subclasse de imunoglobulinas e tipos de cadeia leve:

**Tabela 3:** Isotipagem dos monoclonais utilizando o *Isotyping Kit Enzyme Immunoassay* (Boehring Mannheim, Germany).

Anticorpos monoclonais	Imunoglobulina	Cadeia
8H2	IgG2a	K
7C7	IgM	K
6F12	IgG2a	K

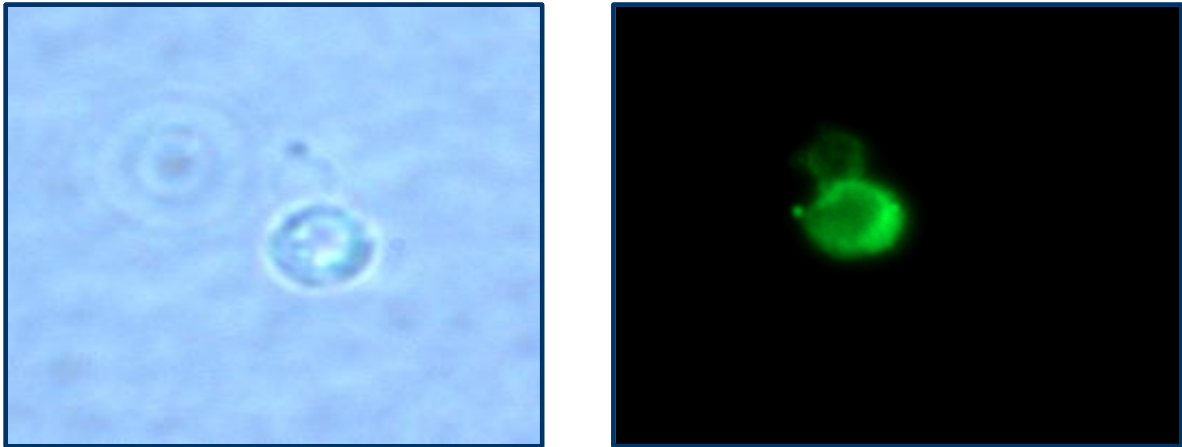
**9. Mapeamento de epítomos B do antígeno M recombinante:** Após purificação, cada fragmento do antígeno M (denominados F1, F2 e F3), foi corrido eletroforéticamente e transferido para uma membrana de nitrocelulose nas condições descritas anteriormente. Em seguida, incubou-se cada fragmento com o painel de monoclonais contra a proteína M. O F1 reagiu fracamente com os mAbs 5H10, 5E11 e 7C7, e fortemente com o mAb 10G10, todos pertencentes a subclasse de imunoglobulinas IgM. Monoclonais da classe IgG1 (8B6) e IgG2a (6F12 e 8H2) e uma IgA (4D5) reconheceram fortemente o F2. O F3 foi reconhecido por mAbs pertencentes a todas as subclasses de imunoglobulinas (Figura 15).



**Figura 15:** Reatividade dos anticorpos monoclonais frente aos fragmentos utilizados pelo imunoblot.

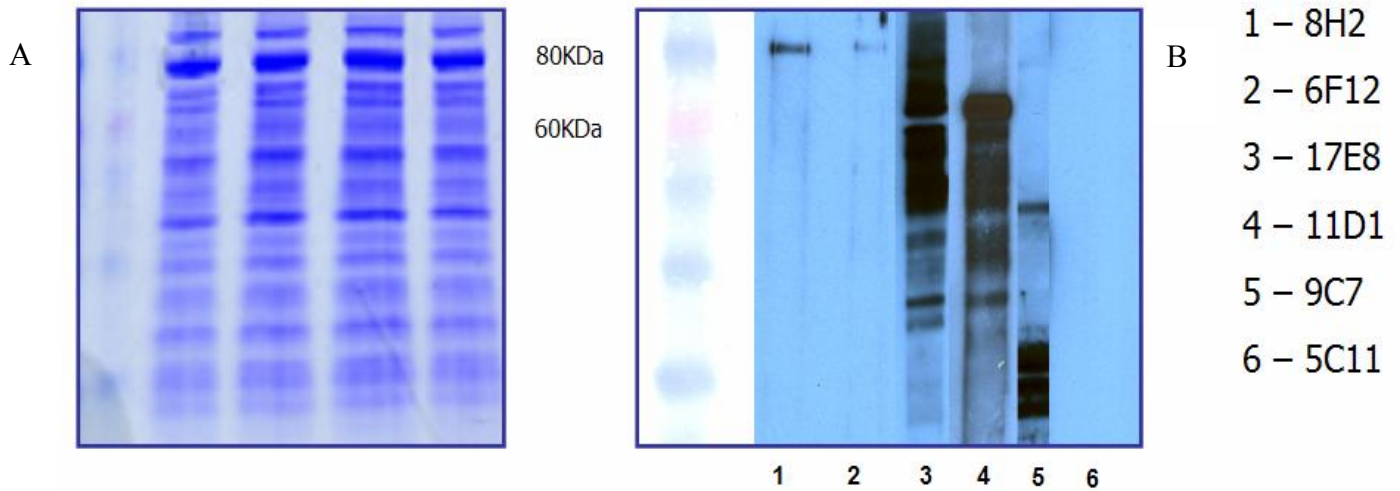
## 10. Imunolocalização do antígeno M recombinante do *H. capsulatum*:

*Imunofluorescência:* Utilizando o monoclonal 8H2, foi possível detectar a presença do antígeno M na superfície da levedura do *H. capsulatum*. O monoclonal foi capaz de se ligar à célula uniformemente, sem nenhum ponto específico, como locais de brotamento ou mesmo o acúmulo de vesículas em um determinado local único na parede celular/membrana (Figura 16).



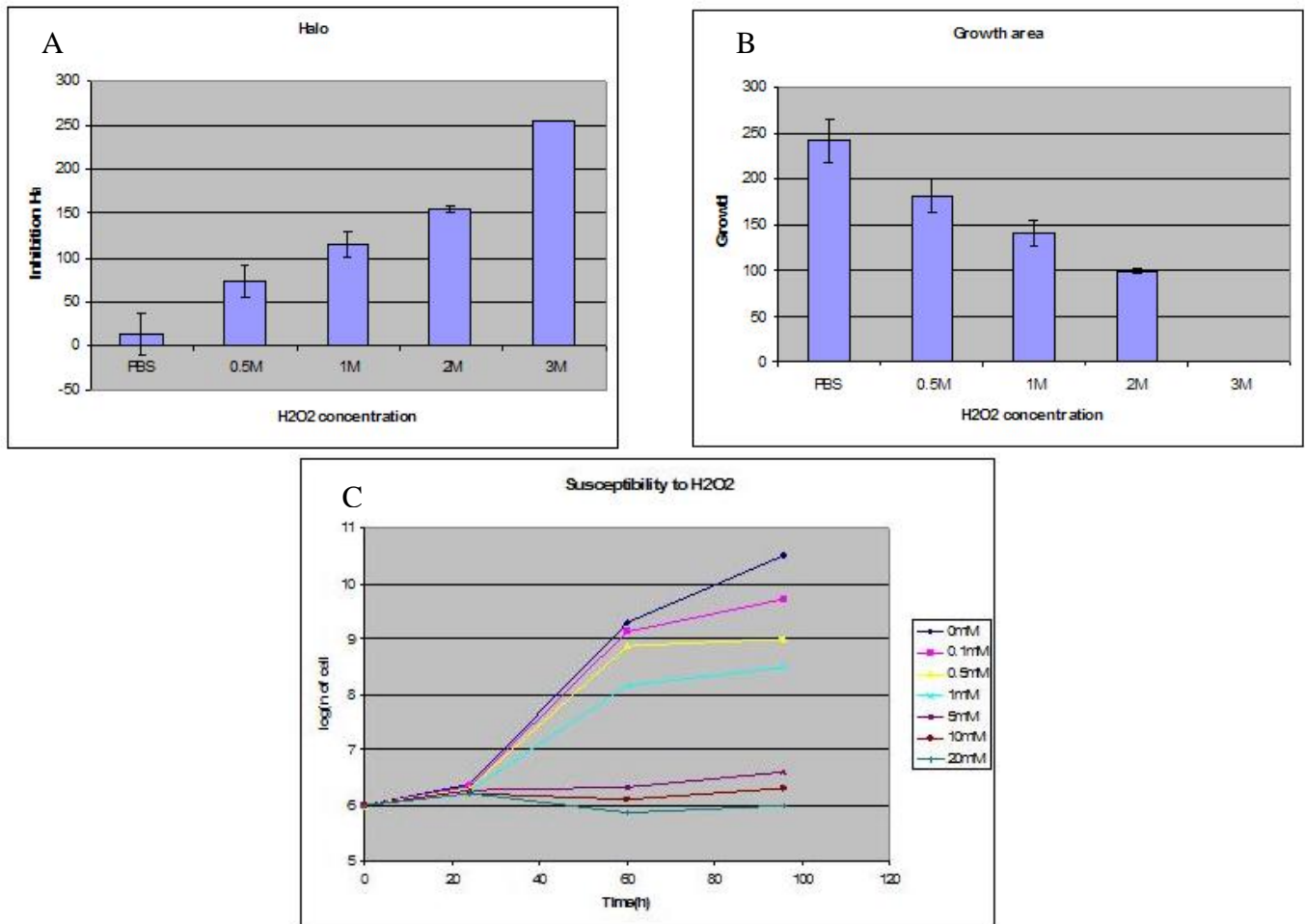
**Figura 16:** Imunofluorescência utilizando anticorpos anti-rM, determinando presença de catalase na superfície do *H. capsulatum*.

*Detecção do antígeno M na fração parede celular/membrana:* Utilizando os monoclonais 8H2 e 6F12 (contra proteína M recombinante) pudemos detectar a presença do antígeno M na fração parede celular/membrana, confirmando que esta proteína pode ter uma ação local na proteção das estruturas fúngicas contra o “stress” oxidativo provocado pelos reativos intermediários do oxigênio (Figura 17).



**Figura 17:** Demonstração indireta do antígeno M na fração parede celular/membrana. Painel A – SDS-PAGE do antígeno utilizado. Painel B – Linhas 1 e 2 – Anticorpos monoclonais contra o antígeno M recombinante; 3 e 4 – Anticorpos monoclonais contra a HSP-60; 5 – Anticorpos monoclonais contra a H2B; 6 – Imunoglobulina irrelevante (os monoclonais contra os antígenos HSP-60 e H2B foram utilizados como controle positivo nesta reação).

**11. Atividade catalítica em diferentes frações celulares:** A importância da atividade de catalase na levedura do *H. capsulatum*, foi inicialmente, verificada através da incubação das leveduras com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), com o intuito de se avaliar qual seria a concentração limite em que o fungo conseguiria crescer, tanto em meio líquido quanto em sólido, comparando com o controle negativo onde  $H_2O_2$  não foi adicionado. *H. capsulatum* é suscetível a  $H_2O_2$ , dependente da concentração, podendo sobreviver em baixas concentrações (0,1 a 1 mM) (Fig.18). Estes resultados nos sugerem que a atividade de catalase é induzida em presença de peróxido de hidrogênio. Entretanto, as leveduras permanecem viáveis em concentrações menores que 5mM.



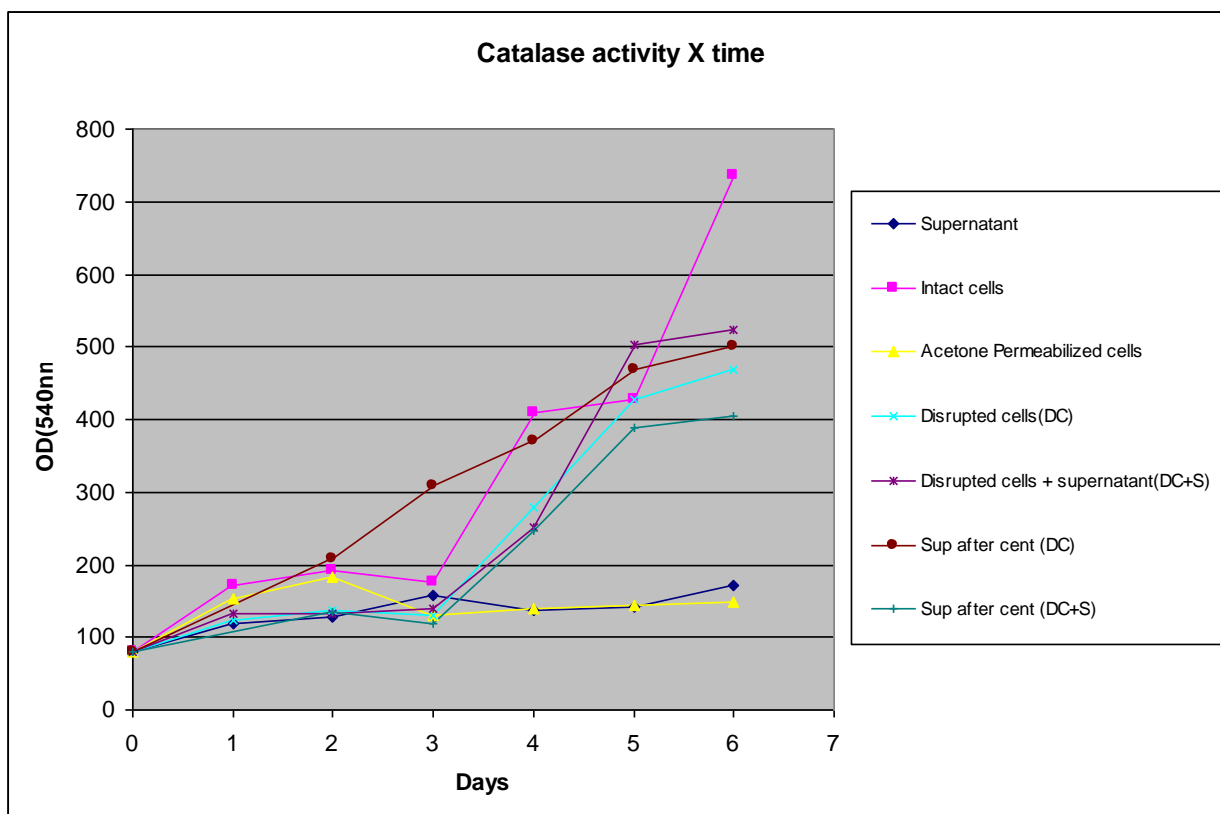
**Figura 18.** Efeito do peróxido de hidrogênio na sobrevivência do *H. capsulatum*.

Gráfico A: Halo de inibição de crescimento (concentração de  $H_2O_2$  X inibição do crescimento)

Gráfico B: Área de crescimento (concentração de  $H_2O_2$  X área de crescimento)

Gráfico C: Susceptibilidade ao peróxido de hidrogênio (tempo X logaritmo do número de células)

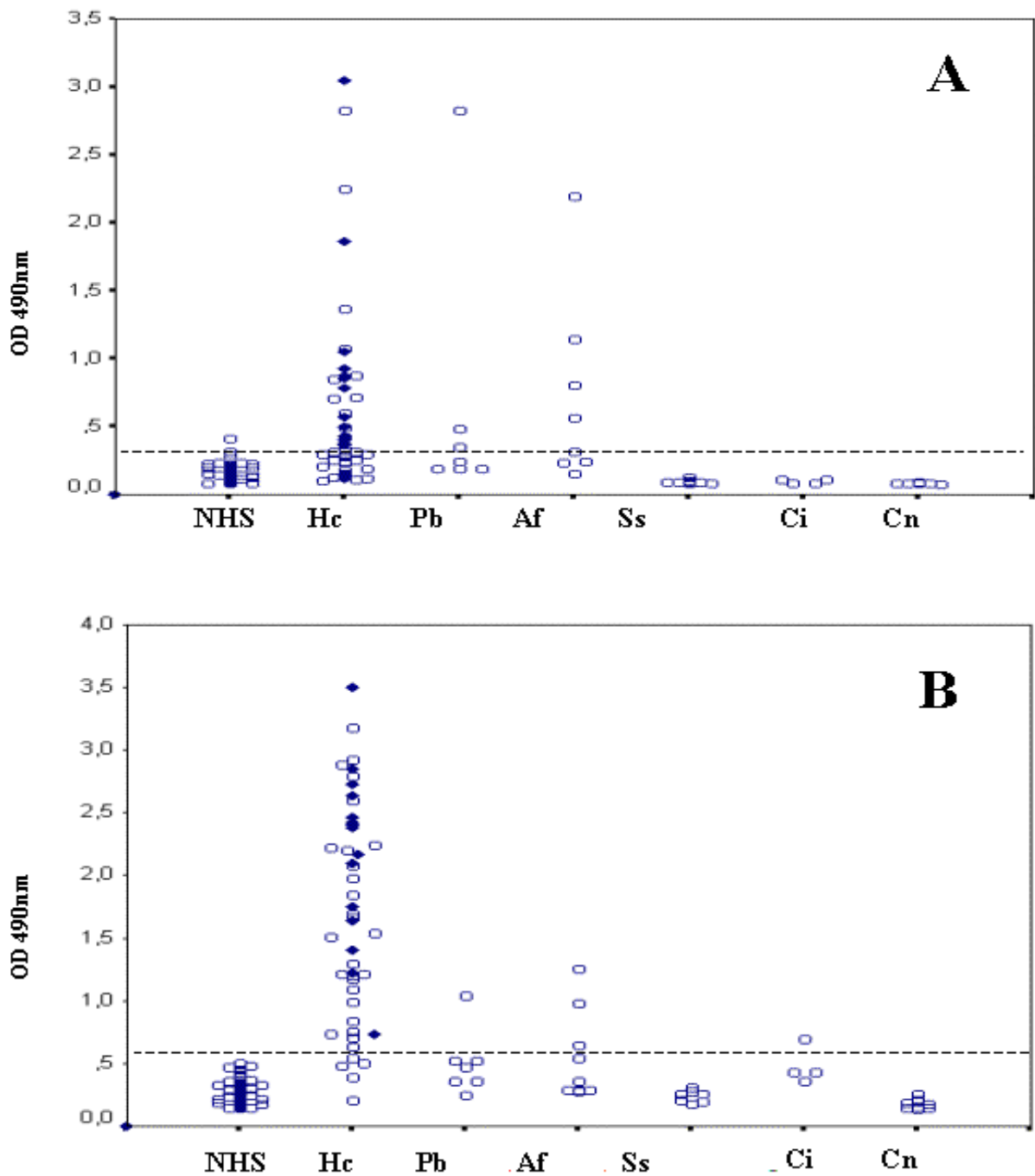
A atividade de catalase, quando determinada em diferentes frações celulares para a avaliação da principal localização da enzima na levedura do *H. capsulatum*, foi principalmente observado em células intactas, sendo uma atividade equivalente do extrato total de levedura + sobrenadante, sugerindo novamente que as catalases na levedura estão localizadas principalmente na superfície celular, favorecendo a hipótese que seu papel funcional esteja relacionado com a proteção local de estruturas fúngicas contra os reativos intermediários do oxigênio durante o processo de fagocitose.



**Figura 19:** Atividade de catalase nas diferentes frações celulares durante o crescimento do *H. capsulatum*. *Supernatant* - sobrenadante, *Intact cells* - células intactas, *Acetone permeabilized cells* – células permeabilizadas com acetona, *Disrupted cells (DC)* – células rompidas, *Disrupted cells + supernatant (DC + S)* – células rompidas mais sobrenadante, *Sup after centrifugation (DC)* – sobrenadante após centrifugação (células rompidas), *Sup after centrifugation (DC + S)* - sobrenadante após centrifugação (células rompidas + sobrenadante)

**12. Ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos:** Os resultados encontrados no teste de Elisa utilizando os antígenos pHMIN e ptHMIN estão ilustrados na Figura 20 e Tabelas 4 e 5. O presente estudo comparou o uso dos dois antígenos em uma rápida metodologia de ELISA. Amostra de soros de 50 pacientes com histoplasmose e 122 pacientes não-histoplasmose (35 soros heterólogos e 87 soros de indivíduos saudáveis) foram testados para a detecção de anticorpos, como mostrado na figura 20. Os pontos de “cut-off” dos ELISAs foram estabelecidos como a média das absorvâncias somada de três vezes o desvio padrão obtido para os soros de indivíduos saudáveis. Então, amostras com valores de absorvância maiores que 0.32 e 0.52 (quando pHMIN e ptHMIN foram usadas, respectivamente) foram consideradas positivas. Anticorpos anti-HMIN foram detectados em 57% dos soros dos pacientes com histoplasmose quando o antígeno pHMIN

foi usado no teste. Entretanto quando ptHMIN foi utilizada no teste de ELISA, esta sensibilidade foi aumentada para 92% ( $p < 0,001$ ). Apesar de não ser observada diferença estatisticamente significativa na especificidade do imunoensaio, houve uma diferença estatisticamente significativa na sensibilidade ( $p < 0,001$ ). Este teste se mostrou satisfatório como método de detecção de anticorpos anti-histoplasmina utilizando-se ptHMIN uma vez que apresentou uma sensibilidade de 92% e uma especificidade de 96%. O método descrito apresentou boa reprodutibilidade, visto que as ODs observadas entre testes feitos separadamente apresentaram-se muito próximas. Segue abaixo o gráfico da análise dos resultados das densidades óticas obtidas neste teste (Figura 20).



**Figura 20:** Detecção de anticorpos em soros de pacientes com histoplasmose, outras micoses comprovadas e de indivíduos sadios pela ELISA utilizando histoplasmina glicosilada (A) e deglicosilada (B).  $\circ$  amostra individual.  $\blacklozenge$  pacientes com histoplasmose comprovada (cultura positiva). As linhas horizontais pontilhadas mostram os pontos de “cut-off”. Hc, Histoplasmose; Pb, paracoccidiodomicose; Af, aspergilose; Ss, esporotricose; Ci, coccidiodomicose; Cn, criptococose; NHS, indivíduos sadios.



**Tabela 4.** Comparação dos testes de ELISA com histoplasmina glicosilada e deglicosilada para detecção de anticorpos.

	pHMIN <sup>a</sup> (%)	ptHMIN <sup>b</sup> (%)	$\chi^2$	P
Sensibilidade <sup>c</sup>	57 (43.1-70.9)	92 (84.4-100)	15.5	0.00008
Especificidade <sup>d</sup>	93 (88.4-97.6)	96 (92.5-99.5)	0.73	0.40
Eficiência	83 (88.4-97.6)	95 (91.7-98.3)	13.4	0.00025
PPV	78 (66.7-93.3)	90 (93.5-100)	0.97	0.32
NPV	84 (77.3-88.7)	95 (91.7-98.3)	1.37	0.24

<sup>a</sup> Histoplasmina purificada

<sup>b</sup> Histoplasmina purificada e tratada com NaOH<sub>4</sub>

<sup>c</sup> Sensibilidade= Proporção de amostras positivas corretamente identificadas pelo teste

<sup>d</sup> Especificidade= Proporção de amostras negativas corretamente identificadas pelo teste

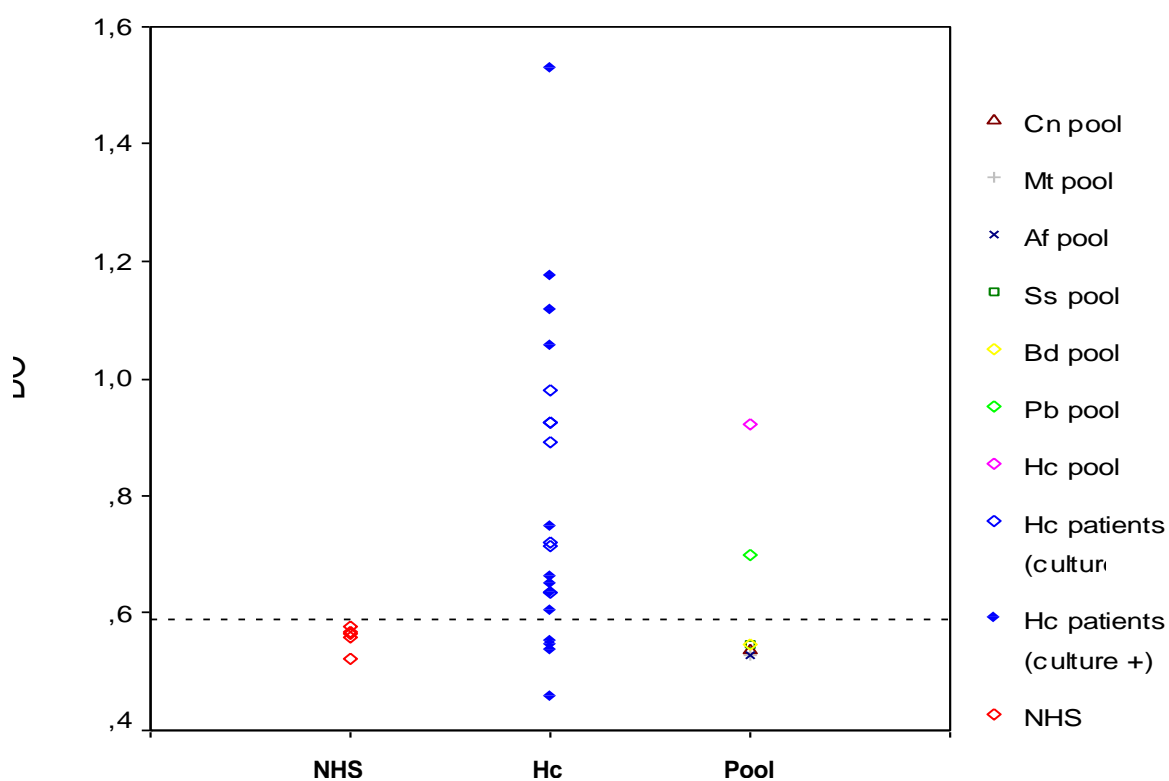
**Tabela 5.** Parâmetros de validade da ELISA usando histoplasmina glicosilada e deglicosilada

Amostras ( <i>n</i> )	No. de pacientes positivos na ELISA/nº total of controles (%)	
	PHMIN <sup>a</sup>	PtHMIN <sup>b</sup>
Histoplasmose (50)	28/50 (68)	46/50 (92)
Paracoccidiodomicose (7)	3/35 (9)	1/35 (3)
Aspergilose (8)	4/35 (11)	3/35 (9)
Esporotricose (8)	0/35 (0)	0/35 (0)
Coccidiodomicose (4)	0/35 (0)	1/35 (3)
Criptococcosis (8)	0/35 (0)	0/35 (0)
Indivíduos saudáveis (87)	1/87 (1.2)	0/87 (0)

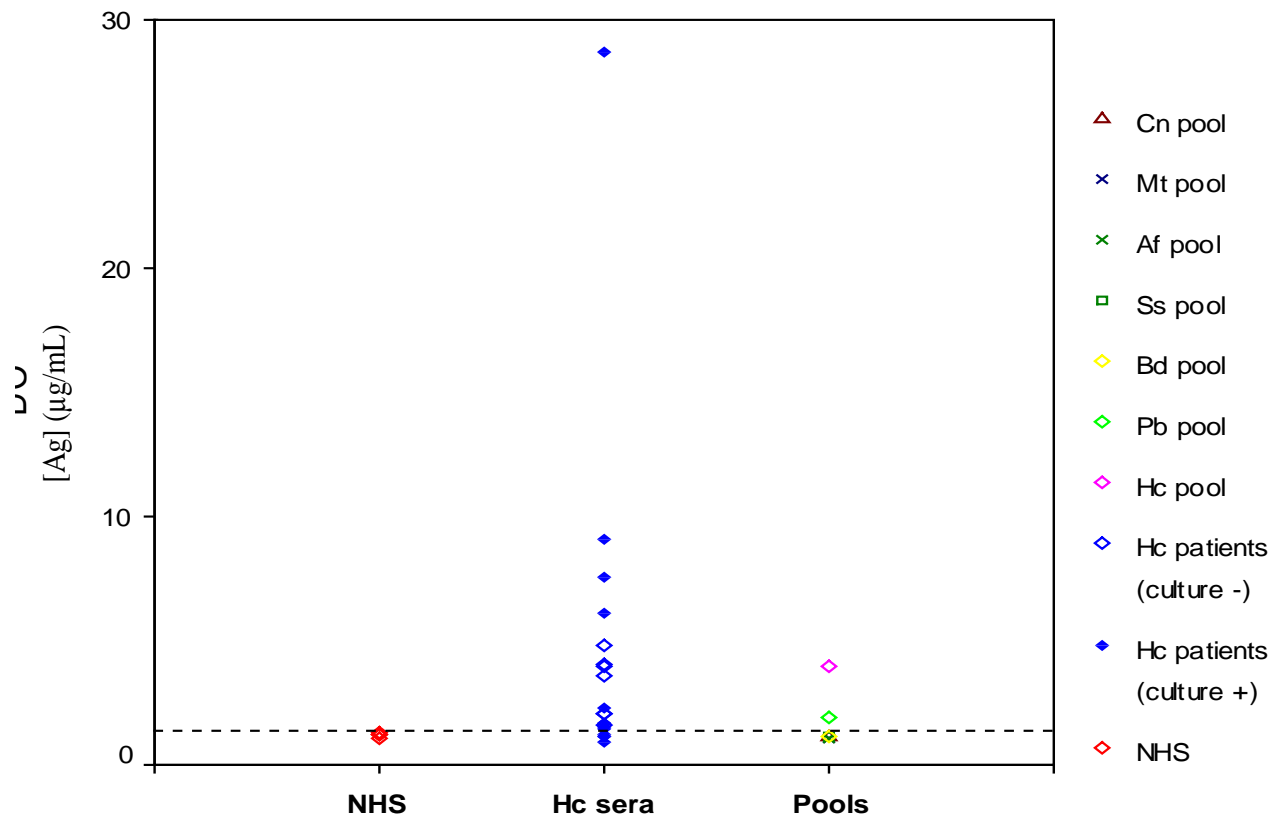
<sup>a</sup> Histoplasmina purificada

<sup>b</sup> Histoplasmina purificada e tratada com NaOH<sub>4</sub>

**13. Ensaio imunoenzimático para a detecção de antígenos:** Os resultados estão ilustrados na tabela 6. Os antígenos foram detectados em 80% das amostras dos pacientes em um estudo piloto inicial. Com relação à especificidade do teste, foi de 91%, apresentando somente reatividade cruzada com o soro de pacientes com paracoccidioidomicose. O “cut-off” calculado a partir dos soros de pacientes sadios foi de 0,590, o que equivale a uma concentração de antígeno de 1,351µg/mL. O estudo inicial apresentou resultado satisfatório, e a próxima etapa é o aumento do número de soros para validação do método. Segue-se na tabela 6 e figuras 21 e 22 os resultados obtidos.



**Figura 21:** Correlação dos valores de densidades ópticas (ODs) das amostras de soro versus os respectivos grupos considerados (NHS- indivíduos saudáveis, Hc- soros de pacientes com histoplasmose, Pool- pool de soros de pacientes com outras micoses). Cn - criptococcose, Mt – tuberculose, Af – aspergilose, Ss – esporotricose, Bd – blastomicose, Pb - paracoccidioidomicose.



**Figura 22:** Correlação dos valores de [Ag] nas amostras de soro versus os respectivos grupos considerados (NHS- indivíduos saudáveis, Hc- soros de pacientes com histoplasmose, Pool- pool de soros de pacientes com outras micoses). Cn - criptococcose, Mt – tuberculose, Af – aspergilose, Ss – esporotricose, Bd – blastomicose, Pb - paracoccidioidomicose.

**Tabela 6.** Parâmetros de validade da ELISA para a detecção de antígenos utilizando a proteína M recombinante.

Parâmetros	Valores
Sensibilidade <sup>a</sup>	80%
Especificidade <sup>b</sup>	91%
Eficiência	84%
PPV	94%
NPV	71%

<sup>a</sup>Sensibilidade= Proporção de amostras positivas corretamente identificadas pelo teste

<sup>b</sup>Especificidade= Proporção de amostras negativas corretamente identificadas pelo teste

## DISCUSSÃO

---

Em estudos prévios de nosso grupo, o antígeno M foi purificado por uma combinação de processos cromatográficos e caracterizado por processos imunológicos como sendo uma glicoproteína com massa molecular relativa de 94 kDa contendo epítomos protéicos espécie-específicos e epítomos glicosídicos (Zancopé-Oliveira e cols. 1993; Zancopé-Oliveira e cols. 1994). Deglicosilação do antígeno M purificado demonstrou serem os determinantes glicosídicos responsáveis pela reatividade cruzada em imunoenaios (Zancopé-Oliveira e cols. 1994; Pizzini e cols. 1999; Reiss e cols. 2000; Guimarães e cols. 2004). Subseqüente estudo de caracterização molecular e funcional do gene codificador do antígeno M, sugeriu ser este uma catalase (Zancopé-Oliveira e cols. 1999). Neste mesmo estudo também foi demonstrada a reatividade da proteína M recombinante em imunoenaios. Recentemente, estudos de avaliação da reatividade da proteína M de fusão pelo ELISA para a detecção de anticorpos em soros de pacientes com histoplasmose comprovada demonstraram uma sensibilidade de 88 % e uma especificidade de 85% (dados não publicados). Além disso, foi descrito um método de identificação altamente sensível e específico para o *H. capsulatum* onde se utilizou na reação de polimerase em cadeia seqüências específicas desenhadas a partir do gene codificador do antígeno M (Guedes e cols. 2003). Esses resultados sugerem que a proteína M recombinante apresenta epítomo(s) comuns, bem como epítomos específicos demonstrando a necessidade de um mapeamento desta proteína para completa definição dos principais sítios antigênicos desta molécula. Estes conhecimentos nos permitirão explorar o papel funcional deste antígeno na relação parasita-hospedeiro, bem como serão úteis no desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais sensíveis e específicos.

O metabolismo celular do oxigênio produz espécies reativas tóxicas para muitos microorganismos. Esta toxicidade é mediada por produtos da redução univalente do oxigênio molecular, incluindo o radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila ( $OH^-$ ). Adicionalmente, organismos infecciosos podem sofrer danos provocados por produtos derivados do metabolismo respiratório das células fagocíticas. Conseqüentemente, enzimas produzidas por ptógenos e envolvidas nas defesas antioxidantes têm sido associadas com a virulência microbiana. Entre estas, incluem-se as catalases, uma família de metaloenzimas capazes de decompor o peróxido de hidrogênio a oxigênio e água, diminuindo o dano à estrutura do microorganismo pelo “stress” oxidativo. Estas enzimas estão presentes na maioria dos microorganismos, e fazem parte de uma superfamília, como comprovado pelo alinhamento utilizando o “BLAST”(tradução). Em adição a

suas atividades biológicas associadas à virulência, esta família de proteínas é um alvo preferencial da resposta imune humoral em diversos fungos, como o *Aspergillus fumigatus* (Rementeria 2005).

A histoplasmose apresenta amplo espectro clínico, variando desde formas leves, graves e disseminadas, que dependem de vários fatores, tais como: inóculo infectante, do *status* imunológico do hospedeiro e da virulência do fungo (71). O *H. capsulatum* é adquirido por via inalatória. Ao atingir os alvéolos, os microconídios infectantes são fagocitados, levando à ativação destas células e liberação de mediadores químicos participantes de mecanismos oxidativos. Entre estes, a  $H_2O_2$  e  $NO^-$ , que expõe o fungo a um “stress” oxidativo. Entretanto, mecanismos de escape, entre os quais a produção de catalases, que atuam na defesa do microorganismo contra  $H_2O_2$ , são desencadeados, com ocorrência do processo de multiplicação do fungo dentro dos macrófagos alveolares (13,77). Já foi demonstrado, através da clonagem e seqüenciamento do gene codificador do antígeno M que sua natureza biológica seria uma catalase (101). Além desta catalase B, outros dois genes codificadores das catalases A e P também já foram identificados, sendo estas três catalases do *H. capsulatum* classificadas como catalases monofuncionais (catalase típica) (49).

Três classes de proteínas não relacionadas baseadas na sua seqüência de aminoácidos e estrutura exibem significativa atividade de catalase. Entre estas classes, a mais extensivamente caracterizada é composta por enzimas contendo grupamento heme, monofuncionais, sendo compostas por subunidades maiores com peso molecular acima de 75kDa ou menores (<60 kDa) (Chelikani 2004). A maioria das catalases típicas apresenta um “core” conservado que compreende aproximadamente 390 aminoácidos, com quatro domínios estruturais (*N*-terminal, domínio em forma de barril, domínio de ligação e domínio helicoidal), sendo que o maior grau de homologia encontrado entre as enzimas pertencentes a esta classe é visto na região ao redor da histidina distal e da tirosina proximal ligantes do grupo prostético heme (Zámocky 1999). A alta homologia do antígeno M com catalase *CATB*, demonstrada anteriormente (101) está associada aos modelos computacionais por nós desenvolvidos. Demonstrou-se que modelo estrutural hipotético do antígeno M como um tetrâmero composto pelos quatro domínios estruturais, além da localização do sítio de assinatura onde os ligantes de heme  $H_{107}$ ,  $N_{180}$ ,  $Y_{394}$  foram encontrados. Podemos confirmar que este antígeno é uma catalase. Entretanto, sua participação na patogênese da histoplasmose ainda não foi comprovada neste trabalho.

A proteína M é considerada um dos antígenos imunodominantes do *H. capsulatum*, visto que anticorpos contra esta molécula são os primeiros a serem detectados no início da infecção. Na imunodifusão, anticorpos anti-M são mais frequentemente detectados que os anti-H, e aparecem

logo após o contato com o fungo, podendo indicar infecção anterior, doença aguda ou uma doença crônica progressiva. Os anticorpos anti-M podem persistir até 3 anos após a cura clínica e podem também ser estimulados após intradermoreação com histoplasmina em pessoas que nunca tiveram contato com o *H. capsulatum* (Klite 1965; Kaufman 1992). Devido a esta importância do antígeno M na histoplasmose, surgiu-se a necessidade de mapear as regiões de maior antigenicidade dentro da molécula, caracterizando importantes epítomos B, e que poderiam ser utilizados para a imunização e avaliação de imunógeno vacinal protetor.

Inicialmente, o mapeamento de epítomos B presentes no antígeno M foi realizado após alinhamento múltiplo das seqüências polipeptídicas da proteína recombinante M através do programa PILEUP (GCG versão 8.0, Wisconsin University, EUA). A seqüência nucleotídica do gene codificador desta proteína do *H. capsulatum* depositada no GenBank como AFO26268 foi comparada com seqüências de catalases de outros organismos eucariotas utilizando os programas FASTA Version 3, PDB Viewer Program, and PROCHECK. Os resultados obtidos por esses estudos demonstraram regiões de baixa homologia com catalases humanas. Estudos posteriores, utilizando o algoritmo de Jameson-Wolf, que prediz o potencial antigênico de regiões pela combinação de métodos existentes para predição de estruturas (Jameson 1988) foram realizados e combinados com a probabilidade de superfície calculada pelo algoritmo de Emini. Através dessa análise, sete regiões antigênicas foram determinadas, sendo um destes sítios localizados nos primeiros 40 aminoácidos na porção *N*-terminal, os quais constituem um provável peptídeo sinal, fato já demonstrado anteriormente (101). Com isso, somente seis sítios hidrofílicos, com índices antigênicos altos e posicionados na superfície da molécula são os possíveis epítomos B uma vez poderiam ser mais facilmente reconhecidos pelos anticorpos homólogos. Epítomos B são freqüentemente formados por aminoácidos que se localizam em posições distantes um dos outros na seqüência primária da proteína, mas que são aproximados como sítios reativos na superfície da molécula enovelada (Myers 2000). Este fato também foi verificado em nossos estudos uma vez que as regiões antigênicas se encontram em diferentes posições na molécula (ver Figura 8 para detalhamento). Estes peptídeos já foram sintetizados, e atualmente estão sendo utilizados no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico.

Outra estratégia também foi utilizada no mapeamento dos domínios da proteína M. Três fragmentos do gene codificador da proteína M foram gerados por PCR, clonados e expressos em *E.coli*, e a seguir purificados. A fidelidade de cada fragmento foi confirmada por seqüenciamento dos ácidos nucléicos. O fragmento 1 continha somente o peptídeo 1 localizado na posição 25-30 aa, o fragmento 2 continha somente o peptídeo 2 (380 a 387 aa) e o fragmento 3 continha os 4 peptídeos



restantes. Esta estratégia foi desenvolvida pois tem sido descrito que de acordo com o tamanho e a afinidade dos peptídeos sintéticos, os mesmos não se acoplam a matrizes sólidas (Machado 2004) e, portanto, fragmentos maiores, apresentando a mesma especificidade que os peptídeos individuais, poderiam ser utilizados nos testes sorológicos.

O antígeno M recombinante gerado por expressão e purificação em *E. coli* foi utilizado para obtenção de um painel de anticorpos monoclonais. Têm-se demonstrado que a especificidade dos teste imunológicos em relação à ligação ao antígeno é aumentada quando anticorpos monoclonais são utilizados nos mesmos (Zola 1982). A especificidade é devido ao reconhecimento de somente um único epítipo na molécula antigênica pelo anticorpo monoclonal, dependendo da avidéz de ligação e na maioria das vezes, da conformação antigênica, que permite uma maior ou menor exposição do epítipo. Estes reagentes específicos possuem inúmeras aplicações como na padronização de novos ensaios imunológicos e na sua utilização na imunoterapia de doenças infecciosas (imunização passiva). Os monoclonais desenvolvidos por nós apresentaram uma boa reatividade contra o antígeno M recombinante, mas somente 3 foram selecionados para serem utilizados no desenvolvimento de ensios imunológicos por apresentarem uma banda mais evidente na reação de imunoblot. Estes monoclonais, 8H2 e 6F12 (IgG2a) e 7C7 (IgM), quando avaliados frente a outros antígenos fúngicos, reagiram diferentemente, sugerindo o reconhecimento de epítipos distintos. O anticorpo monoclonal 8H2 foi o único que não reagiu com antígenos de outras espécies fúngicas, apresentando uma especificidade de reconhecimento a epítipos específicos no antígeno M recombinante e que não são compartilhados com os outros antígenos avaliados. O antígeno M apresenta uma alta similaridade com as catalases de *A. fumigatus* (Zancope-Oliveira e cols. 1999) mas o mAb 8H2 não foi capaz de reagir com os antígenos presentes no filtrado da cultura deste fungo, sugerindo que este anticorpo monoclonal é espécie-específico, reconhecendo epítipos distintos presentes somente na *CAT B* (antígeno M) do *H. capsulatum*, e ausente nas catalases dos fungos do gênero *Aspergillus*.

Quando preparações antigênicas do *H. capsulatum* foram utilizadas, o anticorpo monoclonais (8H2) não reconheceu o antígeno M quando testados frente aos antígenos HMIN e CYA no imunoblot. Estes resultados poderiam ser explicados pela baixa concentração de antígeno M nestas preparações antigênicas sendo esta metodologia incapaz de evidenciar tais moléculas. Além disso, não podemos descartar o papel conformacional das proteínas frente a diferentes matrizes sólidas (Machado 2004). Estes resultados não nos impediram em pensar que novas estratégias deveriam ser desenvolvidas utilizando o antígeno M em testes de diagnóstico, as quais serão discutidas posteriormente ainda neste tópico de nossa dissertação.

Os polipeptídeos gerados a partir da fragmentação do rM e denominados F1, F2 e F3 foram mapeados com o painel de anticorpos monoclonais por imunoblot com o propósito de avaliar os determinantes antigênicos por eles reconhecidos e verificar se os epítomos B estavam segregados a um único ou a diferentes fragmentos da proteína M. Para tanto, somente foi avaliado o reconhecimento de epítomos presentes na estrutura primária da proteína, e não epítomos espaciais, formados pelo enovelamento e formação da estrutura secundária da proteína uma vez que estes polipeptídeos foram desnaturados em procedimentos realizados anteriormente. O padrão de reatividade observado confirma que nenhum dos três fragmentos gerados pode ser considerado imunodominante em relação a outro fragmento, com relação à presença de epítomos B. Entretanto, o fragmento F3 apresenta um maior número de epítomos reatores contra o painel de anticorpos monoclonais utilizado.

Os anticorpos monoclonais 8H2 e 6F12 previamente avaliados quanto sua especificidade frente a outros antígenos, reconheceram o fragmento 2 (F2), enquanto o anticorpo 7C7 reconheceu o fragmento 3 (F3). O anticorpo monoclonal (3A11) não reconheceu nenhum dos fragmentos. Isto pode ser devido ao fato deste mAb reconhecer as regiões entre os fragmentos 1 e 2 ou 2 e 3, uma vez que sua integridade foi corrompida devido a fragmentação da proteína M.

A localização do antígeno M na levedura do *H. capsulatum* ainda não tinha sido completamente elucidada. Estudos anteriores realizados por nosso grupo evidenciou a presença do antígeno M na fase miceliana do fungo utilizando o mAb 8H2 (Albuquerque, P.C., Pizzini, C.V., Guimarães, A.J., Peralta, J.M., Hamilton, A.J., Youngchim, S. and Zancopé-Oliveira, R.M. XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003) sugerindo que a presença desta proteína na superfície da fase infectante do *H. capsulatum* poderia estar atuando no mecanismo de conversão de micélio (M) para levedura (Y), bem como nos mecanismos de escape do fungo aos ataques inespecíficos do hospedeiro. A observação de reação fortemente positiva na fase leveduriforme deste fungo (Fig. 16) confirma nossa hipótese, e corrobora os dados demonstrados por Johnson e colaboradores (49) que o gene *CATB* codificador do antígeno M é expresso nas duas fases evolutivas do *H. capsulatum*.

Estudos anteriores (Howard 1983) evidenciaram indiretamente que catalases do *H. capsulatum* se localizavam em extratos livres de células (*cell-free extracts*) ou em células permeabilizadas com acetona sugerindo que as mesma fossem proteínas secretadas. Nossos resultados através da detecção do antígeno M pelo imunoblot utilizando o mAb 8H2 frente ao extrato de parede celular/membrana confirmam que pelo menos a proteína M está presente na parede/membrana celular. Com isso, a atividade de catalase em diversas frações celulares foi avaliada, sendo que a maior atividade catalítica foi detectada exatamente nas células intactas. Estes

resultados quando comparados com as células intactas mais sobrenadante, mostraram que somente uma fraca atividade desta enzima pode ser detectada no sobrenadante. Estes dados sugerem que esta enzima pode não estar sendo secretada nas condições avaliadas e/ou estar sendo acumulada realmente na parede celular. Em meio sólido, a atividade de catalase não pode ser evidenciada ao redor da colônia de *H. capsulatum*, novamente evidenciando que esta enzima não é secretada constitutivamente pela levedura, e sim que pode ser obtida em sobrenadantes durante a curva de crescimento do *H. capsulatum* por ocorrência de morte celular e liberação desta proteína no meio de cultura.

Paralelamente a produção de anticorpos monoclonais e mapeamento de epítomos na proteína M, iniciou-se também o desenvolvimento e padronização de uma técnica de ELISA para detecção de anticorpos usando histoplasmina purificada (pHMIN) e deglicosilada quimicamente com metaperiodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>) [ptHMIN] (Guimarães e cols. 2004), bem como uma ELISA de captura para a detecção de antígenos.

No ELISA para a detecção de anticorpos, embora a reatividade cruzada não tenha sido abolida quando ptHMIN foi usada no teste, a mesma foi reduzida (pHMIN ELISA 93% de especificidade versus ptHMIN ELISA 96% de especificidade) tendo sido determinada somente em um pequeno número de soros de pacientes com paracoccidiodomicose (um soro em ptHMIN versus três soros em pHMIN), aspergilose (três soros em ptHMIN versus quatro soros em pHMIN), e coccidiodomicose (um soro em ptHMIN). As amostras de soro de pacientes infectados com *Sporothrix schenckii* e *Cryptococcus neoformans* não apresentaram reatividade cruzada com nenhum antígeno. Soros de indivíduos saudáveis não apresentaram nenhum reconhecimento pela ptHMIN, e somente uma amostra foi reativa a pHMIN. Entretanto, a especificidade total entre os dois antígenos não foi completamente diferente (93% versus 96 %, respectivamente, para a pHMIN e ptHMIN). Nos pacientes que apresentaram resultados falso-positivos, a possibilidade de histoplasmose subclínica e concomitante não pode ser excluída, pois já foi descrito que a histoplasmose pode co-existir com outras doenças granulomatosas pulmonares, incluindo tuberculose e outras micoses (Wheat 2001). Outra possibilidade seria uma cicatriz sorológica devida a uma exposição passada destes pacientes ao *H. capsulatum*. Muitos casos de histoplasmose não são aparentes e tem evolução benigna (95%), onde os anticorpos anti-M podem permanecer elevados por vários anos após a recuperação do paciente. Estas precipitinas residuais poderiam levar a um erro no diagnóstico da histoplasmose com doença causada por outros agentes infecciosos (Wheat 2001) ou mesmo em indivíduos sadios residentes em áreas endêmicas da histoplasmose.

A sensibilidade foi também avaliada, utilizando ambos os antígenos, em 50 amostras de soro de pacientes com histoplasmose confirmada. Quando a pHMIN foi utilizada, observamos uma sensibilidade de 57%, enquanto que com o uso da ptHMIN, a sensibilidade aumentou para 92%, sendo uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.001$ ). Este aumento da sensibilidade pode ser devido a uma exposição de determinantes antigênicos mais imunorreativos, uma vez que a porção carboidrato exposta na pHMIN foi retirada, e que poderia estar ocluindo os epítomos protéicos, o que permitiria um melhor reconhecimento por parte dos anticorpos presente nos soros dos pacientes, aumentando então o nível de resposta no teste proposto. As amostras que apresentaram resultados falso-negativos com o uso da ptHMIN foram avaliadas pela técnica do imunoblot. Os resultados positivos, podem ser devido a mudança conformacional da molécula (pela a desnaturação do antígeno que levaria a uma alteração do reconhecimento dos diferentes determinantes antigênicos). Esta metodologia pode ser facilmente adaptada para uso em laboratórios de diagnóstico, e é claramente um método sensível e específico para a detecção de anticorpos na histoplasmose (Guimarães 2005), podendo ser utilizado mesmo em situações onde as condições laboratoriais não são adequadas.

Para a detecção de antígenos, a ELISA de captura padronizada apresentou uma sensibilidade de 80%, detectando antígenos em 16 das 20 amostras analisadas. Com relação à especificidade, reatividade cruzada foi vista somente quando “pool” de soros de pacientes com paracoccidiodomicose foi utilizado, fornecendo uma especificidade total de 91%. Estudos complementares utilizando uma maior amostragem de cada grupo e um maior número de soros provenientes de indivíduos saudáveis será utilizado para a validação deste teste como um método mais preciso para a detecção de antígenos.

## CONCLUSÃO

---

- ✓ A construção de um modelo estrutural hipotético da proteína M compatível com modelos de catalases, com a localização do sítio de assinatura e demonstração do provável sítio de inserção do grupamento Heme, corrobora a natureza biológica do antígeno M como catalase.
- ✓ Foram demonstradas as principais regiões antigênicas da molécula através de sua localização espacial no modelo proposto.
- ✓ O antígeno M é composto por sete regiões antigênicas sendo um destes sítios um provável peptídeo sinal, e seis prováveis epítomos B.
- ✓ A fragmentação do antígeno M recombinante e expressão dos polipeptídeos F1, F2, F3 demonstrou que os epítomos B não estão segregados a uma determinada região da molécula, apresentando reatividade com os monoclonais anti-rM nos três fragmentos gerados
- ✓ O fragmento F3 apresenta um maior número de epítomos reatores contra o painel de anticorpos monoclonais utilizados.
- ✓ Os monoclonais gerados contra a proteína M recombinante apresentaram boa especificidade frente a antígenos de outros gêneros fúngicos e, conseqüentemente poderão ser utilizados no desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais acurados, bem como em ensaios de proteção.
- ✓ A localização do antígeno M na superfície da fase infectante do *H. capsulatum* e na fração membrana /parede celular sugere a participação desta molécula no dimorfismo do fungo, bem como fator de virulência na relação fungo-hospedeiro.
- ✓ A padronização de um ELISA com aceitáveis parâmetros sorológicos para detecção de anticorpos proporcionará, após uma validação multicêntrica, sua utilização em rotinas diagnósticas da histoplasmose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

---

- Ajello, L. (1971). "Coccidioidomycosis and histoplasmosis. A review of their epidemiology and geographical distribution." *Mycopathol. Mycol. Appl.* **45**(3): 221-30.
- Allendorfer, R., Brunner, G. D., Deepe, G. S. Jr. (1999). "Complex requirements for nascent and memory immunity in pulmonary histoplasmosis." *J. Immunol.* **162**: 7389-96.
- Allendorfer, R., Magee, D. M., Deepe, G. S. Jr, Graybill, J. R. (1993). "Transfer of protective immunity in murine histoplasmosis by a CD4+ T-cell clone." *Infect. Immun.* **61**: 714-8.
- Alteras, I. (1966). "First Romanian isolation of *Histoplasma capsulatum* from the soil." *Dermatol. Int.* **5**(2): 69-71.
- Araujo, F. G. (1970). "1st isolation of *Histoplasma capsulatum* from the soil in Minas Gerais." *Rev. Ins. Med. Trop. São Paulo* **12**: 185-191.
- Bialek, R., F. Ernst, et al. (2002). "Comparison of staining methods and a nested PCR assay to detect *Histoplasma capsulatum* in tissue sections." *Am. J. Clin. Pathol.* **117**(4): 597-603.
- Bialek, R., A. Feucht, et al. (2002). "Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue." *J. Clin. Microbiol.* **40**(5): 1644-7.
- Bialek, R., J. Fischer, et al. (2001). "Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a nested PCR assay." *J. Clin. Microbiol.* **39**(4): 1506-9.
- Bracca, A., M. E. Tosello, et al. (2003). "Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples." *J. Clin. Microbiol.* **41**(4): 1753-5.
- Brooks, J. T., Wheat, L. J. (1998). "Histoplasmosis: update 1998." *AIDS Clin. Care.* **10**: 4-5.
- Brummer, E., Stevens, D. A. (1984). "Activation of murine polymorphonuclear neutrophils for fungicidal activity with supernatants from antigen-stimulated immune spleen cell cultures." *Infect. Immun.* **45**: 447-52.
- Brummer, E., Stevens, D.A. (1995). "Antifungal mechanisms of activated murine bronchoalveolar or peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*." *Clin. Exp. Immunol.* **102**: 65-70.
- Bullock, W. W., S. D. (1987). "Role of adherence promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150, 95 in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages." *J. Exp. Med.* **165**: 195-210.
- Cain, J. A., Deepe, G.S., Jr. (1998). "Evolution of the primary immune response to *Histoplasma capsulatum* in murine lung." *Infect. Immun.* **66**: 1473-1481.
- Cano, M. V., Hajjeh, R. A. (2001). "The epidemiology of histoplasmosis: a review." *Semin. Respir. Infect.* **16**: 109-18.
- Capone, D., Wanke, B., Monteiro, P. C., Lazera, M. S., de Noronha Andrade, G., do Valle, A. C., Moreno, A. M., Londero, A. T. (1999). "Chronic pulmonary histoplasmosis in the State of Rio de Janeiro, Brazil." *Mycopathologia* **145**: 75-9.
- Carvalho, A. (1949). "Sobre a histoplasmose." I - Conceito moderno: histoplasmose maligna e benigna. Histoplasmose infecção. II- Estudos baseados em 53 indivíduos reatores a histoplasmina na cidade do Rio de Janeiro **4**: 51-90.
- Casadevall, A., J. Mukherjee, et al. (1992). "Monoclonal antibody based ELISAs for cryptococcal polysaccharide." *J Immunol Methods* **154**(1): 27-35.
- Chandler, R. L., Derbyshire, J. B., Smith, K. (1969). "Observations on the experimental infection and cellular pathology of transmissible gastroenteritis in piglets." *Res. Vet. Sci.* **10**: 435-9.
- Chandrashekar, R., K. C. Curtis, et al. (1997). "Molecular cloning and characterization of a recombinant *Histoplasma capsulatum* antigen for antibody-based diagnosis of human histoplasmosis." *J. Clin. Microbiol.* **35**(5): 1071-6.

- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. (2004). "Diversity of structures and properties among catalases." Cell. Mol. Life Sci. **61**: 192-208.
- Debons-Guillemain, M. C., Vouldoukis, I., Roseto, A., Alfred, C., Chopin, C., Ploton, I., Monjour, L. (1986). "Inhibition in vivo of both infective *Leishmania major* and *L. mexicana amazonensis* mediated by a single monoclonal antibody." Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **80**: 258-60.
- Deepe, G. S., Jr. (1994). "The immune response to *Histoplasma capsulatum*: unearthing its secrets." J. Lab. Clin. Med. **123**: 201-205.
- Deepe, G. S., Jr. and G. G. Durose (1995). "Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*." Infect. Immun. **63**(8): 3151-7.
- Deepe, G. S. J. (1988). "Protective immunity in murine histoplasmosis: functional comparison of adoptively transferred T-cell clones and splenic T cells." Infect. Immun. **56**: 2350-5.
- Deepe, G. S. J., Gibbons, R. S. (2001). "V beta 6+ T cells are obligatory for vaccine-induced immunity to *Histoplasma capsulatum*." J. Immunol. **167**: 2219-26.
- Deepe, G. S. J., Gibbons, R. S. (2002). "Cellular and molecular regulation of vaccination with heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*." Infect. Immun. **70**: 3759-67.
- Deepe, G. S. J., Gibbons, R., Brunner, G.D., Gómez, F.J. (2001). "Protective efficacy of H antigen from *Histoplasma capsulatum* in a murine model of pulmonary histoplasmosis." Infect. Immun. **69**: 3128-34.
- Deepe, G. S. J., Gibbons, R., Brunner, G.D., Gómez, F.J. (1996). "A protective domain of heat-shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*." J. Infect. Dis. **174**: 828-834.
- Disalvo, A. F., W. J. Bigler, et al. (1970). "Bat and soil studies for sources of histoplasmosis in Florida." Public. Health. Rep. **85**(12): 1063-9.
- Eissenberg, L. G., Goldman, W. E. (1991). "*Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis." Clin. Microbiol. Rev. **4**: 411-21.
- Emmons, C. W. (1950). "Histoplasmosis: animal reservoirs and other sources in nature of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*." Amer. J. of Public Health. **40**: 436-440.
- Emmons, C. W. (1956). "Histoplasmosis in animals." Public Health Monogr. **70**(39): 272-3.
- Emmons, C. W. (1956). "Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil." Public Health Monogr. **70**(39): 237-9.
- Emmons, C. W., P. D. Klite, et al. (1966). "Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the United States." Am. J. Epidemiol. **84**(1): 103-9.
- Fava Netto, C., Silva, V. A., Chammas, F., Lacaz, C. S. (1967). "Histoplasmose endêmica. Estudo clínico, radiológico, micológico e imunológico ocorrido no estado de São Paulo." Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo. **9**: 222-232.
- Fava S.C., R. E., Cuce LC, Weiss S, Rigone G, Fava-Netto C. (1997). "Histoplasmin reaction. Comparison of a polysaccharide antigen to the filtrate antigen." Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo **39**: 257-60.
- Fernandes, F. O., Costa, W., Wanke, B., Zancopé-Oliverira, R. M. (1989). "Microepidemia de histoplasmose capsulata. Clínica e epidemiologia do primeiro surto ocorrido do no Estado da Paraíba." CCS, João Pessoa. **11**: 189-199.
- Fernandez-Andreu, C. M., Varona, C. C., Martínez Machin, G., Rodriguez Barreras, M. E., Ruiz Perez, A. (1996). "Progressive disseminated histoplasmosis in AIDS patients." Rev. Cubana. Méd. Trop. **48**: 163-6.
- Gomez, B. L., J. I. Figueroa, et al. (1997). "Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis." J. Clin. Microbiol. **35**(10): 2618-22.
- Gomez, F. J., Allendoerfer, R., Deepe, G.S., Jr. (1995). "Vaccination with recombinant heat-shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*." Infect. Immun. **63**: 2587-2595.

- Gomez, F. J., A. M. Gomez, et al. (1991). "Protective efficacy of a 62-kilodalton antigen, HIS-62, from the cell wall and cell membrane of *Histoplasma capsulatum* yeast cells." Infect Immun **59**(12): 4459-64.
- Goodwin, R. A., Jr. and R. M. Des Prez (1978). "State of the art: histoplasmosis." Am. Rev. Respir. Dis. **117**(5): 929-56.
- Guedes, H. L., A. J. Guimaraes, et al. (2003). "PCR assay for identification of histoplasma capsulatum based on the nucleotide sequence of the M antigen." J. Clin. Microbiol. **41**(2): 535-9.
- Guimarães, A. J., C. V. Pizzini, et al. (2004). "ELISA for early diagnosis of histoplasmosis." J. Med. Microbiol. **53**(Pt 6): 509-14.
- Guimarães, A. J., Pizzini, C. V., Santoro, D. O., Albuquerque, P. C., Pimenta, M. A., Peralta, J. M., Zancopé-Oliveira, R. M (2005). "Evaluation of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Antibody Response in the Clinical Forms of Histoplasmosis." 105th General Meeting - American Society for Microbiology: 49 (F-017).
- Hamilton, A. J. (1998). "Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii; current status and future trends." Med. Mycol. **36**(6): 351-64.
- Hamilton, A. J., M. A. Bartholomew, et al. (1990). "A murine monoclonal antibody exhibiting high species specificity for *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*." J. Gen. Microbiol. **136**(2): 331-5.
- Hamilton, A. J., M. A. Bartholomew, et al. (1990). "Evidence that the M antigen of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* is a catalase which exhibits cross-reactivity with other dimorphic fungi." J. Med. Vet. Mycol. **28**(6): 479-85.
- Heiner, D. C. (1958). "Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar-gel." Pediatrics **22**(4 Part 1): 616-27.
- Howard, D. H. (1983). "Studies on the catalase of *Histoplasma capsulatum*." Infect Immunity **39**: 1161-1166.
- Jameson, B. A., Wolf, H. (1988). "Antigenic Index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants." CABIOS **4**: 181-6.
- Johnson, C. H., Klotz, M. G., York, J. L., Kruff, V., McEwen, J. E. (2002). "Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases." Microbiology **148**: 1129-42.
- Kaufman, L. (1992). "Immunohistologic diagnosis of systemic mycoses: an update." Eur. J. Epidemiol. **8**(3): 377-82.
- Kaufman, L. (1992). "Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses." Clin. Infect. Dis. **14 Suppl 1**: S23-9.
- Klite, P. D. (1965). "The interpretation of agar-gel precipitin reactions in histoplasmosis." J. Lab. Clin. Med. **66**(5): 770-87.
- Kostiala, I., A. A. Kostiala, et al. (1981). "Antibodies against antigens of *Candida albicans* in patients with fungaemia and bacteraemia, studied by ELISA, precipitation, passive haemagglutination and immunofluorescence techniques." J Med Microbiol **14**(4): 483-92.
- Levitz, S. M., Diamond, R.D. (1985). "Mechanisms of resistance of *Aspergillus fumigatus* conidia to killing by neutrophils in vitro." J. Infect. Dis. **152**: 33-42.
- Londero, A. T. and C. D. Ramos (1978). "The status of histoplasmosis in Brazil." Mycopathologia **64**(3): 153-6.
- Machado, A., Liria, C. W., Proti, P. B., Remuzgo, C., Miranda, M. T. M. (2004). "Chemical and enzymatic synthesis: basic aspects and applications." Química Nova **27**: 781-9.
- Maldonado, E., Deepe, G. S. Jr, Woods, J. P. (2003). "Functional evidence that M antigen of *Histoplasma capsulatum* is a secreted catalase and effect of secreted catalase overexpression on virulence of *H. capsulatum*." Submitted to Infect. Immun.



- Maresca, B. and G. S. Kobayashi (1989). "Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi." Microbiol. Rev. **53**(2): 186-209.
- McEwen, J. G., Sugar, A.M., Brummer, E., Restrepo, A., Stevens, D.A. (1984). "Toxic effect of products of oxidative metabolism of the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*." J. Med. Microbiol. **18**: 423-428.
- Meleney, H. E. (1956). "Problems in the histological diagnosis of histoplasmosis." Public Health Monogr. **70**(39): 14-6.
- Meloi-Bruneri, L. H., Campa, A., Abdalla, D.S.P., Calich, V.L.G., Lenzi, H.L., Burger, E. (1996). "Neutrophil oxidative metabolism and killing of *Paracoccidioides brasiliensis* after air pouch of susceptible and resistant mice." J. Leukoc. Biol. **59**: 526-533.
- Moraes, M. A. P., Almeida, M. M. R. (1976). "Isolamento do *Histoplasma capsulatum* do solo de Humboldt (Estado de Mato Grosso, Brasil)." Acta. Amazônia **6**: 43-47.
- Morrison, C. J., Isenberg, R. A., Stevens, D. A. (1988). "Enhanced oxidative mechanisms in immunologically activated versus elicited polymorphonuclear neutrophils: correlations with fungicidal activity." J. Med. Microbiol. **25**: 115-121.
- Myers, M. A., Davies, J. M., Tong, J. C., Whisstock, J., Scealy, M., Mackay, I. R., Merrill, R. (2000). "Conformational epitopes on the diabetes autoantigen GAD65 identified by peptide phage display and molecular modeling." The Journal of Immunology **165**: 3830-8.
- Nosanchuk, J. D., Steenbergen, J.N., Shi, L., Deepe, G.S.Jr., Casadevall, A. (2003). "Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*." The Journal of Clinical Investigation **112**(8): 1164-1175.
- Ouchterlony, O. (1958). "Antigen-antibody reactions in gels." Acta. Pathol. Microbiol. Scand. **26**: 34-42.
- Paris S., W. D., Debeaupuis J.P., Shibuya K., Philippe B., Diamond R.D., Latge J.P. (2003). "Catalases of *Aspergillus fumigatus*." Infect. Immun. **71**: 3551-3562.
- Pedroza, B. H. P. (2003). "Histoplasmose associada a HIV/ AIDS. Estudo descritivo de casuística em um centro de pesquisa no Rio de Janeiro (1987-2002)."
- Pine, L. (1977). "*Histoplasma* antigens: their production purification and uses." Contrib. Microbiol. Immunol **3**: 138-168.
- Pine, L., G. B. Malcolm, et al. (1978). "Evaluation of purified H and M antigens of histoplasmin as reagents in the complement fixation test." Sabouraudia **16**(4): 257-69.
- Pizzini, C. V., R. M. Zancope-Oliveira, et al. (1999). "Evaluation of a western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis." Clin. Diagn. Lab. Immunol. **6**(1): 20-3.
- Reiss, E., T. Obayashi, et al. (2000). "Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections." Med. Mycol. **38 Suppl 1**: 147-59.
- Rementeria, A., López-Molina, N., Ludwig, A., Vivanco, A. B., Bikandi, J., Pontón, J., Garaizar, J. (2005). "Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence." Rev. Iberoam. Micol. **22**: 1-23.
- Renukaradhya, G. J., Sinnathamby, G., Seth, S., Rajasekhar, M., Shaila, M. S. (2002). "Mapping of B-cell epitopic sites and delineation of functional domains on the hemagglutinin-neuraminidase protein of peste des petits ruminants virus." Virus. Res. **90**: 171-85.
- Retallack, D. M., Woods, J.P. (1999). "Molecular epidemiology, pathogenesis and genetics of the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*." Microb. Infect. **1**: 817-825.
- Reyes-Montes, M. R., Garcia-Camacho, M. P., Casasola, J., Taylor, M. L. (1988). "Immunosuppression transfer by spleen cells from young to adult mice previous to *Histoplasma capsulatum* infection." Mycopathologia **101**: 69-75.
- Rickerts, V., R. Bialek, et al. (2002). "Rapid PCR-based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient." Eur. J.Clin. Microbiol. Infect. Dis. **21**(11): 821-3.

- Rios Fabra, A., Restrepo, A., Isturiz, R. (1994). "Fungal infection in Latin América Countries." Infect. Dis. Clin. N. Am. **8**: 129-154.
- Sandia, O. G. (1974). "Inquérito da histoplasmose pela intradermoreação com a histoplasmina em Santa Clara (RJ) e Divininho (MG)." Anais de Medicina **16**: 17: 142.
- Schmidt, S., Machado, O. P., Galvão, A. B. (1973). "Microepidemia na zona rural de Brasília. DF. 2- Estudo epidemiológico e parasitológico da fonte de infecção." Rev. Soc. Bras. Med. Trop **7**: 107-115.
- Schnur, R. A., Newman, S. L. (1990). "The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils." Evidence for intracellular trapping of superoxide anion **144**: 4765-4772.
- Seco-Mediavilla, P., Verger, J. M., Grayon, M., Cloeckert, A., Marin, C. M., Zygmunt, M. S., Fernandez-Lago, L., Vizcaino, N. (2003). "Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis." Clin. Diagn. Lab. Immunol. **10**: 647-51.
- Segal, E. (1987). "Vaccines against fungal infections." Crit. Rev. Microbiol. **14**: 229-71.
- Severo, L. C., Petrillo, V. F., Camargo, J. J., Beyer, G. R., Porto, M. S. (1986). "Acute pulmonary histoplasmosis and first isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil of Rio Grande do Sul, Brasil." Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo **28**: 51-55.
- Silva, M. E. (1956). "Isolamento do *Histoplasma capsulatum* do solo, em zona endêmica de calazar na Bahia, Brasil." Bol. Fund. Gonçalo Moniz **10**: 1-9.
- Smith, C. D. (1971). "Nutritional factors that are required for the growht and sporulation of *Histoplasma capsulatum*." Ajello, L., E.W. Chick and M.L. Furcolow (Eds). Histoplasmosis. Proceedings of the Second National Conference: p. 64-70.
- Smith, C. D. (1971). "The role of birds in the ecology of *Histoplasma capsulatum*." In: Ajello, L., E.W. Chick and M.L. Furcolow (Eds). Histoplasmosis. Proceedings of the Second National Conference: 140-148.
- Spitzer, E. D., Keath, E. J., Travis, S. J., Painter, A. A., Kobaiashi, G. S., Medoff, G. (1990). "Temperature-sensitive variants os *Histoplasma capsulatum* isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome." J. Infect. Dis. **162**: 258-261.
- Standard, P. G. and L. Kaufman (1976). "Specific immunological test for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*." J. Clin. Microbiol. **3**(2): 191-9.
- Tewari, R. P., Sharma, D., Solotorovsky, M., Lafemina, R., Balint, J. (1977). "Adoptive transfer of immunity from mice immunized with ribosomes or live yeast cells of *Histoplasma capsulatum*." Infect. Immun. **15**: 789-95.
- Wanke, B. (1985). "Histoplasmose. Estudo epidemiológico, clínico e experimental." Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Wheat, J. (1997). "Histoplasmosis. Experience during outbreaks in Indianapolis and review of the literature." Medicine (Baltimore) **76**(5): 339-54.
- Wheat, J., M. L. French, et al. (1986). "Evaluation of cross-reactions in *Histoplasma capsulatum* serologic tests." J. Clin. Microbiol. **23**(3): 493-9.
- Wheat, L. J. (1989). "Diagnosis and management of histoplasmosis." Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **8**(5): 480-90.
- Wheat, L. J. (2001). "Laboratory diagnosis of histoplasmosis: update 2000." Semin. Respir. Infect. **16**(2): 131-40.
- Wheat, L. J., C. A. Kauffman (2003). "Histoplasmosis." Infect. Dis. Clin. N. Am. **17**(1): 1-19.
- Wheat, L. J., P. Connolly-Stringfield, R. Blair, K. Connolly, T. Garringer and B.P. Katz. (1991). "Histoplasmosis relapse in patients with AIDS: detection using *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen levels." Ann. Intern. Med. **115**: 936-941.

- Wheat, L. J., R. Kohler, R. Tewari, M.L. Garten and M.L.V. French. (1989). "Significance of *Histoplasma antigen* in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis." Arch. Intern. Med. **149**: 302-304.
- Winslow, G. M., Yager, E., Shilo, K., Volk, E., Reilly, A., Chu, F. K. (2002). "Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection." Infect. Immun. **68**: 5469.
- Woods, J. P. (2002). "Histoplasma capsulatum molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment." Fungal Genet. Biol. **35**: 81-97.
- Woods, J. P., Heinecke, E. L., Luecke, J. W., Maldonado, E., Ng, J. Z., Retallack, D. M., Timmerman, M. M. (2001). "Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*." Semin. Respir. Infect. **16**: 91-101.
- Wysong, D. R., Christin, L., Sugar, A.M., Robbins, P.W., Diamond, R.D. (1998). "Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene." Infect. Immun. **66**: 1953-1961.
- Zámocky, M., Koller, F. (1999). "Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis." Progress in Biophysics and Molecular Biology **72**: 19-66.
- Zancopé-Oliveira, R. M. (1985). "Histoplasmose - Estudo epidemiológico em área periurbana do município do Rio de Janeiro."
- Zancopé-Oliveira, R. M., S. L. Bragg, et al. (1993). "Evaluation of cation exchange chromatography for the isolation of M glycoprotein from histoplasmin." J. Med. Vet. Mycol. **31**(1): 29-41.
- Zancopé-Oliveira, R. M., S. L. Bragg, et al. (1994). "Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method." Clin. Diagn. Lab. Immunol. **1**(4): 390-3.
- Zancopé-Oliveira, R. M., P. M. e Silva Tavares, et al. (2005). "Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil." FEMS Immunol. Med. Microbiol. **45**(3): 443-9.
- Zancopé-Oliveira, R. M., E. Reiss, et al. (1999). "Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*." Infect. Immun. **67**(4): 1947-53.
- Zancopé-Oliveira, R. M., Wanke, B. (1987). "Distribution of sources of infection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in Rio da Prata, a municipality of Rio de Janeiro (RJ)." Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo **29**: 243-50.
- Zeidberg, L. D., L. Ajello, et al. (1952). "Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil." Am. J. Public. Health **42**(8): 930-5.
- Zola, H., Brooks, D. (1982). "Techniques for the production and characterization of monoclonal hybridoma antibodies." Monoclonal antibodies: Techniques and applications: 1-57.