

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – IPEC

Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

CLÁUDIA VERA PIZZINI

**Ferramentas proteômicas na identificação de novos alvos
antigênicos na proteína M do *Histoplasma capsulatum* e aplicação
em ensaios imunoenzimáticos**

Rio de Janeiro

2013

**Ferramentas proteômicas na identificação de novos alvos antigênicos na
proteína M do *Histoplasma capsulatum* e aplicação em ensaios
imunoenzimáticos**

CLÁUDIA VERA PIZZINI

Tese apresentada ao Curso de Doenças Infecciosas
do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
para obtenção do grau de Doutor em Pesquisa
Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Dr^a Rosely Maria Zancopé-Oliveira

Co-orientador: Dr. Salvatore Giovanni De Simone

Rio de Janeiro

2013

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

P695 Pizzini, Cláudia Vera

Ferramentas proteômicas na identificação de novos alvos antigênicos na proteína M do *Histoplasma capsulatum* e aplicação em ensaios imunoenzimáticos / Cláudia Vera Pizzini. – Rio de Janeiro, 2013.

xv, 87 f. : il.; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, 2013.

Bibliografia: f. 66-87

1. *Histoplasma capsulatum* 2. Imunodiagnóstico 3. Antígeno M 4. Epitopos I. Título.

CDD 579.565

Dedico este trabalho, aos meus pais, por tudo que me proporcionaram na vida, ao meu companheiro de cada dia Jonas, à minha filha Pietra, razão do meu viver, e aos colegas que me ajudaram durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pois sem ele com certeza não teria realizado este trabalho. Obrigado Pai pela oportunidade.

À Prof^a Dr^a Rosely Zancopé-Oliveira, pela orientação, confiança e oportunidade. Obrigada por entender minhas limitações e sempre me incentivar a continuar.

Ao Prof^o Dr. Salvatore De-Simone, pela coorientação e por ter permitido a utilização do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos- IOC-FIOCRUZ, para realização da técnica de Spot synthesis.

À Prof^a Dr^a Regina Helena Saramago Peralta, por disponibilizar o seu tempo me acompanhando durante toda a realização deste trabalho nas apresentações dos Seminários Científicos do Curso de Pós Graduação e contribuindo com sugestões para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof^o Dr. Giovani Verríssimo, por gentilmente ter me auxiliado na realização das metodologias realizadas neste trabalho (coimunoprecipitação e espectrometria de massas), obrigada por sua atenção.

Ao Prof^o Dr. José Mauro Peralta por permitir a utilização do Laboratório de Diagnóstico Imunológico e Molecular de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes –UFRJ, para realização de parte deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Micologia –setor imunodiagnóstico, Marcos, pela grande ajuda nas atividades de bancada, Manoel, por me ajudar nas brigas com o computador, e a Victor, Fernando, Luã, Leonardo, Lizandra, Jéssica e Gabriela pelas horas agradáveis de convívio e pelas risadas e incentivo.

Ao Prof^o Dr. Amigo Mauro de Medeiros Muniz por me ajudar desde o início da Iniciação Científica, me orientando e auxiliando nas atividades de bancada bem como nas discussões de resultados, durante esses vários anos de convívio, Valeu!!

Às amigas que não mais se encontram no Laboratório de Micologia, mas que fizeram parte do meu caminhar e que de alguma forma me incentivaram e ajudaram – Priscila e Patrícia.

Aos amigos do Laboratório de Micologia- Setor Diagnóstico Micológico, Helena, Mônica, Fábio e em especial ao Dr. Rodrigo que vi chegar ao laboratório, acompanhei seu crescimento profissional e hoje, conto com ajuda nas inúmeras discussões e esclarecimentos de dúvidas.

Ao Profº Drº Allan Jeferson Guimarães. É... como o mundo gira! Quando chegou ao laboratório pude participar da sua formação científica, hoje conto com sua ajuda na discussão de protocolos e resultados, obrigada Zezinho pela ajuda e paciência, ou melhor pelo grande auxílio e pela revisão deste trabalho, parabéns pelo profissional que se tornou.

Aos colegas do curso de pós graduação pelas horas de convívio e estudos.

Ao meu marido Jonas, meu grande presente de Deus, por sempre me apoiar, pela força nos momentos mais difíceis, pela confiança, carinho e acima de tudo pelo seu amor.

À minha filha Pietra, razão do meu viver, por entender minha ausência em alguns momentos e pelos muitos TE AMO.

À minha mãe, amor incondicional, que mesmo de forma indireta me ajudou neste trabalho, me socorrendo nos diferentes momentos da minha vida.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, IPEC – Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

Ao Laboratório UEMP (Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica) pela realização das análises por espectrometria de massas.

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

Pizzini, CV. **Ferramentas proteômicas na identificação de novos alvos antigênicos na proteína M do *Histoplasma capsulatum* e aplicação em ensaios imunoenzimáticos.** Rio de Janeiro, 2013.87 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas]. Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.

RESUMO

A histoplasmose é uma infecção que apresenta amplo espectro clínico, variando desde forma leves, a graves e disseminadas. O diagnóstico da histoplasmose baseia-se nos aspectos clínicos, radiológicos e epidemiológicos. A confirmação se dá pelo isolamento e identificação do *Histoplasma capsulatum* através de procedimentos microbiológicos. Diferentes metodologias já foram descritas no diagnóstico sorológico da histoplasmose, porém limitações relacionadas a reações cruzadas e limiar de detecção das técnicas empregadas podem dificultar o diagnóstico. O antígeno M obtido do extrato antigênico histoplasmina é considerado um antígeno imunodominante para produção de anticorpos, sendo reconhecido em cerca de 90% dos soros dos pacientes com histoplasmose, sendo assim nosso grupo vem trabalhando a vários anos em estudos para um melhor conhecimento desta molécula e aplicação no diagnóstico. Um Modelo molecular do antígeno M foi desenvolvido através de sua sequência, tendo então confirmada sua natureza biológica como catalase, sendo observado também que esta molécula apresentava regiões comuns bem como específicas quando comparadas a catalases de organismos eucariotas. No presente estudo procuramos determinar a presença de possíveis epitopos antigênicos na proteína M empregando ferramentas proteômicas, para posterior emprego em ensaios imunoenzimáticos. Para tal foi utilizada a combinação da técnica de coimunoprecipitação com espectrometria de massas e posteriormente a técnica de Spot synthesis. Com o emprego do anticorpo monoclonal (mAb 1A7) produzido contra a proteína M recombinante foi possível detectar uma sequência que foi comum as duas metodologias empregadas (PTKIIPEELVPFTP). Esta sequência encontra-se localizada na região onde em estudos anteriores por análise *in silico* foi apontada como a região mais antigênica desta molécula. Foi realizada a síntese desta sequência, e diferentes desenhos foram utilizados, extensão de resíduos de lisina e adição da molécula de biotina em ambas as extremidades, carboxi e amino terminal, bem como a síntese da sequência sem adição de outras moléculas. Diferentes desenhos de ensaios imunoenzimáticos foram realizados, um ELISA empregando microesferas carboxiladas, ELISA indireto empregando placas de microtitulação revestidas com estreptoavidina e um ELISA *sandwich*. A sequência não apresentou resultados satisfatórios nos diferentes ensaios. Observamos que apenas no ensaio onde utilizamos o peptídeo ligado a molécula de biotina 1-a e 1-b, foi possível obter um poder discriminatório entre o grupos de pacientes com histoplasmose e o grupos de indivíduos hígidos, o ponto de corte foi obtido pela media das DOs das amostras de indivíduos hígidos mais duas vezes o desvio padrão, onde este teste apresentou uma boa sensibilidade(100 - 95%), porém a especificidade encontrada não foi satisfatória (27 - 20%). Estes resultados não foram concordantes com a análise feita *in silico* da sequência sintetizada. O antígeno M recombinante foi testado em um ELISA de captura de antígeno, onde os resultados preliminares apresentaram-se promissores necessitando de novos testes para avaliarmos parâmetros como sensibilidade e especificidade.

Palavras-chaves: 1. *Histoplasma capsulatum*; 2. Epítapos; 3. Antígeno M; 4. Imunodiagnóstico

Pizzini, CV. **Proteomic tools to identify new targets in the M protein antigen of *Histoplasma capsulatum* and application to immunoassays**. Rio de Janeiro, 2013.87f. Dissertação [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas]. Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.

ABSTRACT

Histoplasmosis is a worldwide distribution infection with several clinical spectrum, from asymptomatic to severe and disseminated disease. The diagnosis of histoplasmosis is based on clinical, radiological and epidemiological findings. The laboratory diagnosis of histoplasmosis is based on fungus isolation by culture, direct examination in tissue or other clinical specimens. However, such procedures have limitations and are time-consuming. For these reasons serological tests play an important role on presumptive diagnosis. Although different methodologies have been described for serological diagnosis of histoplasmosis, cross-reactions and low sensitivity could difficult the final result. The M antigen is obtain by the antigenic extract histoplasmin and is considered as an immunodominant antigen recognized by 90% of sera from patients with histoplasmosis, For a better understanding of the molecule biological nature and its application in diagnosis methodologies our group has been working for several years. The molecular analysis of the M antigen was based on the sequence protein and confirmed as a catalase. It was also observed that this molecule showed specific and common polypeptide regions when compared to catalases from others eukaryotic organisms. In this study we evaluated the possible presence of antigenic epitopes in the M protein sequence that could represent potential candidate as diagnostic markers for histoplasmosis. For this reason we used the combining co-immunoprecipitations and mass spectrometry and spot synthesis technique. The application of a monoclonal antibody against to the M antigen (mAb 1A7) produced by our group allowed the detection of a same sequence in both employed methodologies (PTKIIPEELVPFTP). This was synthesized with different conformations, addition lysine residues and biotin molecules in both amino and carboxy terminal regions. Different immunoassays were performed, carboxylated microspheres, ELISA indireta with microplate coated with streptoavidin and ELISA *sandwich*. The sequence did not show good specificity and sensibility in different tests. A good discriminatory power was possible when the peptide biotin molecule bind (P1-a and P1-b) was used in serum samples from groups of histoplasmosis patients and healthy controls. This test showed a high sensitivity (100-95%), however the specificity was not satisfactory (27-20%) respectevily. The ELISA's cut-off points were established as the mean of absorbances plus two standard deviation of the healthy controls. The immunoassay's results were discordant when compared on in silico analysis using as antigen the synthesized sequence. In another approach, the M antigen was tested in an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISAs) and promising results were observed, but further studies must be done in order to evaluate parameters such as sensitivity and specificity.

Keywords: 1. *Histoplasma capsulatum*; 2. Epitopes; 3. M Antigen; 4. Imunodiagnostic.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac- anticorpo

mAb- Anticorpo monoclonal

AGS1- α -glucan synthase (α -glucana sintetase)

Ag- Antígeno

BCIP- 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato

BHI- Brain heart infusion (Infusão cérebro coração)

BSA- Soro albumina bovina

BTN- Biotina

CAT P- Catalase P

cAMP- Adenosina 3', 5'-cíclica monofosfato

CBP- Calcium binding protein (Proteína ligante de cálcio)

CYA- Antígeno citoplasmático da fase leveduriforme de *Histoplasma capsulatum* (CYL)

DCM- Diclorometano

DIC- Diisopropylcarbodiimida

DMF- N,N-Dimetilformamida

DMP- Dimethyl pimelimidate (Dimetil pimelidato)

DNA- Ácido Desoxirribonucléico

DOPA- 3-4-dihidroxifenilalanina

EDC-1-Hidrocloro de Carbodiamida ethyl -3-(3dynethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride

EDTA- Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra- acético)

ELISA- Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensaio imunoenzimático)

EUA- Estados Unidos da América

HAT- Hipoxantina

HE- Hematoxilina-eosina

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HMIN-PT- Antígeno histoplasmina purificado e tratado

HOBt- Hidroxibenzotriazol

HPA- Antígeno polissacáride de *H. capsulatum*

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência

HSP- Heat shock protein (Proteína de choque térmico)

ID- Imunodifusão dupla

IFN- γ - Interferon gama

IPEC- Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

IPTG- Isopropylthio- β -galactoside

ITS- Internal Transcribed Spacer (Espaços transcritos interno do DNA ribossomal)

LB- Luria Bertani

mtDNA- DNA mitochondrial

MW- Molecular weight (peso molecular)

MES- 2- Morfolinoetanolsulfônico

MS/MS- Espectrometria de massas

NaIO₄- Metaperiodato de Sódio

NBT- Nitroblue tetrazolium

NHS- Soro humano normal

NMP-N-N 1-metil-2-pirrolidona

OPD- dihidrocloro de o-fenilenodiamina

OVA- Ovalbumina

PAS - Periodic Acid-Schiff

PBS- Phosphate buffer saline (Tampão fosfato)

PCR- Reação em cadeia da Polimerase

RAPD- Random amplification of polymorphic DNA (Polimorfismo de DNA gerados por sequencias iniciadores randômicas)

rDNA- DNA ribossomal

RIA- Radioimunoensaio

RFC- Reação de Fixação de complemento

RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism (Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição)

RNA-Ácido Ribonucléico

rRNA- RNA ribossômico

SDS- Sódio dodecil sulfato

SID1- Gene sideróforo

TFA- Ácido trifluoroacético

TNF- α - Fator de necrose tumoral

UEMP- Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica

YPS- (Yeast Phase Specific Gene) Gene específico da fase leveduriforme

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Histoplasma capsulatum</i>	1
1.2 <i>Epidemiologia</i>	4
1.2.1 <i>Epidemiologia molecular</i>	6
1.3 <i>Patogenia</i>	9
1.4 <i>A Infecção/doença</i>	10
1.4.1 <i>Infecção subclínica</i>	10
1.4.2 <i>Histoplasmose Aguda</i>	11
1.4.3 <i>Histoplasmose Pulmonar Crônica</i>	11
1.4.4 <i>Histoplasmose Disseminada</i>	12
1.4.4.1 <i>Histoplasmose disseminada aguda (tipo infantil)</i>	12
1.4.4.2 <i>Histoplasmose disseminada subaguda (tipo juvenil)</i>	13
1.4.4.3 <i>Histoplasmose disseminada crônica (tipo adulto)</i>	13
1.4.4.4 <i>Histoplasmose oportunística</i>	13
1.5 <i>Fatores de virulência</i>	14
1.6 <i>Diagnóstico</i>	19
1.6.1 <i>Exame direto e cultura</i>	19
1.6.2 <i>Diagnóstico histopatológico</i>	20
1.6.3 <i>Teste de exoantígeno</i>	21
1.6.4 <i>Imunodiagnóstico</i>	21
1.6.4.1 <i>Detecção de anticorpos</i>	22
1.6.4.2 <i>Detecção de antígeno</i>	24
1.6.5 <i>Teste cutâneo intradérmico com histoplasmina</i>	26
1.6.6 <i>Métodos Moleculares</i>	26
1.7 <i>Antígeno M</i>	28
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3- OBJETIVO	32
3.1 <i>Objetivo Geral</i>	32
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	32
4-MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 <i>Expressão e Purificação da Proteína M recombinante</i>	33
4.2 <i>Dosagem de proteínas</i>	34
4.3 <i>Produção de anticorpos monoclonais (mAbs)</i>	34
4.3.1 <i>Isotipagem dos mAbs</i>	35
4.3.2 <i>Avaliação da afinidade e especificidade dos mAbs</i>	35
4.3.3 <i>Imunoblot</i>	35

4.4	<i>Coimunoprecipitação de proteínas e análise por espectrometria de massas</i>	36
4.4.1	Ligação do anticorpo	36
4.4.2	Reação de imunoprecipitação	37
4.4.3	Digestão e eluição dos epitopos	38
4.5	<i>Mapeamento dos determinantes antigênicos na proteína M- Spot Synthesis</i>	38
4.5.1	Ensaio imunológico	40
4.6	<i>Síntese química de peptídeos</i>	41
4.7	<i>Amostragem</i>	42
4.8-	<i>Ensaio imunoenzimáticos</i>	43
4.8.1	ELISA com microesferas carboxiladas	43
4.8.1.2-	Reação imunoenzimática com microesferas carboxiladas	44
4.8.2	ELISA com peptídeos biotinilados	45
4.8.3	ELISA <i>sandwich</i> para detecção de anticorpos	46
4.8.4	ELISA de captura para detecção de antígeno	47
4.9	<i>Análise dos resultados</i>	47
5	RESULTADOS	48
5.1	<i>Expressão e purificação do antígeno M recombinante</i>	48
5.2	<i>Dosagem de proteínas</i>	49
5.3	<i>Anticorpos monoclonais</i>	49
5.3.1	Isotipagem dos anticorpos monoclonais	49
5.3.2	Análise dos anticorpos monoclonais	49
5.3.2.1	Afinidade dos anticorpos monoclonais	50
5.4	<i>Coimunoprecipitação de proteínas e análise por espectrometria de massas</i>	51
5.5	<i>Mapeamento dos determinantes antigênicos na proteína M por Spot Synthesis</i>	53
5.6-	<i>Síntese de peptídeos</i>	54
5.7	<i>Ensaio imunoenzimáticos</i>	54
5.7.1	ELISA com microesferas carboxiladas	54
5.7.2	ELISA com peptídeos biotinilados	55
5.7.3	ELISA <i>sandwich</i> para detecção de anticorpo	57
5.7.4	ELISA captura para detecção de antígeno	58
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÕES	65
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Histoplasma capsulatum*

A histoplasmose é uma doença fúngica sistêmica e cosmopolita que tem como agente etiológico *Histoplasma capsulatum*. Este organismo é um fungo dimórfico, que pode ser encontrado no meio ambiente na forma filamentosa, como saprófita de solos.

H. capsulatum foi isolado pela primeira vez próximo a um galinheiro (AJELLO et al., 1951; ZEIDBERG et al., 1955), e desde então, tem sido encontrado em cavernas, galinheiros, locais habitados por aves e morcegos onde os solos são enriquecidos com as fezes desses animais, e onde há condições de umidade, temperatura e acidez ideais à sobrevivência desse microrganismo (EISSENBERG, 1991; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013). A relação com fezes desses animais é devida ao alto teor de ácido úrico encontrado nestes excrementos, sendo este componente utilizado como fonte de nitrogênio pelo fungo, imprescindível ao seu crescimento e proliferação. Furcolow (1958) relacionou a temperatura de 22 a 29 °C e umidade de 67 a 87 % com a maior presença e isolamento deste fungo no solo. Tentativas de isolamento diretamente de aves foram infrutíferas, sugerindo a não ocorrência de infecção natural nestas espécies, sendo consideradas carreadoras do fungo e podendo disseminá-lo para outros ambientes por meio de seus pés, penas, asas e bicos. Já os morcegos atuam como reservatórios do fungo, uma vez que se infectam, abrigam o microrganismo em sua mucosa intestinal, disseminando-o em suas fezes (TAYLOR et al., 2005). Muitas outras espécies animais podem se infectar com o *H. capsulatum*. Entre os animais domésticos, a histoplasmose tem sido diagnosticada em cães, gatos, cavalos, bovinos e suínos, apresentando uma variedade de formas clínicas, desde a pulmonar benigna até a doença disseminada. *H. capsulatum* também tem sido isolado de animais silvestres como roedores e marsupiais entre outros (CANO; HAJJEH, 2001; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013).

Com raras exceções, este fungo infecta seu hospedeiro por via respiratória. Em parasitismo, ou a partir de espécimes clínicos em cultivo a 37 °C em meio de cultura apropriado *H. capsulatum* se apresenta como leveduras unibrotantes.

H. capsulatum é o anamorfo (fase assexuada) do teleomorfo *Ajellomyces capsulatus*. Pertence ao filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família

Ajellomycetaceae (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; UNTEREINER et al. 2004). Com base nas características fenotípicas deste fungo, considera-se que a espécie *H. capsulatum* englobe três variedades distintas: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, agente da histoplasmose capsulata ou clássica, *H. capsulatum* var. *duboisii*, agente da histoplasmose africana, ambas variedades heterotáticas, com *mating type* (+) e (-) e que se reproduzem sexualmente para formar o teleomorfo *Ajellomyces capsulatus* e por último *H. capsulatum* var. *farciminosum*, agente etiológico da linfangite epizoótica em cavalos e mulas, que ocorre na Europa, África, Japão e Ásia (CHANDLER et al., 1980; MARESCA; KOBAYASHI, 1989). A variedade *capsulatum* é a de maior importância em nosso meio devido a sua distribuição geográfica, e é responsável pela maioria dos casos de histoplasmose no mundo.

Esta doença foi pela primeira vez descrita por Samuel Darling, no Panamá, que entre 1905 e 1906 necropsiou três casos disseminados da doença, dois dos quais provenientes da Ilha de Martinica, onde hoje esta micose é reconhecidamente endêmica. A doença descrita por este patologista era similar à leishmaniose visceral e, portanto, foi por ele considerada erroneamente causada por um protozoário encapsulado. Em 1912, o patologista Henrique da Rocha Lima, revendo o material de Darling, suspeitou pela primeira vez ser o parasito descrito por Darling um fungo e, por conseqüência, a histoplasmose uma micose (De ROCHA LIMA, 1912). O primeiro caso diagnosticado em vida propiciou a comprovação definitiva de esta doença ser causada por um fungo dimórfico após a obtenção do seu cultivo *in vitro* (De MOMBREUN, 1934).

Morfologicamente *H. capsulatum* variedade *capsulatum* e *H. capsulatum* variedade *duboisii*, são indistinguíveis em sua forma miceliana, mas diferem na forma leveduriforme; na variedade *duboisii*, as células são maiores e têm paredes mais espessas que na variedade *capsulatum*. Em ágar Sabouraud, à temperatura ambiente, o micélio cresce na forma de uma colônia branca aérea. Microscopicamente, o micélio é hialino, ramificado e septado de 2 a 4 µm de diâmetro que contém microconídios, piriformes e de paredes lisas, medindo 2 a 5 µm de diâmetro, assim como macronídios tuberculados, medindo de 8 a 16 µm de diâmetro e cobertos por projeções espiculadas (PINE, 1960; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013)[Fig 1A , 1B].

A 37 °C, *H. capsulatum* var. *capsulatum* apresenta-se como leveduras de 2 a 5 µm de diâmetro, ovaladas que frequentemente apresentam gemulação única (Figura 2A, 2B). Esses elementos leveduriformes podem ser visualizados em parasitismo no interior dos macrófagos ou

células gigantes e mais raramente no interior dos polimorfonucleares. Na coloração de Giemsa (ou *Wright*), *H. capsulatum* apresenta uma massa cromática polar, azul e forma de meia lua. Corados pelo PAS (Periodic Acid-Schiff), apresentam-se com cor vermelha e pela prata metenamina de Grocott, com cor negra ou marron-escura (FERREIRA, BORGES, 2009; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013).

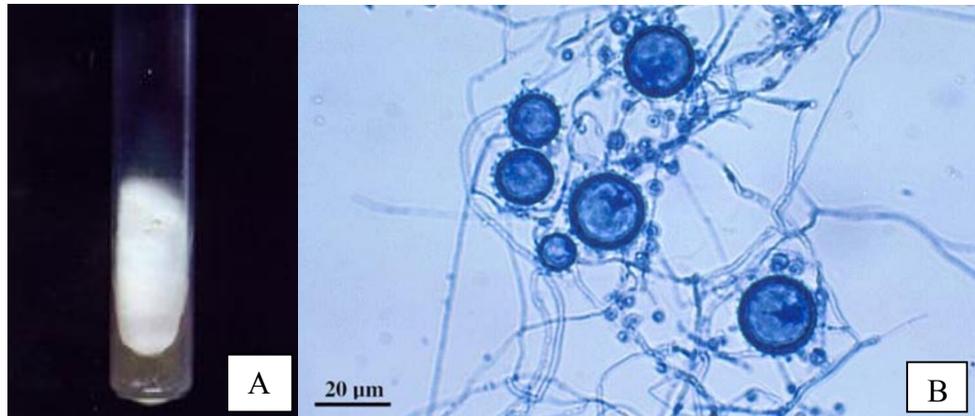


Figura 1: *Histoplasma capsulatum* na forma miceliana: (A) Aspecto macroscópico de cultura a 25 °C com colônias branca, cotonosa (B) Microscopia em lâmina mostrando hifas hialinas, macro e microconídeos. Fonte: http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/dimorphic_fungi/

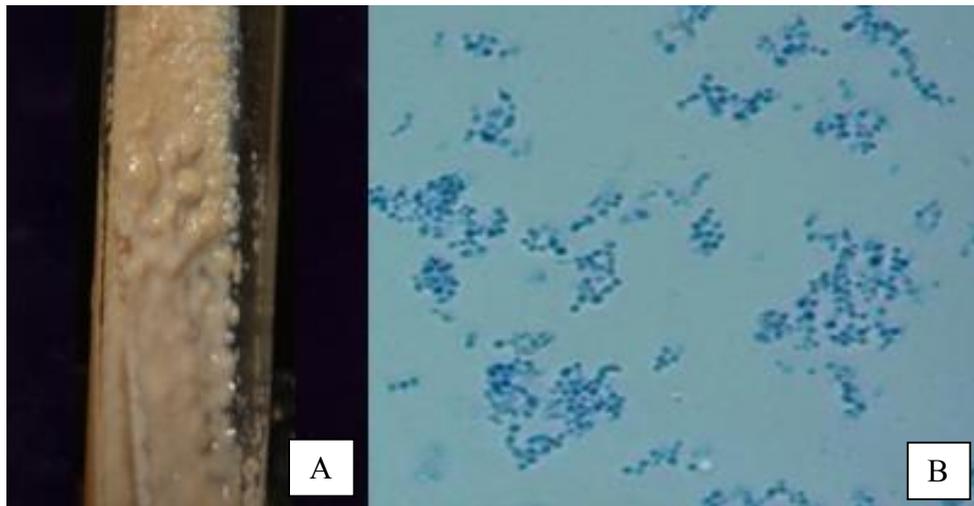


Figura 2: *Histoplasma capsulatum* na forma leveduriforme: (A) Aspecto macroscópico da cultura a 37 °C (B) Microscopia em lâmina mostrando leveduras unibrotantes. Fonte: o autor- Laboratório de Micologia – Setor Imunodiagnóstico – IPEC-Fiocruz.

1.2 Epidemiologia

A ocorrência da histoplasmose em nosso meio se dá pela observação de casos clínicos autóctones seja sob a forma de casos isolados ou sob a forma de microepidemias, bem como pela realização de inquéritos epidemiológicos empregando o teste cutâneo da histoplasmina. (LACAZ, 2002; RODRIGUES, 2004; VICENTINI-MOREIRA et al., 2008). Contudo, sua real prevalência/incidência encontra-se subestimada, possivelmente pela falta de métodos de diagnóstico mais eficientes, associada a não obrigatoriedade de notificação dos casos confirmados clínica e/ou laboratorialmente aos órgãos de saúde.

A ocorrência de histoplasmose é comum em exploradores de cavernas e pessoas que trabalham com construção ou reforma de lugares habitados por morcegos ou aves (CANO; HAJJEH, 2001). O distúrbio de solos e locais onde existem elevadas concentrações de excretas desses animais podem dar origem a surtos epidêmicos ou microepidêmicos, que diferem em sua magnitude quanto ao tamanho da carga parasitária inalada, virulência da cepa e *status* imunológico do indivíduo (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

A histoplasmose é uma infecção severa e frequente em indivíduos infectados pelo HIV que residem em áreas endêmicas. Nestas áreas, 10 a 25 % de indivíduos infectados pelo HIV poderão desenvolver histoplasmose disseminada (www.CDC.gov/fungal/histoplasmosis). A doença disseminada, na sua grande maioria (70 – 90 %), está associada à infecção pelo HIV (WHEAT et al., 1990; JAIMES et al., 2013). A histoplasmose disseminada tem sido considerada uma doença definidora de AIDS desde 1987 (KAUFFMAN, 2007).

A histoplasmose apresenta ampla distribuição geográfica, tendo-se detectado casos autóctones em mais de 60 países (NEGRONI, 2005). No entanto, apresenta nítido predomínio nas Américas, leste da Ásia, Oceania e na África Subsariana (FARINA et al., 2005). É uma das micoses de maior importância no continente americano devido ao seu grau de endemicidade, onde as áreas mais importantes se situam nos vales do Rio Mississipi, Missouri e Ohio na América do Norte; já na América do Sul na Bacia do Rio Prata e na Serra do Mar (NEGRONI, 2005). Em uma pequena cidade de Indianápolis, EUA, ocorreu uma das maiores epidemias de histoplasmose, logo após o desmatamento de um bosque. Por dispersão eólica através da poeira, *H. capsulatum* foi levado a prédios vizinhos resultando em 120.000 pessoas presumivelmente

infectadas, 488 casos da doença e 60 casos fatais ou com histoplasmose muito grave (WHEAT et al., 1982).

Na Europa há relatos de casos de histoplasmose, mas quase sempre estes são relacionados com viagens a zonas endêmicas (FLOR et al. 2003; BUITRAGO et al., 2011). No estudo de Petres e cols (2006), relata-se que de 2000 a 2006, nos países baixos, ocorreram 14 casos de histoplasmose em pacientes infectados por HIV, dos quais apenas um era nascido neste país e, os demais provenientes de zonas endêmicas da África e da América do Sul, desenvolvendo uma reativação da infecção devido a um comprometimento imunológico.

Diversos inquéritos com o teste cutâneo usando histoplasmina revelaram uma prevalência bastante significativa da histoplasmose-infecção. No Brasil, esta infecção é endêmica em várias regiões, sendo que casos de doença e/ou infecção têm sido relatados nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Goiás, Amazonas, Bahia, Pará e Pernambuco (LACAZ et al., 2002; RODRIGUES, 2004; VICENTINI-MOREIRA et al., 2008). O Estado do Rio de Janeiro apresenta áreas com altos índices de infecção, sendo consideradas endêmicas ou hiperendêmicas (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2005). A prevalência desta infecção na região sudeste é de 4,6 – 93,2 % [Fig. 3] (GUIMARÃES et al., 2006-b).

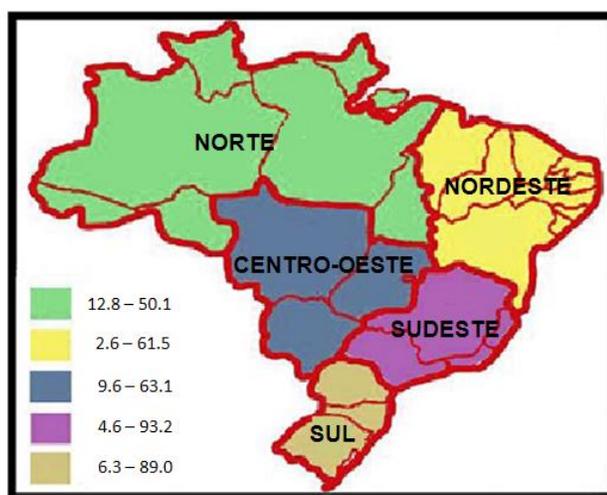


Figura 3: Distribuição da histoplasmose no Brasil indicada pela positividade obtida nos testes intradérmicos com antígeno histoplasmina (%) (Adaptado Guimarães et al., 2006-b).

1.2.1 Epidemiologia molecular

Em 1986, Vincent e colaboradores realizaram estudos epidemiológicos de *H. capsulatum* pelo método de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Vinte e uma amostras de *H. capsulatum* isoladas de humanos e de animais foram agrupadas em três classes, com base no polimorfismo de seu DNA mitocondrial (mtDNA) e DNA ribossomal (rDNA). Cepa Down foi classificada como Classe 1. Classe 2 foi formada por 14 amostras de *H. capsulatum* var. *capsulatum* isolados da América do Norte e dois *H. capsulatum* var. *duboisii* da África; a Classe 3 incluiu 4 isolados das Américas Central e do Sul (VINCENT et al., 1986).

Spitzer e colaboradores ampliaram os estudos de tipagem de cepas de *H. capsulatum* através de RFLP de seus mtDNA e rDNA, agrupando isolados clínicos e de solo em quatro classes (SPITZER et al., 1989). As Classes 1 e 3 correspondem à classificação de Vincent e colaboradores (1986), enquanto que os isolados de solo, procedentes de sete sítios geográficos diferentes nos EUA, mostraram perfis indistinguíveis da maioria de *H. capsulatum* provenientes de pacientes e por isso foram incluídas na Classe 2 (SPITZER et al., 1989). Somente um isolado de solo da Flórida representou a Classe 4.

Estudo posterior de isolados de *H. capsulatum* procedentes de pacientes com histoplasmose disseminada associada a aids na cidade de St. Louis, Missouri, demonstrou padrões de RFLP do mtDNA hibridizados com sonda yps-3 idênticos aos observados na cepa Down (Classe 1), isolada do mesmo local há vários anos (GASS; KOBAYASHI, 1969). Este fenômeno foi confirmado pelas características fenotípicas destes isolados, como a incapacidade deste isolado e da cepa Down em crescer a 40 °C. Por outro lado, as amostras de *H. capsulatum* isoladas de histoplasmose disseminada ou pulmonar crônica em pacientes imunocomprometidos, mas não portadores do HIV, foram agrupados na Classe 2, que também inclui a maioria dos isolados clínicos de diferentes regiões dos EUA (SPITZER et al., 1990).

Muniz e colaboradores, 2010 objetivando explorar a diversidade dos isolados de *H. capsulatum* no Brasil analisaram isolados de solos, animais e humanos utilizando três diferentes métodos moleculares: M13 PCR *fingerprinting*, PCR-RFLP e análise da sequência parcial de quatro genes codificadores das proteínas (*Arf- ADP ribosylation factor*, *H -anti- H antigen precursor*, *Ole-delta-9 fatty acid desaturase* e *Tub1-alpha-tubulin*) para análise filogenética. Tais metodologias permitiram agrupar os isolados dentro dos três principais grupos moleculares (tipos

I, II e III), onde foi possível observar 85 % de concordância por regiões geográficas. Com os 15% restantes não foi possível demonstrar um genótipo exclusivo para uma dada região geográfica, sugerindo que a ocorrência de migração e viagens por outros estados tenha sido uma provável fonte de infecção primária. Entretanto os isolados do estado do Rio de Janeiro foram agrupados em um clado sugerindo um único grupo clonal circulando nesse estado. Neste estudo as três metodologias empregadas tiveram sensibilidades similares.

Em 1992, Keath e colaboradores ampliaram o conhecimento em torno da epidemiologia molecular da histoplasmose em indivíduos imunocomprometidos. Isolados provenientes de um surto epidêmico de histoplasmose em indivíduos com aids ocorrido em Nova York, EUA, onde a histoplasmose não é endêmica, foram estudados com o objetivo de determinar se a histoplasmose destes pacientes resultava da reativação endógena de uma infecção previamente adquirida. Os autores utilizaram para classificar os isolados, os padrões de RFLP de DNA genômico e por *Southern blot* gerado com duas sondas para *H. capsulatum*, uma de DNA mitocondrial (mtDNA) e outra de um fragmento de 1,85 kb obtido por digestão do gene *YPS-3* com a enzima *HindIII*. Tanto os isolados obtidos de pacientes com aids bem como os procedentes de outras fontes foram agrupados em diferentes classes. Os isolados do Panamá foram também incluídos na Classe 5, mas mostraram um perfil distinto de mtDNA que constituíram a subclasse 5a. Cinco amostras de *H. capsulatum* isoladas de pacientes com aids residentes em Nova York e procedentes de Porto Rico foram agrupados na Classe 5, com base no polimorfismo revelado pela sonda *yps-3*. Estes isolados originaram dois padrões diferentes de mtDNA designados como subclasses 5b e 5c. Além disso, um isolado de um paciente residente em Missouri e procedente da América Central foi sub-classificado como 5d (KEATH et al., 1992). Este estudo permitiu ampliar as classificações anteriores, (VINCENT et al., 1986; SPTIZER et al., 1989) inserindo também uma sexta classe que foi obtida de um paciente com aids do Panamá que tinha um perfil único. Além disso, sugeriu a existência da reativação endógena em casos de histoplasmose associada a aids diagnosticado em áreas não endêmicas.

Várias análises filogenéticas por técnicas moleculares da ordem Onygenales têm fornecido dados sobre a relação taxonômica entre os fungos dimórficos. Estudos iniciais baseados em genes codificadores da subunidade 18S do RNA ribossomal demonstraram uma relação filogenética muito próxima entre *H. capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* utilizando três

métodos moleculares, sequenciamento de DNA ribossômico, avaliação dos perfis do DNA nuclear (“melting profiles”) e hibridização DNA/DNA, com construção de uma árvore filogenética para esta ordem, onde um ramo abrange somente o gênero *Histoplasma*, separando-o dos outros agentes das micoses sistêmicas (GUEHO et al., 1997). Um estudo de 46 amostras do gênero *Histoplasma*, baseado no sequenciamento de quatro genes codificadores das proteínas ARF, H ANTI, OLE e TUB sugere que *H. capsulatum* poderia ser considerado como 6 espécies ao invés de 3 variedades (KASUGA et al., 1999).

Um estudo realizado no Rio de Janeiro/RJ utilizando a técnica de RAPD (*Random amplification of polymorphic DNA*) comparando cepas locais com cepas da América do Norte demonstrou menos de 70% de similaridade entre os grupos. As cepas da mesma área geográfica apresentaram 100% de similaridade, sugerindo que o micronicho ecológico tem papel importante na adaptação e diferenciação de *Histoplasma*. Neste mesmo estudo, todos os isolados provenientes de pacientes HIV+, em diferentes coletas de espécimes clínicos, apresentaram os mesmos genótipos, possivelmente estes indivíduos foram parasitados por uma única população genética. (MUNIZ et al., 2001).

Parâmetros demográficos e clínicos de pacientes com aids e histoplasmose de um estado brasileiro foram comparados com uma população semelhante nos EUA e isolados sulamericanos (KARIMI et al., 2002). Neste estudo, a tipagem molecular do gene nuclear *YPS-3* revelou que isolados brasileiros se agrupavam entre os sul americanos Classe 5 e 6, e o RAPD mostrou 18 perfis genéticos distintos em 20 isolados. Como os isolados Classe 5 e 6 foram mais associados a lesões de pele na histoplasmose do que isolados Classe 2, sugeriu-se que diferenças genéticas poderiam estar correlacionadas a manifestações clínicas (KARIMI et al., 2002).

Análise filogenética de 137 representantes das três variedades de 6 continentes usando variação na sequência de DNA de genes codificadores de 4 proteínas independentes foram analisadas. Pelo menos 8 clados foram identificados: (i) Clado Norte americano classe 1; (ii) Norte americano classe 2; (iii) Clado Latino americano grupo A; (iv) Clado Latino americano grupo B; (v) Clado Australiano; (vi) Clado Netherlands (Indonesian?); (vii) Clado Eurásia; e (viii) Clado Africano. Sete dos oitos ramos filogenéticos representaram grupos geneticamente isolados que poderiam ser reconhecidos como espécies filogenéticas. A única exceção foi o clado da Eurásia o qual foi classificado dentro do ramo latino americano grupo A. *H. capsulatum*

distintos foram encontrados em todos os oito clados. O clado Africano incluiu todos os *H. capsulatum* var. *duboisii* bem como as outras variedades. Os 13 isolados, da variedade *farcinosum*, foram distribuídos entre as 3 espécies filogenéticas. Estes achados sugerem que as três variedades de *Histoplasma* são filogeneticamente sem sentido. Em vez disso, deve-se reconhecer a existência de populações geneticamente distintas ou diferentes espécies filogenéticas. Combinando a média de substituição dos genes codificadores com a filogenia sugeriu-se que a irradiação de *H. capsulatum* começou entre 3 e 13 milhões de anos atrás na América Latina (KASUGA et al., 2003).

1.3 Patogenia

O início da infecção por *H. capsulatum* depende de uma complexa interação entre o fungo e seu hospedeiro e, pelo menos, três fatores governam a patogenia desta micose. O desenvolvimento de infecção assintomática ou sintomática na histoplasmose é diretamente dependente da competência imunológica do hospedeiro, da virulência da cepa infectante e/ou da carga parasitária adquirida. Células T e fagócitos representam a principal resistência do hospedeiro contra *H. capsulatum*. A imunidade protetora é caracterizada pela produção de citocinas por células T, particularmente IFN- γ e TNF- α , o qual ativa subsequentemente as células fagocíticas e liberação de mediadores químicos como H₂O₂ e NO⁻ que expõem 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 de macrófagos alveolares (BULLOCK; WRIGHT, 1987; SCHUNUR; NEWMAN, 1990).

As células efetoras primárias da resistência do hospedeiro ao *H. capsulatum* são os macrófagos e células dendríticas. A infecção por *H. capsulatum* se inicia após a inalação e deposição das partículas infectantes, os microconídios, dentro dos alvéolos. Este evento é seguido pela conversão destas partículas em leveduras, o qual é estimulado pela temperatura, e tem sido considerado como fator crítico para a patogenicidade de *H. capsulatum* (ARAVALLI et al., 2008; LÓPEZ, 2006; MEDOFF et al., 1986-a). Nos alvéolos, estes organismos se incorporam ao parênquima pulmonar através da migração de macrófagos alveolares, bem como de polimorfonucleares, determinando pneumonia intersticial. Este processo de transição pode começar dentro de algumas horas a alguns dias após a exposição. Fagócitos repletos de *H.*

capsulatum migram então para os linfonodos adjacentes onde novo foco inflamatório é formado, constituindo complexo pulmonar primário. Posteriormente há ocorrência de disseminação hematogênica para outros órgãos como fígado, baço e medula óssea entre outros. Cerca de 10 a 18 dias após o início da infecção primária ativa-se a imunidade celular, formação de granuloma, delimitando o processo tanto nos focos primários como nos secundários. Esta reação granulomatosa é seguida de necrose de caseificação, encapsulamento fibroso e frequente depósito de sais de cálcio nas lesões residuais. O controle da infecção parece estar associado com a ativação da imunidade celular, e a resolução da infecção é coincidente com a ativação e proliferação de linfócitos T. Alterações na resposta imune podem levar à progressão da doença. Após a infecção primária, *H. capsulatum* pode persistir viável no interior dos granulomas durante anos. A replicação do fungo pode ser reativada de um foco quiescente, principalmente, com a quebra da imunidade do hospedeiro por agentes farmacológicos que deprimem a imunidade celular ou por doenças concomitantes como a AIDS, linfoma e leucemias (DEEPE, 2000). Assim, reativação endógena pode explicar casos de histoplasmose disseminada em indivíduos imunocomprometidos residentes em áreas de baixa endemicidade, mas que anteriormente viveram em áreas endêmicas (WHEAT, KAUFFMAN, 2003).

1.4 A Infecção/doença

Na maioria dos casos, a histoplasmose é subclínica, ou então branda, a ponto de passar até sem diagnóstico na rotina clínica. Também pode se manifestar na forma aguda, mas em geral apresenta resolução espontânea. Já as formas disseminadas, cavitárias e crônicas tendem a progredir e até causar óbito (ZOMBONI et al., 2004).

1.4.1 Infecção subclínica

Atinge hospedeiros imunocompetentes nas áreas endêmicas, onde até 95 % ou mais das infecções primárias e de reinfecção não são reconhecidas. Pode ser observada através da conversão de reações intradérmicas a histoplasmina, de negativa para positiva, evidências radiológicas com nódulos pulmonares calcificados, infiltrados pulmonares ou linfadenomegalias hiliares ou mediastinais, lesões onde pode se observar a presença de *H. capsulatum* em cortes

histológicos, obtidos de biópsia e detecção de anticorpos através de reações sorológicas (SIDRIN; ROCHA, 2004; ROSSINI; GOULART, 2006 ; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013).

1.4.2 Histoplasmose Aguda

A gravidade varia em função da faixa etária, carga parasitária inalada e estado prévio de sensibilização do hospedeiro ao fungo. As manifestações são mais intensas em lactentes, crianças de baixa idade e adultos acima de 55 anos provenientes de áreas endêmicas. A doença aguda, que resulta da infecção primária, regride mais frequentemente, de modo espontâneo, no decorrer de três a seis semanas, mas pode provocar complicações precoces e tardias (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013). A forma pulmonar aguda se manifesta por febre, calafrios, cefaléia, tosse improdutiva, dor torácica pleurítica ou subesternal, mal-estar e mialgia, podendo ser confundida com uma doença gripal. O período de incubação varia de 10 a 18 dias ou mais nos indivíduos que têm primoinfecção. Entretanto, nos casos de reinfeção, esse período é bem mais curto, variando de 3 a 7 dias. Os sintomas desaparecem habitualmente sem tratamento em duas semanas entretanto em alguns casos podem durar mais de seis semanas (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013). Esta forma de histoplasmose raramente apresenta-se fatal (LACAZ et al., 2002; UNIS et al., 2005). Radiologicamente, caracteriza-se por pequenas áreas de pneumonite em meio a infiltrado intersticial difuso. Linfadenomegalia hilar é um achado frequente, diferenciando a histoplasmose das pneumonias bacterianas e virais (LACAZ et al., 2002).

1.4.3 Histoplasmose Pulmonar Crônica

A histoplasmose pulmonar crônica está relacionada à presença de enfisema centrolobular ou bolhoso ou defeito anatômico estrutural que favorece a instalação do foco inicial da doença. Com frequência, assemelha-se à tuberculose quanto à sintomatologia e manifestações radiográficas. A colonização dos espaços aéreos determina a produção local de material líquido rico em elementos fúngicos que, por disseminação, causam focos de pneumonite segmentar, ocasionando fibrose pulmonar progressiva. Incide geralmente em homens, a partir da terceira década de vida, residentes em áreas endêmicas (LACAZ et al., 2002; SIDRIM e ROCHA, 2004; UNIS et al., 2005; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013).

1.4.4 Histoplasmose Disseminada

A histoplasmose disseminada é definida pela presença de foco extrapulmonar e extraganglionar mediastínicos de curso progressivo. Representa a forma menos comum de histoplasmose (10 % dos casos), desenvolve-se principalmente em indivíduos com imunidade deficiente, tais como lactentes com sistema imune imaturo; hospedeiros imunocomprometidos, receptores de órgãos tratados com corticóides e indivíduos infectados pelo HIV. Casos de histoplasmose ocorridos após transplante de órgãos já foram identificados, nestes casos o diagnóstico é geralmente estabelecido através da obtenção da cultura, histopatologia, teste de detecção de antígeno na urina e testes sorológicos (RODRIGUES et al., 2009). A histoplasmose disseminada ocorre em aproximadamente 5 % dos pacientes com AIDS que vivem em área não endêmica e 27 % dos pacientes que vivem em área endêmica (RAMOS E SILVA et al., 2012). Esta forma pode ser dividida em quatro subtipos, que são: histoplasmose disseminada aguda (tipo infantil), histoplasmose disseminada subaguda (tipo juvenil), histoplasmose disseminada crônica (tipo adulto) e histoplasmose oportunística (GOLDMAN e BENNETT, 2001; KAUFFMAN, 2009).

1.4.4.1 Histoplasmose disseminada aguda (tipo infantil)

A histoplasmose disseminada aguda acomete frequentemente crianças com menos de dois anos de idade. Tem início súbito e gradual, sendo geralmente precedida pela histoplasmose aguda. Febre, irritabilidade, fadiga progressiva, perda de peso e tosse são os sintomas iniciais. Em seguida surgem diarreia, vômitos e aumento do volume abdominal (hepatoesplenomegalia) e presença de linfadenomegalias superficiais. Em exames radiológicos podem ser evidenciadas lesões sugestivas de infecção primária ou quadro de pneumonia intersticial. Se não diagnosticada e não tratada corretamente, essa forma evolui para o óbito em cerca de duas a cinco semanas (BORGES et al. 1997; GOLDMAN e BENNETT, 2001; SIDRIN e ROCHA, 2004).

1.4.4.2 Histoplasmose disseminada subaguda (tipo juvenil)

Mais comum em adultos jovens, atinge ocasionalmente crianças e adolescentes que adquirem alta carga parasitária de *H. capsulatum*. Manifesta-se por febre moderada e intermitente, mal-estar, astenia, adinamia e emagrecimento progressivo. Lesões focais destrutivas são muito comuns e frequentemente dominam o quadro clínico. Hepato e esplenomegalia são muito comuns. Esta forma geralmente evolui para óbito em meses ou anos se não for diagnosticada e tratada corretamente (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013).

1.4.4.3 Histoplasmose disseminada crônica (tipo adulto)

Predomina em adultos acima de 40 anos de idade e apresenta lesões das vias aéreas e digestivas superiores em cerca de 70 % dos casos. Por vezes essas lesões são a única manifestação e nas áreas endêmicas sugerem a micose. As lesões podem regredir espontaneamente e reaparecer no mesmo ou em outro sítio orgânico e são acompanhadas de febre baixa e intermitente, astenia e emagrecimento. Os pulmões são raramente atingidos (KAUFFMAN, 2007; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013).

1.4.4.4 Histoplasmose oportunística

Em áreas endêmicas ocorrem casos da infecção associada a doenças como aids, lúpus eritematoso sistêmico, leucemia, linfossarcoma, doença de Hodgkin, ou qualquer outra condição de depressão da imunidade celular, como nos indivíduos transplantados. O uso de corticóides e drogas citotóxicas favorece o risco de histoplasmose disseminada. Nestas situações, a micose pode originar-se de uma reinfecção endógena ou infecção exógena. A febre esta sempre presente, devendo suspeitar-se da micose em todo indivíduo imunodeprimido com febre de etiologia obscura e que resida em área endêmica. Tosse, em geral pouco ou não produtiva, e dispnéia podem estar presentes ao lado de lesões radiológicas pulmonares como infiltrado intersticial

difuso. Hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, leucopenia e plaquetopenia podem estar presentes (SMITH; KAUFFMAN, 2012; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013).

1.5 Fatores de virulência

Seres humanos estão constantemente expostos a vários microrganismos, entre eles os fungos, mas somente um número limitado entre os últimos pode causar doença. Vários fatores de virulência responsáveis pela sobrevivência destes microrganismos em parasitismo têm sido descritos na literatura especializada, sendo alguns bem determinados, como parede celular e estruturas complementares responsáveis pela adesão aos tecidos dos hospedeiros, a produção de fosfolipases, proteases e elastases capazes de causar dano tecidual e escapar das defesas do hospedeiro; a produção de catalases, enzimas que decompõem H_2O_2 em H_2O e O_2 atuando contra os mecanismos oxidativos, tornando a fagocitose por células efectoras e os mecanismos de agressão celular a patógenos menos eficiente (BRUMMER; STEVENS, 1984).

Além disso, a capacidade de fazer *switch* a várias vias metabólicas fundamentais para a sobrevivência intracelular e a termotolerância (capacidade de crescer a 37 °C) é pré-requisito para a disseminação hematogênica. Fungos dimórficos, entre eles *H. capsulatum*, fazem morfogênese conforme o ambiente em que se encontram (IGNATOV; KEATH, 2002). Alguns fatores de virulência de *H. capsulatum* já foram caracterizados e serão descritos nos tópicos a seguir:

- **Calcium Binding Protein (CBP)**- É uma proteína ligante de cálcio, secretada pelas células fúngicas durante a fase leveduriforme no crescimento intracelular (BATANGHARI et al., 1998) e sua importância na virulência do fungo já foi demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A realização de experimentos de disrupção gênica com a deleção do locus *CBPI* demonstrou que a proteína CBP favoreceu a sobrevivência do fungo no interior de células fagocíticas. Também foi demonstrado que o crescimento de *H. capsulatum* é afetado em condições limitantes de cálcio (SEBGHATI et al., 2000).

- **α -1,3- glucana**- A parede celular das leveduras de *H. capsulatum* apresentam predomínio de α -1,3- glucana que encontra-se envolvendo a camada de β -glucana, e desta forma pode inibir o

reconhecimento pelas células efectoras do hospedeiro através do bloqueio do receptor dectina-1, e consequentemente inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias (RAPPEYE et al., 2007). Rappleye e colaboradores (2004), após desenvolverem um sistema para interferência de RNA (RNAi) em *H. capsulatum*, realizaram a inibição da síntese de α -1,3-glucana pelo silenciamento do gene *AGSI* e demonstraram que *H. capsulatum* requer α -1,3-glucana como fator de virulência. Redução da atividade de *AGSI* por RNAi ou substituição alélica tradicional reduziu substancialmente a colonização pulmonar por *H. capsulatum* e a habilidade de proliferar e destruir macrófagos em cultura. α -1,3-glucana parece ser um determinante de virulência designado especificamente para sobrevivência e replicação no pulmão pois a perda de α -1,3-glucana não altera o crescimento de *H. capsulatum in vitro*. Em outros fungos dimórficos, a perda espontânea de α -1,3-glucana também está correlacionada com a diminuição da virulência, sugerindo que este pode ser um mecanismo conservado de patogenicidade (SAN-BLAS; MORENO, 1977; KLIMPEL; GOLDMAN, 1988; HOGAN; KLEIN, 1994). A presença deste polímero permite a sobrevivência e replicação fúngica, o que irá interferir diretamente na capacidade de colonização de órgãos e estabelecimento de uma infecção bem sucedida (MARION et al., 2006) e ainda resultar num estado de latência intracelular.

- Sideróforo de hidroxamatos- A habilidade para obtenção de ferro do hospedeiro é importante para a virulência de muitos patógenos. A aquisição de ferro na patogênese de *H. capsulatum* foi investigada e foi verificado que este fungo necessita de *SIDI*, um membro de um grupo de genes sideróforos regulado por ferro, para colonização do hospedeiro. *H. capsulatum* adquire ferro através da ação da enzima férrico redutase e produção de sideróforos. Cepas deficientes em *SIDI* mostraram um defeito significativo no crescimento em macrófagos murinos derivados de medula óssea e consequente atenuação da infecção, a qual pode ser revertida pela adição de ferro exógeno ou restauração da expressão de *SID 1*. Estes dados indicaram que *H. capsulatum* utiliza sideróforos, além de outros mecanismos de aquisição de ferro para crescimento durante o processo infeccioso (HWANG et al., 2008, HILTY et al., 2011).

-Melanina- As melaninas são polímeros hidrofóbicos que conferem proteção aos fungos contra condições adversas à sua sobrevivência tais como fagócitos e radiações ionizantes e ainda, pode

proteger o patógeno contra a ação de agentes antifúngicos (GOMEZ; NOSANCHUK, 2003; IKEDA et al., 2003). A produção de melanina é uma característica amplamente utilizada para a identificação de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* em laboratório. Este pigmento é revelado pela cor escura (marrom a preto) das colônias quando o fungo cresce em meios que contêm compostos fenólicos ou difenólicos na sua composição, como ágar semente de girassol (*Helianthus annuus*), ágar alpiste (*Guizotia abyssinica*), ágar batata e cenoura, e meios quimicamente definidos, como ágar L-DOPA e ágar ácido caféico. A enzima fenol-oxidase ou lacase presente nas leveduras citadas atua sobre esses substratos, gerando quinonas como produtos, que sofrem um processo de autopolimerização, transformando-se em melanina. Esta fica retida na parede celular do fungo, sendo responsável pela expressão do pigmento escuro mostrado pelas colônias (CASADEVALL et al., 2000). Entre os fungos que tem a capacidade de produzir melanina durante a infecção estão os dimórficos *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Penicillium marneffei*, *Coccidioides posadasii* (GOMEZ et al., 2001; HAY, 1999; MORRIS-JONES et al., 2003; NOSANCHUK et al., 2002; NOSANCHUK et al., 2004; NOSANCHUK et al., 2007, YOUNGCHIM et al., 2005;) *H. capsulatum*, quando cultivado em meio quimicamente definido, , na presença de -3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) ou (-)-epinefrina produz células melanizadas, conídios e leveduras escuras. Estas são reconhecidas em ensaios utilizando anticorpos monoclonais e soros policlonais, indicando que a melanina pode ter um papel muito importante na patogenia da histoplasmose. Acredita-se que durante a infecção a melanização de leveduras desempenhe um papel importante na virulência e patogenicidade, uma vez que reduz a susceptibilidade de fungos em geral a mecanismos de defesa do hospedeiro e drogas antifúngicas (NOSANCHUK et al., 2002; TABORDA et al., 2008).

-Dimorfismos- O dimorfismo é um aspecto importante na patogênese, pois a forma filamentosa é infecciosa, mas é a forma leveduriforme que sobrevive intracelularmente e causa doença (NEMECEK et al., 2006). A mudança de temperatura de 25°C para 37°C é estímulo suficiente para o dimorfismo, mas outras condições ambientais como presença de cisteína e cAMP pode influenciar na morfogênese de *H. capsulatum*. Este dimorfismo é essencial para a virulência,

como evidenciado em culturas mantidas a 25°C tratadas quimicamente, incapazes de fazerem a conversão para a fase leveduriforme que se tornam avirulentas (MEDOFF et al., 1986b).

-HSP 60- Fungos patogênicos, como a maioria dos microrganismos, possuem prováveis adesinas específicas que permitem a adesão à célula hospedeira ou matriz extracelular. No caso de patógenos intracelulares, adesinas permitem a entrada ideal em células hospedeiras que poderiam conduzir a ativação de defesas dos fagócitos. Uma proteína de choque térmico de 60 kDa(HSP60) presente na superfície do *H. capsulatum* apresenta função de chaperona e também parece ser o principal ligante a mediar a associação deste fungo ao receptor CR3 de macrófagos (LONG et al., 2003). A HSP60 é imunogênica, e desta forma vem sendo descrita como um potencial alvo para imunização passiva. Estudos demonstraram que mAbs contra a HSP60 administrados em camundongos podem levar à uma proteção significativa contra *H. capsulatum*, resultando em prolongamento da sobrevivência dos animais (GUIMARÃES et al., 2009).

-Histona H2B- Esta molécula participa na patogênese da histoplasmose é uma histona H2B, que apesar de classicamente ser um componente intracelular, pode ser reconhecida por mAbs na parede celular das leveduras de *H. capsulatum*. Estudos demonstraram que a imunização passiva com H2B reduziu a carga fúngica, diminuiu o processo inflamatório e aumentou a sobrevivência em camundongos. Porém apesar de ser reconhecida pelo sistema imune durante a infecção a quantidade de anticorpos detectados contra este antígeno em soros prova que H2B não consiste de um antígeno imunodominante (NOSANCHUK et al., 2003; NOSANCHUK et al., 2008). Proteínas de *H. capsulatum* carregadas por vesículas foram reconhecidas por soros hiperimunes, incluindo as associadas à virulência Hsp 60 e H2B, superóxido desmutase e catalases, indicando que essas proteínas parecem estar envolvidas na interação parasito-hospedeiro (ALBUQUERQUE et al., 2008; NOSANCHUK et al., 2008).

-YPS3(“Yeast Specific Phage”)- É um gene específico da fase leveduriforme *YPS3* (“Yeast Specific Phase”), que codifica uma proteína ligante de quitina encontrada na constituição da parede celular e também já foi assinalada como molécula secretada, vem sendo estudada na virulência através de experimentos de interrupção gênica com deleção do gene *YPS3*, o qual

demonstrou atenuar significativamente a virulência do fungo *in vitro* e em modelos de infecção *in vivo* utilizando camundongos (BOHSE; WOODS, 2007).

-Catalases- Catalases são enzimas que decompõem o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, são encontradas em todos os organismos aeróbicos e estão envolvidas na defesa contra o *stress* oxidativo, associada a patogenicidade e virulência de certos fungos patogênicos ao homem. Com isso, estas enzimas poderiam atuar como fator de virulência para diversos microrganismos contra mecanismos oxidativos de seus hospedeiros. 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 efectoras dos hospedeiros contra alguns fungos (BRUMER e STEVENS, 1984; McEWEN et al., 1984; LEVITZ e DIAMOND, 1985; MORRISON; ISENBERG ; STEVENS, 1988; BRUMER; STEVENS, 1995; MELOI-BRUNERI et al., 1996).

A classe de proteínas que exibem atividade de catalase e mais extensivamente caracterizada é composta por enzimas contendo grupamento heme, monofuncionais, sendo compostas por subunidades maiores com peso molecular acima de 75 kDa ou menores (< 60 kDa) (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 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 (ZÁMOCK; KOLLER, 1999). Já foram descritas três diferentes catalases de *H.capsulatum* e cada gene codificador destas catalases está presente em uma única cópia. A catalase P (CAT P) é uma pequena subunidade monofuncional de catalase peroximal, é constitutivamente expressa durante o crescimento e tem sido sugerido que CAT P pode facilitar a detoxificação ao peróxido de hidrogênio durante o metabolismo (JOHNSON et al., 2002) e tem alta similaridade com a catalase P de *P. brasiliensis*. A catalase A (CAT A) usualmente apresenta estrutura quaternária quando em solução, está presente na fase filamentosa e /ou quando exposta a H₂O₂ (JOHNSON et al., 2002). Estudos evidenciaram indiretamente que catalases de *H. capsulatum* se localizavam em extratos livres de células (*cell-free extracts*) ou em células impermeabilizadas com acetona

sugerindo que essas fossem proteínas secretadas (HOWARD, 1983). A catalase B (CAT B) é também conhecida como antígeno M (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1999). Através da demonstração de um modelo estrutural hipotético do antígeno M como um tetrâmero composto por quatro domínios estruturais, além da localização do sítio de assinatura onde os ligantes do heme H₁₀₇, N180, Y394 foram encontrados pode-se afirmar que o antígeno M é uma catalase (CATB) que além de secretada (exoantígeno), também se localiza na superfície celular em ambas as fases do ciclo evolutivo sendo responsável pela evasão ao stress oxidativo, e permite a conversão do fungo da fase miceliana para a leveduriforme (GUIMARÃES et al., 2008). A forte reatividade evidenciada na parede celular das leveduras de *H. capsulatum* quando empregado mAbs para proteína M comprovou a presença desta proteína na superfície das leveduras (GUIMARÃES et al., 2008).

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da histoplasmose baseia-se em aspectos clínicos, radiológicos e epidemiológicos. A confirmação do diagnóstico se dá pelo isolamento e identificação de *H. capsulatum* através de procedimentos microbiológicos.

1.6.1 Exame direto e cultura

A demonstração de *H. capsulatum* em espécimes clínicos através da microscopia de preparações a fresco ou com hidróxido de potássio a 10 % é extremamente difícil. Melhor sensibilidade é obtida utilizando métodos de coloração como Wright, Giemsa e Grocott, porém fatores limitantes como similaridades na morfologia deste fungo com outros patógenos e artefatos de coloração podem afetar o rendimento da técnica (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013). Apesar das limitações relacionadas a obtenção da cultura do fungo, esta metodologia é considerada o método padrão-ouro no diagnóstico da histoplasmose (ROSENBERG; SCHEINFELD, 2003; GUIMARÃES et al., 2006-b; FERNANDEZ ANDREU et al., 2011; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013).

Espécimes biológicos provenientes de pacientes com suspeita clínica de histoplasmose devem ser semeados em meios especiais para isolamento como Agar Sabouraud acrescido de

cloranfenicol e ágar Mycosel, entre outros, incubados a 25 °C durante 6 a 12 semanas. Nestas condições, *H. capsulatum* inicialmente cresce como colônias glabras, que com o tempo tornam-se filamentosas, aéreas, algodoadas, de coloração branca, compostas por trama miceliana, com delicadas hifas hialinas, septadas e ramificadas, apresentando micro e macroconídios em vários estágios evolutivos. A presença destes conídios sugere que o fungo seja *H. capsulatum*, mas é necessária a conversão desta fase para a forma leveduriforme, visto que fungos saprófitas, como *Chrysosporium* sp. produzem conídios semelhantes (GAUR; LICHTWARDT, 1980). Com isso, para obtenção desta fase deve-se fazer repiques da fase filamentosa da colônia suspeita em meios enriquecidos, tais como Agar sangue, Agar infusão cérebro-coração (BHI), ambos acrescidos de cisteína, meio de conversão (0,5 % peptona, 0,5 % extrato de levedura, 2 % glicose, 15 g/l Agar) e meio Gema (2,1 % Muller Hinton Broth, 1 % Agar, 2 % dextrose, 0,2 % L-Cisteína, 15 ml de gema de ovo) com incubação a 35-37 °C, para observação de sua conversão à fase leveduriforme. Após conversão observam-se colônias glabras, lisas, branco-amareladas, apresentando à microscopia, leveduras ovais, unibrotantes, de morfologia uniforme. Cultivos de espécimes clínicos são negativos na maioria dos pacientes com histoplasmose aguda e, embora apresentem alta sensibilidade nas formas disseminada e crônica, resultados falso-negativos podem ser observados em cerca de 20 % dos casos disseminados (SATHAPATAYAVONGS et al., 1983; WHEAT et al., 2002) e 50 % das formas pulmonares crônicas (WHEAT et al., 1984). O rendimento da técnica varia conforme o material processado. A hemocultura realizada por lise-centrifugação apresenta 90 a 100 % de positividade, sendo que esse percentual pode apresentar variações de acordo com a forma clínica (WHEAT; KAUFFMAN, 2003). Outro fator limitante é o crescimento de *H. capsulatum* em cultivo, o qual requer, cerca de 3-4 semanas para seu isolamento e identificação.

1.6.2 Diagnóstico histopatológico

A coloração pela hematoxilina-eosina (HE) apresenta sensibilidade mediana, onde as leveduras intracelulares são visualizadas como um corpúsculo levemente basofílico, esférico ou ovalado, rodeado por um halo claro delimitado por uma parede celular hialina muito fina. Porém quando usadas colorações mais específicas para fungos, como PAS e prata (Gomori metenamina

ou Grocott), o rendimento melhora consideravelmente. Nestas preparações a parede celular de *H. capsulatum* é fortemente corada, permitindo observar elementos fúngicos como leveduras unibrotantes pequenas, ovais ou arredondadas de 2 a 4 µm. As leveduras de *H. capsulatum* são frequentemente encontradas no interior de macrófagos, mas podem ser observadas livres nos tecidos. Em pacientes com doença disseminada aguda severa as leveduras podem ser vistas em células sanguíneas em esfregaço de sangue periférico e de medula óssea (KAUFFMAN, 2009; ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2013). O diagnóstico histopatológico permite um diagnóstico rápido, porém sua sensibilidade é menor que 50 % (SATHAPATAYAVONGS et al., 1983). Resultados falso-positivos podem ocorrer quando outros fungos como *Pneumocystis jirovecii* ou artefatos de coloração estão presentes (WHEAT, 1996).

1.6.3 Teste de exoantígeno

Este teste de imunoidentificação detecta macromoléculas imunogênicas solúveis produzidas pelos fungos durante sua fase de crescimento (STANDARD; KAUFMAN, 1976). O método convencional de exoantígeno para identificação de *H. capsulatum* utiliza o teste de imunodifusão dupla para detecção das proteínas H e M. Esta metodologia permite identificar formas micelianas atípicas de *H. capsulatum* e discriminá-los de fungos saprofitos morfológicamente semelhantes. Considerando que os ensaios imunoenzimáticos são mais sensíveis que as técnicas de precipitação, métodos alternativos como *Dot-blot* e *immunoblotting* foram empregados. Estes testes identificaram corretamente cepas de *H. capsulatum*, apresentando 100 % de sensibilidade enquanto que a imunodifusão dupla apresentou uma sensibilidade de 33 % (REISS et al., 2000).

1.6.4 Imunodiagnóstico

As metodologias empregadas no imunodiagnóstico da histoplasmose oferecem um diagnóstico presuntivo da doença, uma vez que detectam de forma indireta a existência do patógeno no hospedeiro através da detecção de anticorpos e/ou antígenos específicos em fluidos orgânicos, ou pela demonstração de reação de hipersensibilidade cutânea específica a antígenos

fúngicos. Entretanto, as técnicas empregadas no imunodiagnóstico da histoplasmose apresentam algumas variações quanto ao seu rendimento. Estas variações estão relacionadas aos limites de detecção das técnicas empregadas, e as diferentes formas clínicas da histoplasmose.

1.6.4.1 Detecção de anticorpos

Até o presente, imunodifusão dupla de Ouchterlony (ID) (OUCHTERLONY, 1962) e a reação de fixação de complemento (RFC) (KAUFFMAN, 1992) têm sido os métodos de escolha na rotina de laboratórios de análises clínicas. Entretanto, a ID, apesar da alta especificidade, apresenta baixa sensibilidade onde os anticorpos específicos podem não ser detectáveis em soros até 4 a 6 semanas após o aparecimento dos sintomas, fornecendo resultados falso-negativos (PIZZINI et al., 1999). A RFC é mais sensível que a ID, porém pode apresentar reatividade cruzada com soro de pacientes infectados com *B. dermatitides*, *Coccidioides immitis* e *P. brasiliensis* (WHEAT; KAUFFMAN, 2003).

A ID é a técnica mais empregada para detecção de anticorpos na histoplasmose. É uma técnica altamente específica para detecção de anticorpos anti-M e anti-H, os principais antígenos empregados no diagnóstico da histoplasmose, porém apresenta baixa sensibilidade (FURCOLOW; SALVIN, 1956; JOHNSON et al., 1986). A precipitina M é a primeira a aparecer e pode persistir por meses a anos após a resolução. Anticorpos anti-M podem ser detectados após intradermoreação com histoplasmina. A precipitina H aparece após a linha M, como é observada em soros de pacientes com doença ativa e progressiva, trata-se de um importante marcador. Anticorpos anti-H podem persistir após a cura clínica aparente, mas desaparecem mais rapidamente que os anticorpos anti-M. O antígeno H é uma glicoproteína de parede celular de 120 kDa e pouco imunogênico, e anticorpos estão presentes em somente 7 a 20% das amostras de soro de pacientes com histoplasmose (GUIMARÃES et al., 2006-b). Reações cruzadas ocorrem em pacientes com paracoccidioomicose, blastomicose e aspergilose, e menos frequentemente em pacientes com coccidioomicose e candidíase (WHEAT, 2003).

Outra técnica que já foi muito empregada no diagnóstico da histoplasmose é a reação de fixação de complemento (RFC). Nesta são usados antígenos obtidos tanto da fase filamentosa quanto leveduriforme, com sensibilidade/especificidade diferentes. A RFC é positiva em cerca de

90 % dos pacientes com doença pulmonar e em 80 % com histoplasmose disseminada. Entretanto apresenta como limitações a diminuição da sensibilidade em pacientes imunossuprimidos, a impossibilidade em diferenciar infecção passada de doença atual e a ocorrência de reações cruzadas com outras micoses (WHEAT, 2003).

Na RFC, títulos maiores que 1:8 são considerados positivos e títulos acima de 1:32 são fortemente sugestivos de infecção ativa. Título entre esses dois valores são pouco sugestivos de doença em atividade, devendo ser avaliados junto a dados clínicos e epidemiológicos. Anticorpos fixadores de complemento podem persistir por anos após a infecção. Aproximadamente 95 % dos pacientes com histoplasmose aguda ou crônica são positivos na RFC, sendo a resposta para o antígeno leveduriforme maior do que para o antígeno micelial. Reações cruzadas podem ocorrer com outras infecções fúngicas e outros processos granulomatosos, incluindo tuberculose e sarcoidose, sua especificidade é maior com antígenos da fase leveduriforme 90 % do que com antígenos obtidos da fase filamentosa 80 % (GUIMARÃES et al., 2006-b; KAUFFMAN, 2007).

Os ensaios imunoenzimáticos, tais como ELISA e *Western blot*, nas suas inúmeras variações, tem demonstrado elevada sensibilidade na detecção de anticorpos, apresentando contudo problemas quanto a especificidade (GUIMARÃES et al., 2004 ; PIZZINI, 1997)

O *Western blot* apresentou resultados promissores principalmente no grupo de pacientes com histoplasmose aguda e disseminada, onde a sensibilidade do teste variou ente 90 a 100 % quando soros foram testados frente ao antígeno histoplasmina purificado e deglicosilado (PIZZINI et al., 1999).

Diferentes desenhos de ELISA tem sido descritos no imunodiagnóstico da histoplasmose empregando diversas preparações antigênicas. Em um ELISA *sandwich* indireto para detecção de anticorpos anti-proteínas ribossomais, 97 % dos pacientes com histoplasmose foram positivos, quando comparado à sensibilidade de 75 % na detecção de anticorpos utilizando histoplasmina (RAMAN et al., 1990). Já foi descrito um ELISA usando extrato de células leveduriformes, com sensibilidade de 86 % e especificidade de 91% na histoplasmose pulmonar aguda, empregando como conjugado uma anti- IgG humana, entretanto quando empregada uma anti- IgM humana a sensibilidade foi de 66 % e a especificidade de 100 % (TORRES et al., 1993).

Um ELISA empregando o antígeno *histolyn* CYL, obtido da fase leveduriforme do *H. capsulatum* foi realizada para detectar anticorpos no soro de pacientes com histoplasmose e no

soro de coelhos infectados experimentalmente onde foi observado reatividade cruzada com *C. immitis* (BOYER & SCALARONE, 1983). Outro desenho de ELISA para detecção de anticorpos da classe IgM e IgG, empregando antígeno adsorvido em *beads* de policarbonato apresentou uma sensibilidade superior aos testes de imunodifusão dupla e RFC nas amostras obtidas quatro meses após o início dos sintomas, porém a especificidade do teste não foi avaliada (WHEAT et al., 1992).

Nosso grupo também desenvolveu e avaliou um ELISA indireto como método para detecção de anticorpos empregando como antígeno a histoplasmina purificada e deglicosilada, apresentando 92 % de sensibilidade e 96 % de especificidade (GUIMARÃES et al., 2004). Este último teste foi avaliado quanto a detecção de anticorpos nos soros de pacientes com diferentes formas clínicas de histoplasmose, onde encontramos as seguintes sensibilidades: pacientes com histoplasmose aguda e mediastinal: 100 %, histoplasmose crônica: 90 %, histoplasmose disseminada: 89 % e na histoplasmose oportunista: 86 % (GUIMARÃES et al., 2010).

1.6.4.2 Detecção de antígeno

A detecção de antígeno em fluidos corporais é frequentemente utilizada para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes com histoplasmose, e 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 um radioimunoensaio (RIA) descrito por Wheat e cols (1986), que se baseia na detecção de antígeno polissacáride de *H. capsulatum* (HPA). Este teste apresentou 95% de sensibilidade nas amostras de urina analisadas e 86 % nas amostras de soro (WHEAT et al., 2002). Entretanto resultados falso positivos foram observados nesta metodologia.

Um ELISA *sandwich* de segunda geração foi realizado para reduzir o número de reações falso positivas causadas por anticorpos humanos anti-coelho (WHEAT et al., 2007). Na tentativa de melhorar o rendimento do ensaio imunoenzimático (MVista Histoplasma antigen enzyme immunoassay) na detecção de antigenemia, amostras de soro foram tratadas com EDTA, com a finalidade de remover a formação de imunocomplexos que levam a resultados falso negativos, e este teste foi capaz de detectar antigenemia em 94,6 % das amostras de soro que apresentaram

reações falso negativas na ausência de tratamento com EDTA (SWARTZENTURBER et al., 2009). Outra metodologia empregada pra aumentar a sensibilidade do MVista *Histoplasma antigen enzyme immunoassay* desta vez na antigenúria foi a ultrafiltração das amostras, onde foi observado um aumento na sensibilidade da técnica e uma discreta perda na especificidade (EGAN et al., 2008).

Um estudo multicêntrico avaliou o teste de detecção de antígeno *Mvista Histoplasma antigen immunoassay* (Mira Vista Diagnostics) para diagnóstico da histoplasmose, onde foi observada uma sensibilidade nas amostras de urina na forma disseminada de 91,8 %, na histoplasmose aguda de 83,3%, na histoplasmose subaguda de 30,4% e na forma pulmonar crônica de 87,5 %. Já na antigenemia a sensibilidade foi de 100 % na forma disseminada. A especificidade foi de 99 % para pacientes com infecções não fúngicas e indivíduos saudáveis, porém foi observada reação cruzada em 90 % dos pacientes com blastomicose (HAGE et al., 2011).

Outro método, para detecção de antígenos, é uma ELISA de inibição (GÓMEZ et al., 1997). Esta metodologia apresentou uma maior especificidade que o RIA, devido ao uso de anticorpos monoclonais para detecção de uma proteína de 70 kDa. A sensibilidade do teste variou de 57,1 a 88,9 % de acordo com a forma clínica da histoplasmose. A especificidade do teste foi de 85,4 % quando testados em paralelo com amostras de soro de pacientes com outras infecções fúngicas. Esta metodologia também foi empregada no monitoramento terapêutico dos pacientes, e apresentou sucesso no acompanhamento de pacientes principalmente com a forma aguda e disseminada da histoplasmose (GOMEZ et al., 1997, GOMEZ, et al., 1999).

Um ELISA de captura empregando soro policlonal contra antígeno polissacáride de *H. capsulatum* foi desenvolvido para detectar antígeno em amostras de urina de pacientes com histoplasmose. Este teste apresentou 81 % de sensibilidade e 95 % de especificidade (SCHEEL et al., 2009).

1.6.5 Teste cutâneo intradérmico com histoplasmina

O teste intradérmico é empregado em investigações epidemiológicas, porém não tem valor para uso em diagnóstico. Esta prova consiste na inoculação por via intradérmica de 0,1 ml do antígeno histoplasmina, o qual é preparado a partir do filtrado de cultura da fase miceliana de *H. capsulatum*. Após a realização do teste considera-se positiva uma reação com uma área de induração maior ou igual a 5 mm, ou mais formada em 48-72 horas (NEGRONI, 1982). A reatividade ao teste intradérmico desenvolve-se usualmente após duas a quatro semanas após a infecção. A intradermoreação não deve ser empregada antes da realização de teste sorológico, pois pode induzir a formação de linhas de precipitação nas amostras de soro (GUIMARÃES et al., 2006-b; ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2013).

1.6.6 Métodos Moleculares

Ensaio baseado na detecção de sequências específicas de DNA e RNA têm sido desenvolvidos para a identificação de fungos dimórficos. Entre esses se destacam técnicas de hibridização empregando sondas genéticas e reações em cadeia da polimerase (PCR) (BIALEK et al. 2002; HOPFER et al., 1993; KERSULYTE et al., 1992; LINDSLEY et al., 2001; MARTAGON-VILLAMIL et al., 2003; RICKERTS et al., 2002 ;WOODS et al., 1993). O método de PCR foi utilizado inicialmente para avaliar um conjunto comercial de sondas de DNA quimioluminescente marcadas com éster-acridínia, para identificação de fungos dimórficos, onde foi observada alta especificidade e sensibilidade (STOCKMAN et al., 1993). Já foram desenvolvidos ensaios empregando sondas de DNA quimioluminescente marcadas para detecção de sequências específicas de rRNA em isolados clínicos de *H. capsulatum*, bem como para detecção direta em amostras biológicas (CHEMALY et al., 2001).

Algumas PCR tem sido descritas na literatura para identificação de isolados atípicos e diagnóstico da histoplasmose. Um estudo onde PCR utilizando sequências iniciadoras desenhadas a partir do gene codificante do antígeno M foi capaz de detectar e identificar *H. capsulatum*, apresentando 100% de especificidade e sensibilidade (GUEDES et al., 2003).

Um segundo PCR foi desenvolvido para a detecção de DNA fúngico em tecido empregando iniciadores desenhados a partir do gene que codifica uma proteína de 100 kDa, foi realizado e este teste também apresentou 100 % de especificidade e sensibilidade (BIALEK et al., 2002). Posteriormente foi realizado um trabalho de validação de um Nested-PCR tendo como alvo o gene que codifica uma proteína de 100 kDa, realizado em amostras respiratórias onde foi observado 100% de sensibilidade e 92,4 /95,2 % de especificidade (MUNÓZ et al., 2010).

Outro método, uma PCR semi-aninhada, foi desenvolvido para o diagnóstico da histoplasmose em amostras clínicas onde foi realizada a amplificação parcial do gene codificador do antígeno H, o qual apresentou uma alta especificidade e sensibilidade (BRACCA et al., 2003).

Várias técnicas utilizando a metodologia de PCR em tempo real têm sido descritas. Empregando sondas que amplificam a região ITS1 foi observada detecção de DNA de *H. capsulatum* em soros de pacientes infectados pelo HIV. Este teste apresentou 70 % de sensibilidade e 100% de especificidade (BUIRAGO et al., 2006).

Também foi descrito uma PCR em tempo real para detecção de DNA de *H. capsulatum* extraído de tecido embebido em parafina e fixado em formalina, que apresentou um limiar de detecção de 6 pg/μl de DNA de *H. capsulatum*, uma sensibilidade de 88,9 % e especificidade de 100 %, fornecendo acurácia superior quando comparada aos testes histopatológicos. (KOESELL et al., 2012).

Uma análise comparando a performance de diferentes metodologias para o diagnóstico da histoplasmose foi realizada, onde foram analisados, sorologia, cultura e uma PCR aninhada *in house*, em sete casos com suspeita de histoplasmose. Empregou-se na PCR iniciadores que amplificam segmento do gene codificador do antígeno M de *H. capsulatum*. Neste estudo a cultura foi positiva em apenas uma amostra, a sorologia em três amostras e a PCR em quatro amostras. Apesar da boa sensibilidade e especificidade encontrada na PCR, faz-se necessário maiores avaliações desta metodologia, devido ao pequeno número de amostras analisadas (OHNO et al, 2013).

Um estudo multicêntrico avaliou diferentes protocolos de PCR para detecção de DNA de *H. capsulatum*, neste estudo uma PCR em tempo real que amplifica a região ITS1 foi altamente sensível, específica e apresentou uma alta reprodutibilidade, quando comparada com uma PCR aninhada e uma PCR convencional (BUITRAGO et al., 2013).

1.7 Antígeno M

O principal complexo antigênico utilizado para fins diagnósticos na histoplasmose é a histoplasmina, um filtrado de cultura de *H. capsulatum* na forma filamentosa, crescido em meio sintético. Os principais constituintes antigênicos são o antígeno C, que é um carboidrato (galactomanana, responsável pela reatividade cruzada com outros gêneros fúngicos) e as glicoproteínas H e M. São considerados imunodominantes porque são expressos durante toda a infecção e são capazes de induzir a formação de precipitinas (HEINNER, 1958) e anticorpos fixadores do sistema complemento, sendo considerados marcadores específicos para a doença em atividade em pacientes com normalidade na sua resposta imunológica.

Com o objetivo de tornar o diagnóstico da histoplasmose mais específico, aplicou-se métodos de otimização à utilização deste complexo antigênico. Purificação por métodos cromatográficos e tratamento com finalidade de retirar a porção glicosídica destes antígenos foram propostos (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1993; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1994a). Ambos os antígenos H e M, em sua forma nativa, são glicoproteínas com peso molecular de 120 e 94 kDa respectivamente, contendo epítopos protéicos específicos e glicosídicos ligados à porção N-terminal (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1993). Deglicosilações enzimáticas ou principalmente químicas pelo metaperiodato de sódio (NaIO₄) provaram aumentar a especificidade em métodos imunoenzimáticos, reduzindo a reatividade cruzada com outros fungos (PIZZINI et al., 1997; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1994b). O antígeno M têm sido utilizado em testes imunológicos para o diagnóstico da histoplasmose (PIZZINI et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2006b). Nosso grupo tem dado grande ênfase a este antígeno. Baseado em estudos de caracterização molecular e funcional do gene codificador do antígeno M (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1999) bem como nas reações cruzadas obtidas frente a reações obtidas com anticorpos monoclonais para catalases (HAMILTON et al., 1990), foi possível caracterizar a

proteína M como uma catalase B. Em estudos prévios foram determinadas regiões imunodominantes do antígeno M. Para tanto, inicialmente um modelo molecular do antígeno M foi desenvolvido baseado na estrutura da proteína M de *H. capsulatum* depositada no GenBank (AFO26268). Foi também realizada comparação com sequências de diversas catalases, utilizando os programas FASTA (Version 3), PDB Viewer Program, PROCHECK e Clustal W. Os resultados obtidos demonstraram regiões de baixa homologia com catalases humanas. Demonstrou-se um modelo estrutural hipotético do antígeno M como um tetrâmero composto por quatro domínios estruturais. Além disso, o sítio de assinatura onde os ligantes de heme H107, N180, Y394 foram localizados, bem como um importante sítio proximal de assinatura de catalases (FDHERVPERAVHARGAG) foi achado por Docking, confirmando a natureza biológica do antígeno M como catalase. Estudos utilizando o algoritmo de Jamenson-Wolf, para o cálculo do índice antigênico, combinados com a probabilidade de superfície calculada pelo algoritmo de Emini, permitiu a identificação de sete regiões antigênicas, um destes sítios foi localizado nos primeiros 40 aminoácidos na porção *N*-terminal, os quais constituem um provável peptídeo sinal. Seis sítios hidrofílicos, com elevados índices antigênicos são possíveis epitopos B uma vez que posicionados na superfície, poderiam ser mais facilmente reconhecidos por anticorpos. Posteriormente três diferentes fragmentos polipeptídicos (F1, F2, F3) foram gerados a partir da estrutura do antígeno M. A análise destes fragmentos frente a anticorpos monoclonais e soros de pacientes com histoplasmose demonstrou ser o fragmento F2 o mais imunogênico, o que foi confirmado por estudo de modelagem do antígeno M, onde o fragmento F2 apresentou os principais epitopos imunodominantes e também está localizado na superfície do antígeno M (GUIMARÃES et al., 2008; GUIMARÃES, 2006-a) (Figura 4).

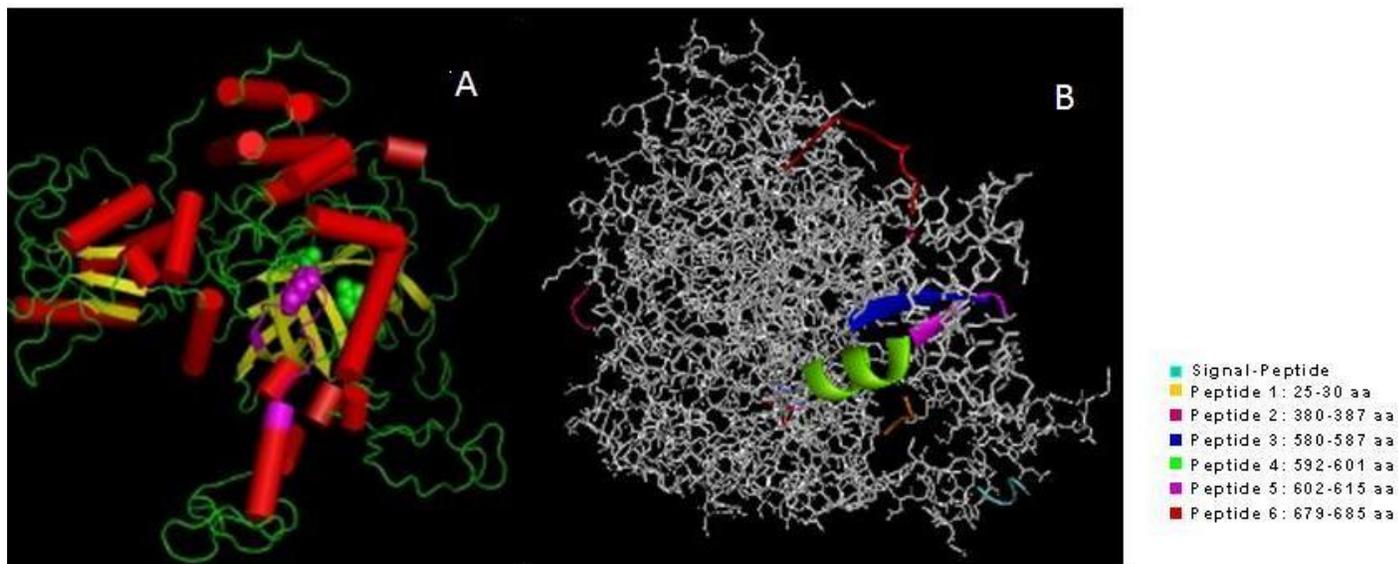


Figura 4: Modelo hipotético do antígeno M baseado na homologia estrutural com outras catalases (A) Em rosa sítio ativo proximal; Vermelho em forma de barril α -helice; Flecha em amarelo folhas beta. (B) Sítio de assinatura do antígeno M (B) Regiões antigênicas distribuídas na proteína M. (Guimarães et al., 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Histoplasmose é uma das micoses sistêmicas mais frequente no Brasil (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2005). Embora a maioria dos casos se apresente como uma infecção pulmonar aguda, aproximadamente 5 % dos pacientes evoluem para quadros pulmonares mais graves e doença extrapulmonar que pode ser fatal se não for diagnosticada e tratada rapidamente (REISS et al., 2000). Uma variedade de métodos para o diagnóstico da histoplasmose tem sido reportados na literatura especializada. Entretanto, a maioria ainda apresenta limitações. O diagnóstico definitivo da histoplasmose é obtido através do isolamento e identificação de *H.capsulatum*, porém este microorganismo apresenta um crescimento lento, e além disso o rendimento destas metodologias varia de acordo com a forma clínica da infecção. Da mesma forma o diagnóstico sorológico da histoplasmose apresenta limitações relacionadas a especificidade e sensibilidade das técnicas empregadas. Estudos prévios do grupo, sugerem que a proteína M apresente regiões comuns, bem como regiões específicas, demonstrando a necessidade de um mapeamento desta proteína para completa definição dos principais sítios antigênicos desta molécula (GUEDES et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2008). Para tanto, desenvolvemos este projeto onde foram empregadas as técnicas de imunoprecipitação de proteínas e análise em espectrometria de massas e síntese múltipla de peptídeos paralelos sobre membrana de nitrocelulose (*Spot-Synthesis*) (FRANK,1992). A escolha da técnica de *Spot-synthesis* se deve ao fato de ser uma das metodologias mais aplicadas no mapeamento de epítomos (LAUNE et al., 2002; CHÁVEZ-OLÓRGUI et al., 2002; ALVARENGA et al., 2002; MACHADO DE ÁVILA, 2004). A identificação de epítomos específicos, e suas aplicações serão úteis no desenvolvimento de métodos mais sensíveis e específicos para o diagnóstico da histoplasmose.

3- OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver reagentes e metodologias mais rápidas, sensíveis e específicas para emprego no diagnóstico da histoplasmose.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Realização da técnica de coimunoprecipitação de proteínas e análise por espectrometria de massas para determinação de regiões antigênicas na proteína M recombinante baseados na reatividade de um painel de mAbs gerados contra essa proteína.
- 2- Mapeamento dos determinantes antigênicos na proteína M, através da identificação das sequências de aminoácidos dos epitopos reconhecidos por anticorpo monoclonal (mAb) utilizando uma biblioteca peptídica obtida pela técnica de *Spot-synthesis*.
- 3- Desenvolvimento de ensaio imunoenzimático utilizando os peptídeos sintéticos para a detecção de anticorpos.
- 4- Desenvolvimento de ensaio imunoenzimático para detecção de antígeno circulante.

4-MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Expressão e Purificação da Proteína M recombinante

Para realização desta etapa, as colônias de *Escherichia coli* mantidas em freezer a -70 °C foram semeadas em meio Luria Bertani (LB- Invitrogen) para isolamento do clone e produção da proteína M recombinante. A metodologia realizada para a clonagem e expressão inicial desta molécula foi a mesma previamente publicada por Zancopé-Oliveira e colaboradores (1999), e modificada por Guimarães e colaboradores (2008).

Após o isolamento do clone positivo, os mesmos foram crescidos em meio LB contendo ampicilina (100 µg/ml) /canamicina (25 µg/ml), até uma densidade ótica da cultura de 0,4 a 600 nm, e então, foi adicionado a cada cultivo, IPTG (isopropylthio-β-galactoside – Invitrogen) na concentração final de 1 mM. A expressão dos fragmentos foi então induzida por 4 horas, e as células recuperadas por centrifugação e lavadas utilizando-se tampão TBS (0,01 M Tris base pH 7,2, 0,15 M NaCl, 0,001 M NaN₃). O próximo passo foi ressuspender o sedimento formado em um tampão de lise (5 mM de imidazol, 500 mM de NaCl, 20 mM de Tris pH 7,9) e então a suspensão foi sonicada por 6 a 7 minutos em ciclos de 10 segundos com sucessivos banhos no gelo. A lise celular foi acompanhada ao microscópio e quando confirmada, a suspensão foi então centrifugada a 16300 rpm por 30min. O sedimento composto de partículas insolúveis foi então ressuspenso em tampão de suspensão (10 mM de imidazol, 500 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl pH 7,9, 6 M uréia). O material foi centrifugado a 1,000 xg por 30min e o sobrenadante coletado foi aplicado em uma coluna de Ni⁺²- sepharose (Quiagen CA, USA) equilibrada com o tampão de suspensão. A coluna foi lavada com 10 vezes de seu volume utilizando o mesmo tampão e então os fragmentos foram eluídos da coluna com o tampão de eluição (1 M de imidazol, 500 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl pH 7,9, 6 M uréia). As frações de maior concentração protéica foram determinadas ao espectrofotômetro e então avaliadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

4.2 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 (Sigma) como padrão. A leitura das reações foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm (IMark-BIO-RAD).

4.3 Produção de anticorpos monoclonais (mAbs)

A produção de anticorpo contra o antígeno M recombinante foi realizada no laboratório CHRON EPIGEN do Pólo de Biotecnologia (BIO-RIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, a partir da imunização de camundongos BALB/c isogênicos.

Resumidamente camundongos BALB/c (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, os animais foram imunizados primariamente com 20µg 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, em adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich). Após 15 dias, os camundongos foram sangrados pela via retro-orbital. A seleção do camundongo que seria o doador do baço para realização da fusão foi feita através da reação de ELISA, onde empregou-se duas concentrações diferentes do antígeno recombinante M (1 e 0,1 µg/poço) e os soros dos animais previamente imunizados para detecção da presença de anticorpos contra a proteína M recombinante. 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 Na₂HPO₄, 0,44 mM KH₂PO₄, 1,3mM CaCl₂, 1,0mM MgSO₄, 4,2mM NaHCO₃, pH 7,2). As células esplênicas foram contadas em Câmara de Neubauer, onde foram obtidas 1 x 10⁸ células/ml de suspensão. Para fusão, foi respeitado o índice de 1x10⁸ células esplênicas para 1,2 x 10⁷ células de linhagem mielóide SP2/0. Estas células foram fusionadas utilizando-se polietilenoglicol. Os hibridomas assim formados foram selecionados em meio HAT 1X (hipoxantina, aminopterina e timidina). Posteriormente foi

realizada contagem das células em meio HAT, a fim de se realizar 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 por ELISA para a presença de anticorpos monoclonais contra a proteína M recombinante.

4.3.1 Isotipagem dos mAbs

Os anticorpos monoclonais obtidos no item anterior foram classificados pelo método de ELISA indireto utilizando o *kit Mouse-Monoclonal Antibody Isotyping Reagents* (Sigma-Aldrich), de acordo com o protocolo determinado pelo fabricante.

4.3.2 Avaliação da afinidade e especificidade dos mAbs

Para esta avaliação foi utilizada a técnica do *Imunoblot* com diversos antígenos fúngicos: antígeno M recombinante de *H. capsulatum*, antígeno filtrado de *H. capsulatum* purificado e tratado com metaperiodato de sódio (NaIO₄) (PIZZINI et al., 1999), antígeno citoplasmático *H. capsulatum* da fase leveduriforme, antígeno filtrado de *Aspergillus fumigatus*, antígeno filtrado de *Paracoccidioides brasiliensis*, antígeno citoplasmático leveduriforme de *Sporothrix schenckii*. Foi empregado como controle positivo uma amostra de soro de paciente com histoplasmose comprovada através de sorologia e cultura.

4.3.3 Imunoblot

Os antígenos foram desnaturado a 100 °C por 5 minutos em tampão 0,125 M Tris-HCl (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 10 mA para o gel de empacotamento e 20 mA para o gel de resolução. O conteúdo dos géis foi transferido para uma membrana de nitrocelulose em uma Mini Transfer-Blot Cell (Bio-Rad) contendo

tampão de transferência com 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina e metanol (20 % vol/vol, pH 8,3) e operada a 400 mA por 1h. As membranas foram então, bloqueadas com 5 % leite desnatado em 20 mM Tris-HCl (pH 5,8), 500mM NaCl, 0,2 % Tween (TTBS). Os mAbs foram incubados com cada antígeno por 1 h 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 BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato) em dimetilformamida (15 mg/ml) e NBT (nitroblue tetrazolium) 30 mg/mL em 70 % DMF aquoso diluída em tampão Tris/NaCl 100 mM Tris-HCl (pH9,5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂). As reatividades foram então avaliadas com relação a presença das bandas em cada amostra antigênica/ anticorpo primário utilizado.

4.4 Coimunoprecipitação de proteínas e análise por espectrometria de massas

4.4.1 Ligação do anticorpo

Neste procedimento foi utilizado o Kit - Immunoprecipitation Kit – Dynabeads Protein G (Invitrogen – Dynal invitrogen bead separations) seguindo protocolo descrito por Moura e colaboradores (2011).

Inicialmente as microesferas foram ressuspensas e transferidas (50µl) para um novo tubo, em seguida foram separadas em plataforma magnética durante 5 minutos, até a solução ficar totalmente límpida para remoção do sobrenadante. Foi adicionado 25 µg do mAb 1A7 diluído em 200 µl da solução – Ab *binding and washing buffer*- Kit. A solução foi incubada por 14 horas a temperatura ambiente sob agitação. Novamente as microesferas foram separadas na plataforma magnética durante 5 minutos, até a solução ficar totalmente límpida para a remoção do sobrenadante. As microesferas foram ressuspensas em 200 µl da solução Ab *binding and washing buffer*- Kit. Foi realizado novamente o processo de separação das microesferas na plataforma magnética para remoção do sobrenadante. Adicionou-se as microesferas 1 ml da solução estoque de DMP (dimethyl pimelimidate) [13 mg/ml] a 1ml de água milliQ, 200 µl da solução de *cross-link* foi pipetado e incubado com as microesferas por 30 minutos a 20 °C sob agitação. Após o período de incubação as microesferas foram separadas em plataforma magnética

durante 5 minutos para remoção do sobrenadante. As microesferas foram lavadas em 200 µl de solução Ab binding e *washing buffer*- Immunoprecipitation Kit – Dynabeads Protein G – (Invitrogen). Este procedimento de lavagem foi repetido 3 vezes(Fig.5)

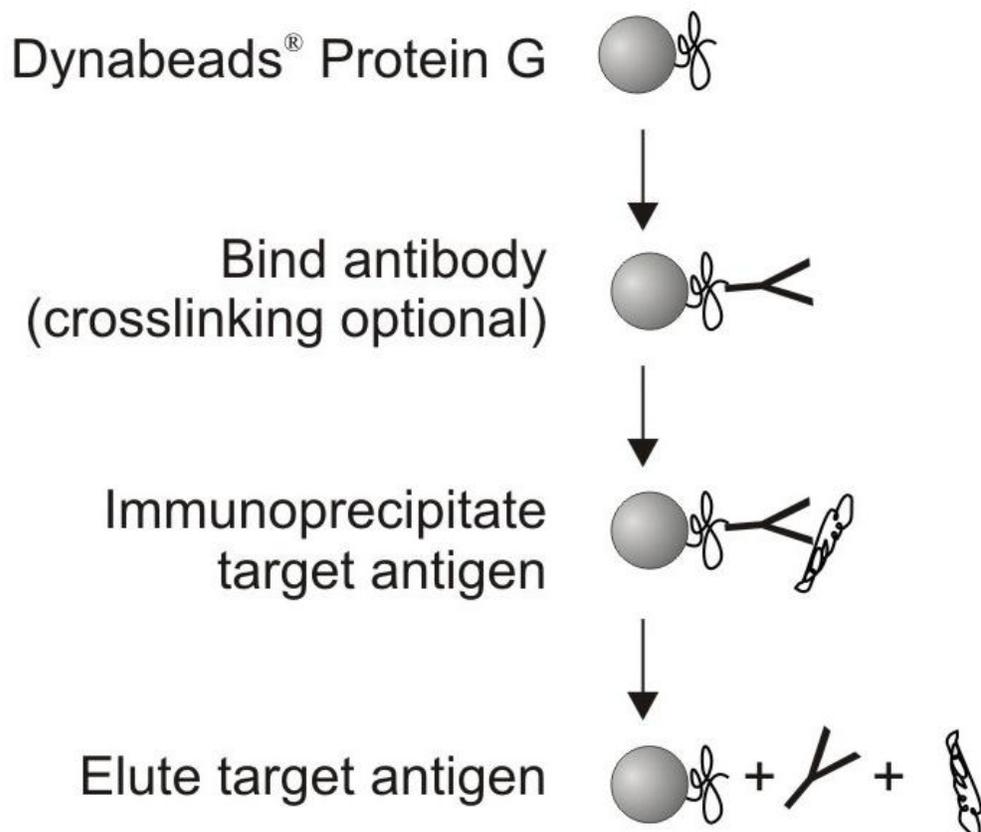


Figura 5: Reação de coimunoprecipitação, ligação do anticorpo monoclonal (1A7), antígeno M recombinante, digestão com tripsina Kit e eluição. Fonte: Kit Dynabeads Protein G – Invitrogen)

4.4.2 Reação de imunoprecipitação

Após a reação de cross-link foi adicionado o antígeno M recombinante (25 µg) e completado para 200 µl em PBS, com agitação suave. A solução foi incubada por 14 horas a temperatura ambiente sob rotação. As microesferas foram separadas na plataforma magnética durante 5 minutos, até a solução ficar totalmente límpida para a remoção do sobrenadante. Foram realizadas 3 lavagens utilizando 200 µl de solução *Washing Buffer* (Invitrogen) em cada lavagem. As microesferas foram novamente colocadas na plataforma magnética para remoção do

sobrenadante e posteriormente o complexo Microesfera-Ac-Ag foi ressuspensão em solução *Washing Buffer* (Kit-Invitrogen).

4.4.3 Digestão e eluição dos epitopos

Para o processo de digestão foram empregadas 10 µl da solução de tripsina em tampão de bicarbonato de amônio (tripsina-20µg em 1ml de NH_4HCO_3 a 25 mM pH 7,8, para uma concentração final de 20 ng/µl), a solução foi agitada e incubada a 37°C. Três tempos de digestão foram utilizados (1 h, 6 h e 14 h). Após o período de digestão, as microesferas foram separadas em plataforma magnética durante 5 minutos, até a solução ficar totalmente límpida para remoção do sobrenadante. As microesferas foram lavadas com 200 µl de solução Ab Binding & Washing buffer com rotação por 5 minutos, separadas novamente na plataforma magnética durante 5 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes. Os epitopos foram eluídos com 20 µl de HCl 0,175 M pH 2,5, e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram secas em *Speed Vac* por aproximadamente uma hora. Após a secagem, as amostras foram estocadas a -20 °C. Para aplicação em coluna C18(Zip tip) (Millipore®) as amostras foram ressuspensas em 20 µl de solução de 0,1 % de TFA (Ácido trifluoroacético). Foi realizada nova passagem em *Speed Vac* para secagem das amostras. Os peptídeos foram ressuspensos em 20 µl de solução de 0,1 % de ácido fórmico, 0,3 % de acetonitrila. Por fim as amostras foram analisadas em ESI-Q-Tof micro (Waters MS Technologies DDA) HPLC/MS/MS. Este procedimento foi realizado pela UEMP (Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica – Instituto de Biofísica Carlos Chagas - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil).

4.5 Mapeamento dos determinantes antigênicos na proteína M- Spot Synthesis

Esta técnica consiste na síntese de peptídeos sobrepostos sobre uma membrana de nitrocelulose (FRANK,1992) de forma a percorrer parte ou a proteína completa. Uma biblioteca peptídica cobrindo toda a extensão da proteína M foi obtida utilizando a técnica F-moc através da metodologia semi-automática de *SPOT-SYNTHESIS* num sintetizador AutoSpot (modelo

ASP222) em colaboração com o Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, IOC – Plataforma Tecnológica de Síntese de Peptídeos - Fundação Oswaldo Cruz. O plano de distribuição dos aminoácidos, bem como a determinação dos protocolos para síntese das bibliotecas de peptídeos nas membranas, foram definidos por computação, utilizando o programa Multipeps (Intavis, Alemanha). A síntese foi iniciada pela ativação da membrana com piperidina em N, N-Dimetilformamida (DMF) (Sigma Aldrich) (20 % v/v), permitindo a exposição do grupamento N-terminal. O acoplamento dos aminoácidos foi possível após a ativação com solução 0,5 mmol/ml de Hidroxibenzotriazol (HOBt) (Sigma Aldrich) em N,N-1-metil-2-pirrolidona (NMP), (Sigma Aldrich) seguido da solução 1,1 mmol/ml de N,N-Diisopropylcarbodiimida (DIC) (Sigma Aldrich) em NMP, que reagiu com o grupamento amino livre do aminoácido anterior, propiciando o alongamento da cadeia peptídica no sentido C-terminal ao N-terminal. Após as lavagens manuais das membranas com solução de anidrido acético em DMF (2 % v/v), o ciclo recomeça com a retirada do grupamento protetor F-moc do aminoácido acoplado, com a utilização de solução de piperidina em DMF (20 % v/v) e metanol (Sigma Aldrich). Este processo é monitorado pela utilização de azul de bromofenol 0,001 % (p/v) em DMF que confere coloração aos grupamentos amino livres. No último ciclo, os grupamentos de proteção das cadeias laterais, assim como o F-moc existente no último aminoácido foram removidos pelo tratamento com solução de ácido trifluoroacético (TFA), diclorometano (DCM) e triisopropilsilano (1:1: 0,05 v/v). As membranas foram armazenadas a 4 °C sob proteção da luz, por no máximo 3 dias (figura 5).

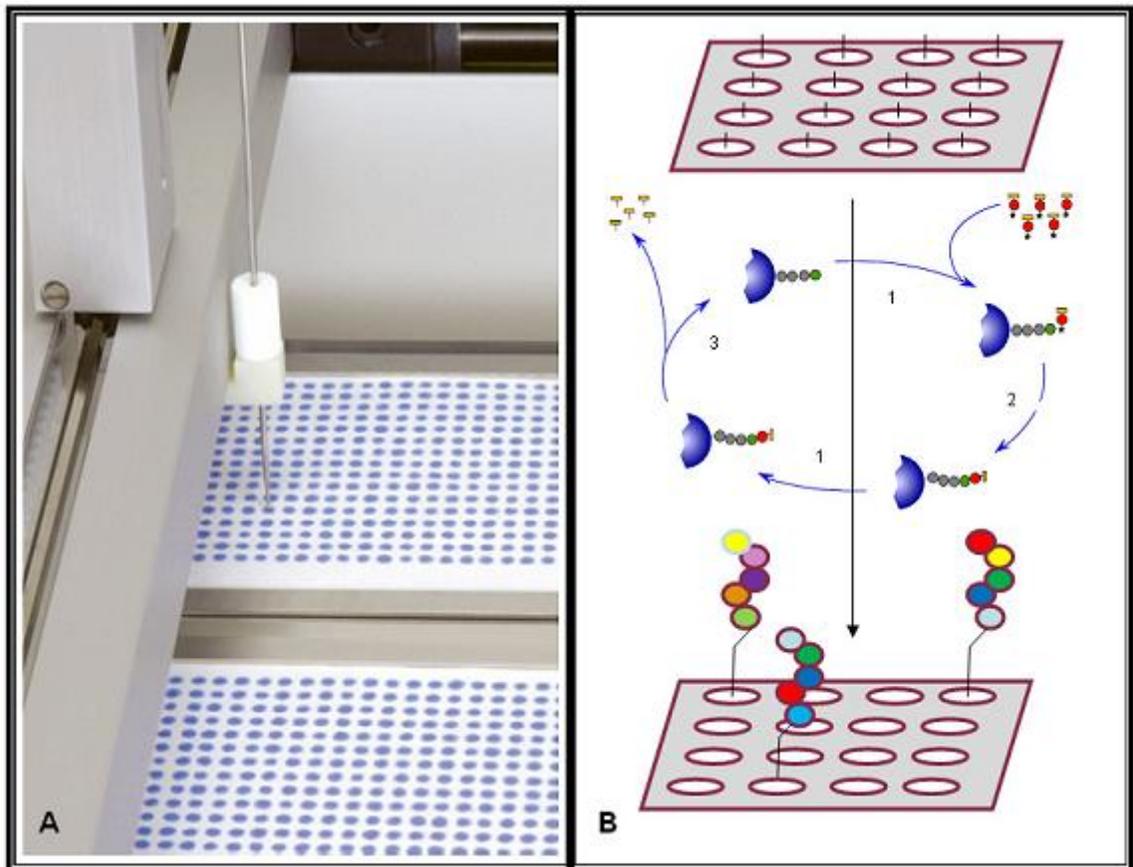


Figura 5: Princípio da síntese paralela de peptídeos em membrana. A: Inserção de resíduos em membrana de celulose formando gotas regulares. B: Figura esquemática da síntese de peptídeos, envolvendo ciclos sucessivos de lavagem (1), acoplamento (2) e desproteção (3) de cada resíduo (círculos coloridos) à sequência de peptídeos nascente (Adaptado de Frank; Overwin,1996; Frank,2002).

4.5.1 Ensaio imunológico

A reatividade dos peptídeos obtidos na síntese paralela em membrana foi avaliada através de ensaio imunológico de quimioluminescência realizado com o anticorpo monoclonal (1A7) (FRANK; OVERWIN, 1996).

Resumidamente, as membranas foram rinsadas por duas vezes com etanol e bloqueadas com tampão diluente pH 7,0 (0,13 M NaCl, 0,003 M KCl, 0,05 M Tris, 0,05 % Tween 20, 3 % de Skin milk) por 18 horas em temperatura de 2 a 8 °C. Em seguida, foram incubadas sob agitação por 4 horas em temperatura ambiente com anticorpo monoclonal 1A7 na diluição de

1:100 Foram realizadas 3 lavagens com tampão TBS-Tween 20 0,05 % pH 7,0 (0,13 M NaCl, 0,003 M KCl, 0,05 M Tris), com posterior incubação a temperatura ambiente sob agitação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Jackson Immunoresearch; phosphatase-conjugated affini-pure goat anti-mouse IgG), diluído 1:5000 em tampão diluente. Após duas lavagens com tampão TBS-Tween 20 0,05 % pH 7,0 e duas lavagens com tampão citrato (0,14 M NaCl, 0,003 M KCl, 0,05 M $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) as membranas foram incubadas com o substrato quimioluminescente CDP Star (Applied Biosystems, AC, US), expostas a filmes de raio-X (Kodak, São Paulo, SP, BR), e reveladas utilizando e revelador fixador GBX (Kodak, São Paulo, SP, BR) seguindo protocolo do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos – Plataforma Tecnológica de Síntese de Peptídeos – IOC – Fiocruz.

O padrão de reatividade foi analisado utilizando o software TotalLab – Nonlinear Dynamics.PD-Quest (Bio-Rad, USA). O sinal de intensidade foi quantificado pelo software usando algoritmos que comparam a intensidade entre o background e a área do spot, definindo empiricamente a probabilidade de que o sinal do spot seja distinta do sinal do background.

4.6 Síntese química de peptídeos

Após análise dos resultados obtidos através das técnicas de imunoprecipitação de proteínas e análise em espectrometria de massas (*Extraction epitope mapping /MS-MS*), a sequência obtida foi analisada através do banco de dados do BLAST UNIPROT, sintetizada pela empresa Biosynthesis (Lewisville, Texas) e recebidos liofilizados. Os peptídeos foram ressuspensos em água destilada estéril para uma concentração de 10mg/ml, alíquotados em alíquotas de 0,2 ml, as alíquotas para estudo imediato armazenadas a -20 °C, sendo as demais mantidas a -80 °C.

Diferentes desenhos foram empregados a fim de facilitar a ligação dos peptídeos às placas da reação. Foi adicionado à sequência cinco resíduos de lisina nas extremidades amino-terminal e carboxi-terminal. O peptídeo com os resíduos de lisina na extremidade amino-terminal foi chamado de peptídeo 1-d (10 mg/ml – MW 3161,04 g/mol), o peptídeo com os resíduos de lisina na extremidade carboxi-terminal foi chamado de peptídeo 1-c (10 mg/ml – MW 3161,04 g/mol). Outra conduta abordada foi a marcação com biotina, em ambas as extremidades, sendo peptídeo

1-a (10 mg/ml – MW2105,59 g/mol) na extremidade amino-terminal e peptídeo 1-b (10 mg/ml – MW 2147,67 g/mol) na extremidade carboxi-terminal. Foi também sintetizado o peptídeo 1-e (10mg/ml – MW 1552,89 g/mol), sem modificação. Todos os peptídeos foram sintetizados com grau de pureza de 75 a 80 %. A síntese das sequências foi realizada pela empresa Biosynthesis (quadro 1).

Peptideo	Concentração	Peso Molecular (g/mol)	Grau de pureza
Peptídeo1-a: Biotina N-terminal- Btn- P-T-K-I-I-P-E-E-L-V-P-F-T-P	5-10 mg/ml	2105,59	75 – 80 %
Peptídeo1-b: Biotina C-terminal- P-T-K-I-I-P-E-E-L-V-P-F-T-P -Btn	5-10 mg/ml	2147,67	75 – 80 %
Peptídeo1-c: 5 resíduos de lisina C- terminal- P-T-K-I-I-P-E-E-L-V-P-F-T-P -K-K- K-K-K-K-	5-10 mg/ml	3161,04	75 – 80 %
Peptídeo1-d: 5 resíduos de lisina N- terminal-K-K-K-K-K- P-T-K-I-I-P-E-E-L-V-P- F-T-P	5-10 mg/ml	3161,04	75 – 80 %
Peptídeo 1-e: P-T-K-I-I-P-E-E-L-V-P-F-T-P	5-10 mg/ml	1552,89	75 – 80 %

Quadro 1: Peptídeos sintetizados (biosynthesis – Lewisville-Texas)

4.7 Amostragem

Para padronização dos ELISAs, foram incluídos 20 soros de pacientes com diagnóstico de histoplasmose armazenados na Soroteca do Setor de Imunodiagnóstico do Laboratório de Micologia - IPEC. O critério de classificação de histoplasmose foi baseado no consenso europeu EORT/MSG (PAUW et al., 2008). Os casos foram previamente definidos como histoplasmose confirmada pelo isolamento do fungo em cultivo de espécimes clínicos e/ou casos prováveis por possuírem história epidemiológica, com imagens radiológicas compatíveis com micose pulmonar e com imunodifusão positiva em amostras de soro. Os controles foram definidos pela cultura ou imunodifusão negativas. Foram também incluídos no total 32 amostras de soros heterólogos (8 paracoccidioidomicose, 8 aspergilose, 8 coccidioidomicose e 8 tuberculose) e 8 amostras de soro provenientes de indivíduos hígidos como grupo controle.

4.8- Ensaio imunoenzimáticos

Para determinar a melhor concentração dos peptídeos sintéticos, estes foram testados nas concentrações que variaram de 0,1, 0,3, 1,0, 2,0 e 5,0 µg/ml nos diferentes ensaios realizados, diluídos em tampão carbonato 0,01 M pH 9,6 (NaHCO₃ 0,38 g/ml / Na₂CO₃ 0,192 g/ml). Para as seções de lavagens o tampão utilizado foi PBS-T(10mM PBS, 0,1% Tween 20, pH 7,3). Quando empregado mAb as diluições foram de 1:100 e 1:500, o soro policlonal de coelho anti-M recombinante nas diluições de 1:100, 1:500 e 1:1000 e os soros humanos as diluições de 1:200, 1:500 e 1:1.000. Como conjugados foram testados IgG de cabra anti-IgG de camundongo na diluição de 1:3.000, IgG de cabra anti-IgG de coelho 1:5.000 e IgG de cabra anti IgG humana nas diluições de 1:16.000, 1:5.000, 1:3.000. Todos conjugados empregados foram com a enzima peroxidase (Jackson Immunoresearch). As placas utilizadas nos ensaios foram Placas Nunctm Maxisorp, com excessão do ensaio com peptídeos biotinizados, onde foi utilizada a placa Streptawell (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Também foram testados diferentes tampões de bloqueio [10 mM PBS, 0,1 % Tween 20, pH 7,3 acrescido de Skin Milk(BD Difco) 5%, de BSA 1% (Sigma) e Gelatina 1 % (Gelatin from cold water fish skin –Sigma) e períodos de incubação (30 minutos, uma hora e duas horas)

Em todos os testes as amostras foram testadas em duplicatas e foram incluídos controles (controle do conjugado foi colocado apenas o antígeno e o conjugado, o branco onde foi colocado apenas o tampão da reação e controle positivo uma amostra de soro de paciente com histoplasmosse comprovada).

4.8.1 ELISA com microesferas carboxiladas

4.8.1.1 Preparo das microesferas carboxiladas

Microesferas carboxiladas 3 µm (Polysciences, Inc., Warrington, PA) foram lavadas em tampão carbonato (0,1 M), por centrifugação a 9000 rpm por 10 minutos, por duas vezes. O sedimento foi ressuspensão em tampão ácido 2-morfolinoetanolsulfônico 50 mM (MES), centrifugado a 9000 rpm por 10 minutos, por duas vezes. O sedimento foi ressuspensão em tampão

MES acrescido de solução de EDC a 2 % [1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride]. A solução foi incubada por 3 horas e mantida em plataforma agitadora a temperatura ambiente. Após o período de incubação o material foi centrifugado a 9000 rpm por 10 minutos, o sedimento foi ressuspensão em tampão MES a 0,1 M, a centrifugação foi realizada por 3 vezes. O sedimento foi ressuspensão em Tampão Borato 0,2 M. com adição de 400 µg de peptídeo (3 ou 4). A solução foi homogeneizada e incubada *overnight* a 4 °C. Iniciamos trabalhando com uma relação de beads de $5,5 \times 10^7$ beads/ml, diluídas em Tampão PBS 100 mM-BSA 1 %, e posteriormente, o protocolo foi adaptado para 5×10^6 microesferas/ml na tentativa de se obter melhores condições da reação.

4.8.1.2- Reação imunoenzimática com microesferas carboxiladas

Para o início da padronização iniciamos o ensaio empregando um *pool* de soros de pacientes com histoplasmose, paracoccidiodomicose, aspergilose, coccidiodomicose, tuberculose e indivíduos hígidos e como controles os anticorpos monoclonais diluídos em tampão de incubação (PBS 10mM / 1 % BSA), os quais foram testados frente aos peptídeos 1-c e 1-d. Como o peptídeo 1-c foi o que apresentou um maior poder discriminatório quanto a reatividade entre o *pool* de soros dos pacientes com histoplasmose, o *pool* de soro heterólogos e de indivíduos hígidos optamos por continuar a análise apenas com este peptídeo.

Nesta etapa de padronização empregando o peptídeo 1-c passamos a utilizar amostras individuais de soro de pacientes com histoplasmose (20), paracoccidiodomicose (8), aspergilose (8), coccidiodomicose (8), de pacientes com tuberculose (8) e de indivíduos hígidos (8) na diluição 1:200. Já os anticorpos monoclonais foram inicialmente utilizados na concentração de 20 µg/ml e posteriormente ajustados para concentração de 5 µg/ml, os soros policlonais e monoclonais foram deixados incubando por 1 hora a 37°C com agitação constante. Posteriormente foram realizadas 3 lavagens com PBS por centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. Após as lavagens realizou-se a incubação do sistema com anticorpos policlonais com conjugado (affinipure goat anti-human IgG, Fc fragment specific- peroxidase-conjugated-Jackson Immunoresearch) na diluição de 1:3.000, já para os anticorpos monoclonais foi utilizado o conjugado anti-mouse (affinipure goat anti-mouse IgG-peroxidase-conjugated-Jackson

Immunoresearch) na diluição de 1:3000, e incubado por 1 hora a 37 °C com agitação constante. Após três lavagens, a reação foi revelada com adição de 100 de dihidrocloro de o-fenilenodiamina [OPD; 0,4 mg/ml em 0,04 %(w/v) H₂O₂] diluído em 0,01 M de tampão citrato de sódio, pH 5,5. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de HCl 3M. O produto da reação foi transferido para as placas de 96 poços (Nunc-Immuno Satrwell, MaxiSorp Surface) onde as densidades ópticas (ODs) foram então determinadas empregando um leitor de ELISA (Bio-Rad model 550) com filtro de 490 nm.

4.8.2 ELISA com peptídeos biotinilados

Para este protocolo foram utilizadas placas de microtitulação Streptawell (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) revestidas com moléculas de estreptoavidina com a finalidade de facilitar a adesão dos peptídeos biotinilados à sua superfície. Foi aplicado o peptídeo 1 e 2 na concentração de 0,3 µg/ml diluídos em tampão carbonato, os soros heterólogos e homólogos foram testados na diluição de 1:500 e o conjugado (Jackson Immunoresearch; peroxidase-conjugated affinipure goat anti-human IgG, Fc fragment specific) na diluição de 1:3.000.

A etapa de sensibilização da placa de microtitulação foi desenvolvida conforme orientações obtidas do fabricante e os procedimentos da técnica de padronização foram executados como descrito a seguir: A placa de microtitulação com estreptoavidina foi lavada três vezes com solução tampão de lavagem (10 mM PBS, 0,1% Tween 20, pH 7,3) para posterior sensibilização com 100 µl da solução de peptídeos biotinilados diluídos em PBS nas concentrações acima descritas. As placas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C e por mais 18 horas a 4 °C. Foram realizadas três lavagens com tampão de lavagem, sendo então bloqueada com adição de 100 µl de tampão de incubação, e deixadas a 37 °C por uma hora, após este período foram lavadas novamente por três vezes com tampão de lavagem. Foi preparado diluição dos soros (1/500) em tampão de incubação e aplicados 100 µl a placa de microtitulação, seguida por incubação por uma hora a 37 °C. Após o período de incubação as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem. Foram aplicados 100 µl do conjugado (Jackson Immunoresearch; peroxidase-conjugated affinipure goat anti-human IgG, Fc fragment specific) diluído 1:3.000 em tampão de incubação. O sistema foi incubado por uma hora a 37 °C e posteriormente lavado três

vezes com tampão de lavagem. A reação foi revelada com 100 µL por poço da solução de dihidroclorato de o-fenilenodiamina (Sigma) [OPD; 0,4 mg/ml em 0,04%(w/v) H₂O₂] diluído em 0,01 M de tampão citrato de sódio pH 5,5, a reação se processou a 37 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de HCl 3M. As densidades ópticas (ODs) foram então determinadas empregando um leitor de ELISA (Bio-Rad Microplate Reader I Mark) no filtro de 490 nm. Foram incluídos nos testes, controle do conjugado e branco.

4.8.3 ELISA *sandwich* para detecção de anticorpos

Para este ensaio as placas de microtitulação de 96 poços (Nunc-Immuno Starwell, MaxiSorp Surface), foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal 1A7 (20 µg/ml). O anticorpo foi diluído em tampão carbonato pH 9,6. Após diluição foi aplicado 100 µl em cada poço da placa. As placas foram incubadas por 60 minutos a 37 °C e *overnight* a 4 °C. Após incubação foi realizada lavagem por três vezes com tampão PBS10 mM/Tween 0,05 % pH 7,2-7,4. A reação foi bloqueada com 100 µl de tampão PBS-Tween 0,05 % acrescido de 5 % de *Skin Milk*, incubada por 2h a 37 °C. Foram realizadas novas lavagens com tampão PBS- Tween 0,05 % pH 7,2-7,4. As placas foram incubados por uma hora a 37 °C com o antígeno (peptídeo 1-e) 5 µg/ml, em tampão PBS-Tween 0,05 % acrescido de 5 % de *Skin Milk*, aplicou-se 100 µl das amostras de soro (histoplasmose, parococcidioidomicose, aspergilose, tuberculose, coccidioidomicose e indivíduos hígidos) diluídas 1:500 em Tampão PBS-Tween 0,05 % -*Skin Milk* 5 % e incubada por uma hora a 37 °C. As placas foram lavadas por três vezes com 200 µl tampão PBS-Tween 0,05 % pH 7,2-7,4. Em seguida a reação foi incubada com 100 µl do conjugado (Jackson Immunoresearch; peroxidase-conjugated affinipure goat anti-human IgG, Fc fragment specific) diluído 1:3000 em tampão de incubação por 1 hora a 37 °C. Foram realizadas lavagens por três vezes com 100 µl tampão PBS-Tween 0,05 % pH7,2-7,4. Por fim a reação foi revelada com solução de dihidroclorato de o-fenilenodiamina (Sigma) [OPD; 0,4 mg/ml em 0,04 %(w/v) H₂O₂] diluído em 0,01M de tampão citrato de sódio, pH 5,5 a 37 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de HCl 3M. As densidades óticas foram determinadas empregando um leitor de ELISA (Bio-Rad Microplate Reader I Mark) no filtro de 490 nm.

4.8.4 ELISA de captura para detecção de antígeno

Para este ensaio os monoclonais (mAbs) 1A7 e 2B12 na concentração de 20 µg/ml diluídos em tampão carbonato pH 9,6 foram adicionados às placas de microtitulação de 96 poços (Nunc-Immuno Starwell, MaxiSorp Surface) incubados por 1h a 37 °C e a 4 °C *overnight*. Após esta incubação foram realizadas três lavagens com tampão de lavagem [PBS-T] (10mM PBS, 0,1% Tween 20, pH 7,3). A placa foi bloqueada com 100µl de tampão de PBS-T / 5% *Skin milk* (Tampão de incubação) por 2h à 37°C. As placas foram lavadas novamente por três vezes com tampão de lavagem. Adicionou-se 100 µl dos antígenos M recombinante e histoplasmina purificada e tratada nas diluições de 1:500, 1:1.000 e 1:2.000 em tampão de incubação e deixadas à 37 °C por 1 h, foi também incluída uma amostra de soro de paciente com histoplasmosse disseminada (20614) nas diluições de 1:500, 1:100, 1:2.000 e nova série de lavagens foi realizada. As placas foram incubadas com 100 µl do soro policlonal de coelho (anti-Mr) diluído em tampão de incubação nas diluições de 1:100, 1:500 e 1:1.000 por 1h à 37 °C. Seguiram-se mais três lavagens, e incubação com 100µl do conjugado *anti-rabbit* marcado com peroxidase diluído em tampão de incubação por 1h à 37 °C na diluição de 1:5.000. Após mais três lavagens a reação foi revelada aplicando-se 100 µl de OPD diluído em tampão citrato 0,01 M acrescido de 0,04 % de H₂O₂ por 30min à 37 °C. A reação foi interrompida com a adição de 50 µl de HCl 3 M a 37 °C por mais 30min, protegido contra luz. A densidade ótica foi determinada com absorbância a 490nm.

4.9 Análise dos resultados

Os resultados dos ensaios imunoenzimáticos foram analisados através do teste Mann-Whitney, teste não paramétrico, com intervalo de confiança de 95 %, utilizando o programa Prism(Prism GraphPad versão 5.0).

5 RESULTADOS

5.1 Expressão e purificação do antígeno M recombinante

O antígeno M recombinante, após expressão em *E.coli*, foi purificado em coluna Ni²⁺ – sepharose, as frações lidas em espectrofotômetro (280 nm). As frações com maior concentração proteica foram avaliadas pela técnica de SDS-PAGE (Figura 6).

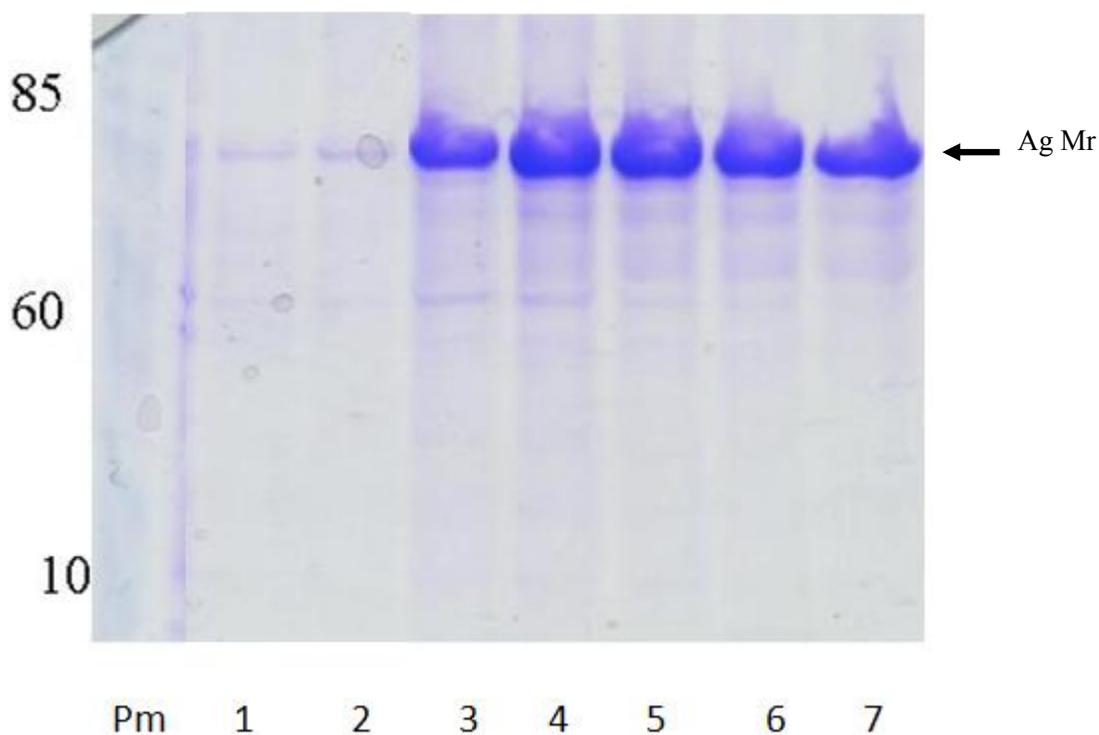


Figura 6: Análise da proteína M recombinante por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 10 %. PM - Peso Molecular ; Linha 1 e 2– sobrenadante antes da purificação; linhas 3 a 7- Frações contendo proteína M recombinante purificada.

5.2 Dosagem de proteínas

Após a expressão e a purificação do antígeno M recombinante, foi realizada a dosagem de proteínas pelo Micrométodo de Bradford. Foi calculada através da curva padrão com BSA uma concentração protéica de 0,62 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, no *pool* das frações obtidas.

5.3 Anticorpos monoclonais

Um total de 15 linhagens de anticorpos monoclonais (3H11,1A7,1E9, 1A12, 1G9, 4E6, 3F9, 2B10, 3E7, 2F2, 3A2, 2D2, 2F4, 2B3 e 2B12) foi obtido. Estes mAbs foram utilizados em Imunoblot para o reconhecimento de regiões no antígeno M recombinante e análise da sua especificidade.

5.3.1 Isotipagem dos anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais foram classificados quanto ao seu isotipo pelo método imunoenzimático ELISA indireto utilizando o *kit Mouse-Monoclonal Antibody Isotyping Reagents* (Sigma-Aldrich), de acordo com o protocolo determinado pelo fabricante. Após a isotipagem dos mAbs, obtivemos um painel composto de 15 imunoglobulinas da sub-classe IgG2b.

5.3.2 Análise dos anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais foram analisados quanto à sua especificidade e afinidade. Para tal diferentes extratos antigênicos foram empregados: os antígenos CYA – antígeno citoplasmático de *Histoplasma capsulatum* da fase leveduriforme; Pb 04 - antígeno filtrado de *Paracoccidioides brasiliensis*; Ss 23508 - antígeno citoplasmático de *Sporothrix schenckii*; Af 05 - antígeno filtrado de *Aspergillus fumigatus*, HMIN-PT- antígeno histoplasmina purificado e tratado e antígeno M recombinante. As concentrações protéicas totais estão demonstradas no quadro 2.

Extrato antigênico	Concentração proteica
CYA - antígeno de <i>Histoplasma capsulatum</i> fase leveduriforme	1,10 µg/µl
Pb04 - antígeno filtrado de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	0,69 µg/µl
Ss23508 - antígeno citoplasmático de <i>Sporothrix schenckii</i>	0,16 µg/µl
Af05 - antígeno filtrado de <i>Aspergillus fumigatus</i>	1,20 µg/µl
HMIN-PT- antígeno histoplasmina purificado e tratado	0,14 µg/µl

Quadro 2: Concentração protéica dos extratos antigênicos empregados nas análises dos anticorpos monoclonais

5.3.2.1 Afinidade dos anticorpos monoclonais

Os mAbs foram testados contra o antígeno M recombinante, e histoplasmina purificada e tratada com NaIO₄. Quando testados frente a histoplasmina purificada e tratada todos os mAbs foram reativos a uma proteína de 88 kDa (Figura 7 A), e quando frente ao antígeno Mr, todos os mAbs foram reativos a uma proteína de 80 kDa (Figura 7 B).

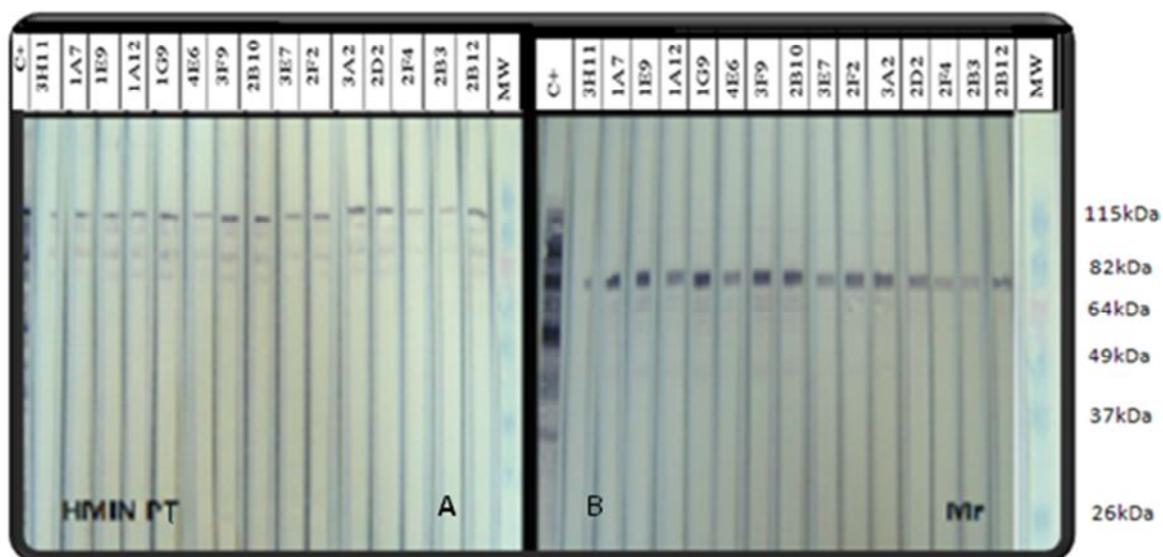


Figura 7: Padrão de reatividade no *Western Blot* dos anticorpos monoclonais testados frente ao antígeno Histoplasmina tratada com NaIO₄(HMIN-PT) (A) e Antígeno Mr (B).

5.3.2.2- Especificidade dos anticorpos monoclonais

Os mAbs não apresentaram reatividade quando testados frente aos antígenos, CYA- antígeno de *Histoplasma capsulatum* fase leveduriforme, Pb04- antígeno filtrado de *Paracoccidioides brasiliensis*, Ss23508- antígeno citoplasmático de *Sporothrix schenckii* e Af 05- antígeno filtrado de *Aspergillus fumigatus* (Figura 8).

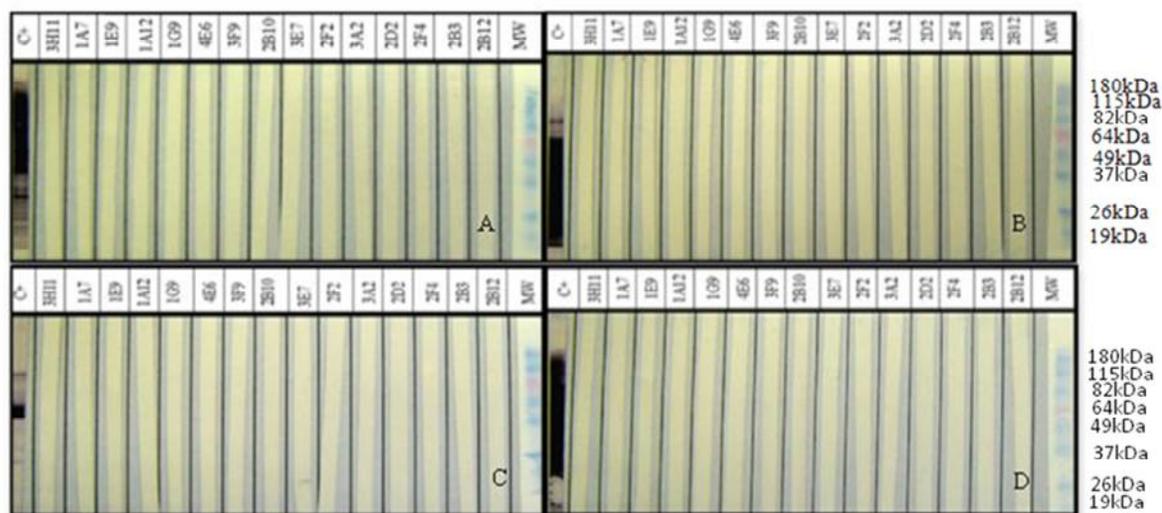


Figura 8: Padrão de reatividade no *Western blot* dos mAbs testados frente a outros extratos antigênicos: antígeno citoplasmático leveduriforme do *Histoplasma capsulatum* (A); antígeno citoplasmático leveduriforme do *Sporothrix schenckii* (B); antígeno filtrado de *Paracoccidioides brasiliensis* (C) e antígeno filtrado do *Aspergillus fumigatus* (D)

5.4 Coimunoprecipitação de proteínas e análise por espectrometria de massas

Após a reação de coimunoprecipitação, realizada com o anticorpo monoclonal 1A7 com o tempo de digestão de 14 horas e posterior análise por espectrometria de massa (Extraction epitope mapping/MS-MS) foi obtido como produto desta reação a sequência **IIPEELVPFTPIGK**, de massa 759.4061, correspondente aos aminoácidos 314-327(Figuras 9 e 10). Esta sequência foi analisada quanto ao parâmetro homologia e foi observado resultado satisfatório (Figura 11).

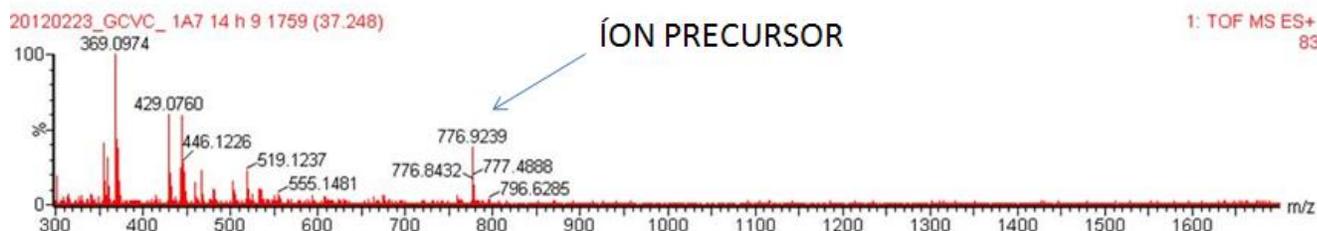


Figura 9: Identificação do íon precursor por espectrometria de massas

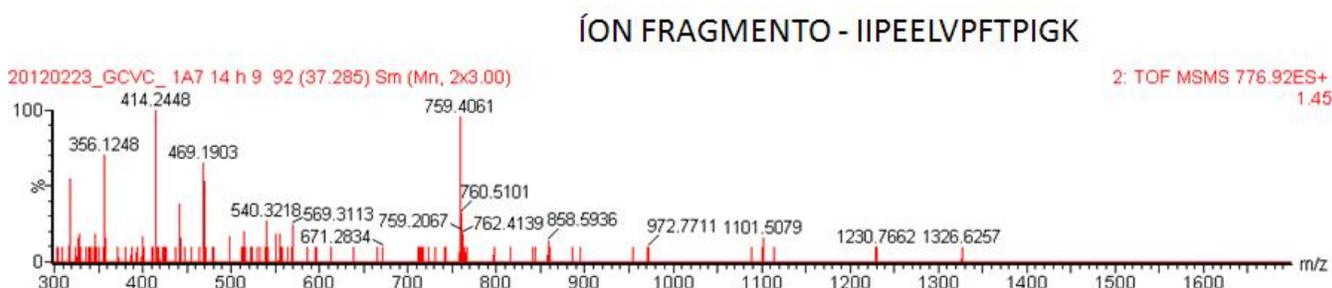


Figura 10: Fragmentação do íon precursor

BLAST UNIPROT DO PEPTÍDEO

Graphical overview

Color code for identity 0
-100% =

Accession	Entry name	0Query hit14	0Match hit (sqrt scale)808	Name (Organism)
<input type="checkbox"/> Query	201202252EPLX0SCOT			
<input checked="" type="checkbox"/> Q9Y7C2	CATB_AJECA			Catalase B (Ajellomyces capsulata)
<input checked="" type="checkbox"/> O13373	O13373_AJECA			M antigen (Ajellomyces capsulata)
<input type="checkbox"/> F0UHM7	F0UHM7_AJEC8			Catalase B (Ajellomyces capsulata (strain H88))
<input type="checkbox"/> C0NZ19	C0NZ19_AJECG			Catalase B (Ajellomyces capsulata (strain G186AR ...))
<input type="checkbox"/> A6RD70	A6RD70_AJECN			Catalase B (Ajellomyces capsulata (strain NAM1 / WU24))
<input type="checkbox"/> C6H5E4	C6H5E4_AJECH			Catalase B (Ajellomyces capsulata (strain H143))

Figura 11: Análise da Homologia da sequência obtida pela espectrometria de massas.

5.5 Mapeamento dos determinantes antigênicos na proteína M por Spot Synthesis

Uma biblioteca composta por um total 140 peptídeos foi construída cobrindo toda extensão da molécula do antígeno M. Tal estratégia foi composta por peptídeos contendo 14 aminoácidos com sobreposição de 9 aminoácidos. O Estudo do mapeamento dos epitopos presentes no antígeno M por *Spot Synthesis*, empregando na reação o anticorpo monoclonal 1A7, identificou a mesma sequência obtida pela técnica de coimunoprecipitação e análise por espectrometria de massas. A reação quando revelada apresentou apenas um spot reativo (**C15-T-K-I-I-P-E-E-L-V-P-F-T-P**) (Tabela 1), correspondente aos aminoácidos 312 – 324 da proteína M recombinante. Essa sequência apresentava cobertura similar àquela obtida pela técnica de coimunoprecipitação e análise por espectrometria de massas.

SPOT	SEQUENCIA	SPOT	SEQUENCIA	SPOT	SEQUENCIA	SPOT	SEQUENCIA
A1	M-P-S-G-Q-K-G-P-L-D-R-R-H-D	B13	D-S-E-I-P-Q-A-A-T-A-H-D-T-A	D1	P-L-L-Q-G-R-L-Y-S-Y-L-D-T-Q	E13	G-T-N-L-L-R-L-D-G-L-K-I-A-L
A2	K-G-P-L-D-R-R-H-D-T-L-S-D-P	B14	Q-A-A-T-A-H-D-T-A-W-D-F-L-S	D2	R-L-Y-S-Y-L-D-T-Q-L-N-R-H-G	E14	R-L-D-G-L-K-I-A-L-L-T-R-D-D
A3	R-R-H-D-T-L-S-D-P-T-D-Q-F-L	B15	H-D-T-A-W-D-F-L-S-Q-Q-P-S-S	D3	L-D-T-Q-L-N-R-H-G-G-P-N-F-E	E15	K-I-A-L-L-T-R-D-D-G-S-F-T-I
A4	L-S-D-P-T-D-Q-F-L-S-K-F-Y-I	B16	D-F-L-S-Q-Q-P-S-S-L-H-A-L-F	D4	N-R-H-G-G-P-N-F-E-Q-L-P-I-N	E16	T-R-D-D-G-S-F-T-I-A-E-Q-L-R
A5	D-Q-F-L-S-K-F-Y-I-D-D-E-Q-S	B17	Q-P-S-S-L-H-A-L-F-W-A-M-S-G	D5	P-N-F-E-Q-L-P-I-N-R-P-R-I-P	E17	S-F-T-I-A-E-Q-L-R-A-A-F-N-S
A6	K-F-Y-I-D-D-E-Q-S-V-L-T-T-D	B18	H-A-L-F-W-A-M-S-G-H-G-I-P-R	D6	L-P-I-N-R-P-R-I-P-F-H-N-N-N	E18	E-Q-L-R-A-A-F-N-S-A-N-N-K-V
A7	D-E-Q-S-V-L-T-T-D-V-G-G-P-I	B19	A-M-S-G-H-G-I-P-R-S-M-R-H-V	D7	P-R-I-P-F-H-N-N-N-R-D-G-A-G	E19	A-F-N-S-A-N-N-K-V-D-I-V-L-V
A8	L-T-T-D-V-G-G-P-I-E-D-Q-H-S	B20	G-I-P-R-S-M-R-H-V-D-G-W-G-V	D8	H-N-N-N-R-D-G-A-G-Q-M-F-I-P	E20	N-N-K-V-D-I-V-L-V-G-S-S-L-D
A9	G-G-P-I-E-D-Q-H-S-L-K-A-G-N	B21	M-R-H-V-D-G-W-G-V-H-T-F-R-L	D9	D-G-A-G-Q-M-F-I-P-L-N-T-A-A	E21	I-V-L-V-G-S-S-L-D-P-Q-R-G-V
A10	D-Q-H-S-L-K-A-G-N-R-G-P-T-L	B22	G-W-G-V-H-T-F-R-L-V-T-D-E-G	D10	M-F-I-P-L-N-T-A-A-Y-T-P-N-S	E22	S-S-L-D-P-Q-R-G-V-N-M-T-Y-S
A11	K-A-G-N-R-G-P-T-L-L-E-D-F-I	B23	T-F-R-L-V-T-D-E-G-N-S-T-L-V	D11	N-T-A-A-Y-T-P-N-S-M-S-N-G-F	E23	Q-R-G-V-N-M-T-Y-S-G-A-D-G-S
A12	G-P-T-L-L-E-D-F-I-F-R-Q-K-I	B24	T-D-E-G-N-S-T-L-V-K-F-R-W-K	D12	T-P-N-S-M-S-N-G-F-P-Q-Q-A-N	E24	M-T-Y-S-G-A-D-G-S-I-F-D-A-V
A13	E-D-F-I-F-R-Q-K-I-Q-H-F-D-H	C1	S-T-L-V-K-F-R-W-K-T-L-Q-G-R	D13	S-N-G-F-P-Q-Q-A-N-R-T-H-N-R	F1	A-D-G-S-I-F-D-A-V-I-V-V-G-G
A14	K-Q-K-I-Q-H-F-D-H-E-R-V-P-E	C2	F-R-W-K-T-L-Q-G-R-A-G-L-V-W	D14	Q-Q-A-N-R-T-H-N-R-G-F-F-T-A	F2	F-D-A-V-I-V-V-G-G-L-L-T-S-A
A15	H-F-D-H-E-R-V-P-E-R-A-V-H-A	C3	L-Q-G-R-A-G-L-V-W-E-E-A-Q-A	D15	T-H-N-R-G-F-F-T-A-P-G-R-M-V	F3	V-V-G-G-L-L-T-S-A-S-T-Q-Y-P
A16	R-V-P-E-R-A-V-H-A-R-G-A-G-A	C4	G-L-V-W-E-E-A-Q-A-L-G-G-K-N	D16	F-F-T-A-P-G-R-M-V-N-G-P-L-V	F4	L-T-S-A-S-T-Q-Y-P-R-G-R-P-L
A17	A-V-H-A-R-G-A-G-A-H-G-V-F-T	C5	E-A-Q-A-L-G-G-K-N-P-D-F-H-R	D17	G-R-M-V-N-G-P-L-V-R-E-L-S-P	F5	T-Q-Y-P-R-G-R-P-L-R-I-I-T-D
A18	G-A-G-A-H-G-V-F-T-S-Y-N-N-W	C6	G-G-K-N-P-D-F-H-R-Q-D-L-W-D	D18	G-P-L-V-R-E-L-S-P-S-F-N-D-V	F6	G-R-P-L-R-I-I-T-D-A-Y-A-Y-G
A19	G-V-F-T-S-Y-N-N-W-S-N-I-T-A	C7	D-F-H-R-Q-D-L-W-D-A-I-E-S-G	D19	E-L-S-P-S-F-N-D-V-W-S-Q-P-R	F7	I-I-T-D-A-Y-A-Y-G-K-P-V-G-A
A20	Y-N-N-W-S-N-I-T-A-A-S-F-L-N	C8	D-L-W-D-A-I-E-S-G-R-Y-P-E-W	D20	F-N-D-V-W-S-Q-P-R-L-F-Y-N-S	F8	Y-A-Y-G-K-P-V-G-A-V-G-D-G-S
A21	N-I-T-A-A-S-F-L-N-A-A-G-K-Q	C9	I-E-S-G-R-Y-P-E-W-E-L-G-F-Q	D21	S-Q-P-R-L-F-Y-N-S-L-T-V-F-E	F9	P-V-G-A-V-G-D-D-S-N-E-A-L-R
A22	S-F-L-N-A-A-G-K-Q-T-P-V-F-V	C10	Y-P-E-W-E-L-G-F-Q-L-V-N-E-A	D22	F-Y-N-S-L-T-V-F-E-K-Q-F-L-V	F10	G-D-G-S-N-E-A-L-R-D-V-L-M-A
A23	A-G-K-Q-T-P-V-F-V-R-F-S-T-V	C11	L-G-F-Q-L-V-N-E-A-D-Q-S-K-F	D23	T-V-F-E-K-Q-F-L-V-N-A-M-R-F	F11	E-A-L-R-D-V-L-M-A-A-G-G-D-A
A24	P-V-F-V-R-F-S-T-V-A-G-S-R-G	C12	V-N-E-A-D-Q-S-K-F-D-F-D-L-L	D24	Q-F-L-V-N-A-M-R-F-E-N-S-H-V	F12	V-L-M-A-A-G-G-D-A-S-N-G-L-D
B1	F-S-T-V-A-G-S-R-G-S-V-D-S-A	C13	Q-S-K-F-D-F-D-L-L-D-P-T-K-I	E1	A-M-R-F-E-N-S-H-V-R-S-E-T-V	F13	G-G-D-A-S-N-G-L-D-Q-P-G-V-Y
B2	G-S-R-G-S-V-D-S-A-R-D-I-H-G	C14	F-D-L-L-D-P-T-K-I-I-P-E-E-L	E2	N-S-H-V-R-S-E-T-V-R-K-N-V-I	F14	N-G-L-D-Q-P-G-V-Y-I-S-N-D-V
B3	V-D-S-A-R-D-I-H-G-F-A-T-R-L	C15	P-T-K-I-I-P-E-E-L-V-P-F-T-P	E3	S-E-T-V-R-K-N-V-I-I-Q-L-N-R	F15	P-G-V-Y-I-S-N-D-V-S-E-A-Y-V
B4	D-I-H-G-F-A-T-R-L-Y-T-D-E-G	C16	P-E-E-L-V-P-F-T-P-I-G-K-M-V	E4	K-N-V-I-I-Q-L-N-R-V-D-N-D-L	F16	S-N-D-V-S-E-A-Y-V-R-S-V-L-D
B5	A-T-R-L-Y-T-D-E-G-N-F-D-I	C17	P-F-T-P-I-G-K-M-V-L-N-R-N-P	E5	Q-L-N-R-V-D-N-D-L-A-R-R-V-A	F17	E-A-Y-V-R-S-V-L-D-G-L-T-A-Y
B6	T-D-E-G-N-F-D-I-V-G-N-N-V-P-V	C18	G-K-M-V-L-N-R-N-P-K-S-Y-F-A	E6	D-N-D-L-A-R-R-V-A-L-A-I-G-V	F18	S-V-L-D-G-L-T-A-Y-R-F-L-N-R
B7	F-D-I-V-G-N-N-V-P-V-F-F-I-Q	C19	N-R-N-P-K-S-Y-F-A-E-T-E-Q-I	E7	R-R-V-A-L-A-I-G-V-E-P-P-S-P	F19	L-T-A-Y-R-F-L-N-R-F-P-L-D-R
B8	N-N-V-P-V-F-F-I-Q-D-A-I-Q-F	C20	S-Y-F-A-E-T-E-Q-I-M-F-Q-P-G	E8	A-I-G-V-E-P-P-S-P-D-P-T-F-Y	F20	T-A-Y-R-F-L-N-R-F-P-L-D-R-S
B9	F-F-I-Q-D-A-I-Q-F-P-D-L-I-H	C21	T-E-Q-I-M-F-Q-P-G-H-V-V-R-G	E9	P-P-S-P-D-P-T-F-Y-H-N-K-A-T	F21	Q-E-V-R-K-Y-F-C-V
B10	A-I-Q-F-P-D-L-I-H-A-V-K-P-Q	C22	F-Q-P-G-H-V-V-R-G-L-D-F-T-D	E10	P-T-F-Y-H-N-K-A-T-V-P-I-G-T	F22	G-Y-P-K-D-G-N-A-F-N-N-L-D
B11	D-L-I-H-A-V-K-P-Q-P-D-S-E-I	C23	V-V-R-G-I-D-F-T-D-D-P-L-L-Q	E11	N-K-A-T-V-P-I-G-T-F-G-T-N-L		
B12	V-K-P-Q-P-D-S-E-I-P-Q-A-A-T	C24	D-F-T-D-D-P-L-L-Q-G-R-L-Y-S	E12	P-I-G-T-F-G-T-N-L-L-R-L-D-G		

Tabela 1: Disposição da sequência peptídica do antígeno M recombinante no equipamento – Spot C15 (destacado em amarelo) reconhecido pelo mAb 1A7

Sendo assim, optamos por sintetizar a sequência comum identificada pelas duas metodologias.

5.6- Síntese de peptídeos

Os peptídeos sintetizados e suas condições estão representadas no quadro 1, apresentado na seção 4, materiais e métodos.

5.7 Ensaio imunoenzimático

5.7.1 ELISA com microesferas carboxiladas

Neste modelo de reação foram empregados inicialmente os peptídeos 1-c e 1-d (extensão com resíduos de lisina) [quadro 1], as condições da reação previamente padronizadas foram: suspensão das microesferas 5×10^6 microesferas/ml, as amostras de soro na diluição de 1:200. Inicialmente, as reações foram realizadas com *pool* das amostras, os anticorpos monoclonais na concentração de $5\mu\text{g/ml}$ e a diluição do conjugado 1:3000. A análise dos resultados prévios com o emprego de *pool* de soros revelou que o peptídeo 1-c apresentou um maior poder discriminatório entre a reatividade dos soros de pacientes com histoplasmosose e de indivíduo hígidos. Deste modo optamos por seguir na execução desta técnica analisando amostras de soro individuais somente com o peptídeo 1-c.

Após realização da técnica nas condições previamente estabelecidas, com emprego de soros individuais e leitura em leitor de placas Bio-Rad model 550 com filtro 490 nm, observamos que não foi obtida uma diferença significativa entre as leituras das diferentes amostras testadas, resultado discordante do encontrado na primeira análise com *pool* de soros. Obteve-se um ponto de corte elevado, calculado através da média das DOs das amostras dos indivíduos hígidos mais 2 vezes o desvio padrão, e desta forma a grande maioria das amostras de soro de histoplasmosose apresentaram valores inferiores ao ponto de corte, com uma sensibilidade encontrada de 10% (Figura 12) [Quadro 3].

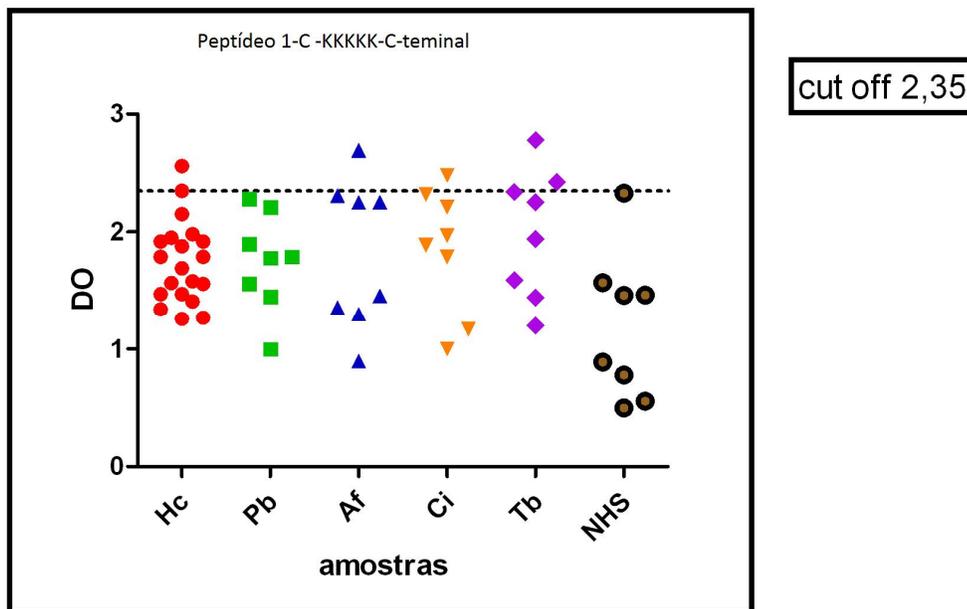


Figura 12: Resultados obtidos no ELISA com peptídeo 1-c (resíduos de lisina na porção C-terminal), distribuição das média das densidades óticas (DO) obtidas nas diferentes amostras de soro analisadas (Hc-Histoplasmose, Pb-Paracoccidioidomicose, Af- Aspergilose, Ci- Coccidioidomicose, Tb-Tuberculose e NHS- Soro de indivíduos hígidos).

5.7.2 ELISA com peptídeos biotinilados

Para este modelo de ensaio os peptídeos empregados foram os peptídeos 1-a (Btn - N-terminal) e 1-b (Btn - C-terminal)[quadro1]. Após testes de padronização optou-se por trabalhar nas seguintes condições: 0,3µg/ml do peptídeo, soro na diluição de 1:500 e conjugado na diluição 1:3000. Para esta reação o tampão de bloqueio empregado foi o acrescido de gelatina a 1 %.

Quando comparamos o emprego destes dois peptídeos foi possível observar que ocorreu uma queda nas leituras das DOs nos grupos das amostras de soros heterólogos quando testado o peptídeo 1-b (Btn- C-terminal), porém o mesmo foi observado com soros de pacientes com histoplasmose. Já com relação ao emprego do peptídeo 1-a observamos uma maior sensibilidade em detectar os casos de histoplasmose, porém uma queda na especificidade da reação foi detectada. Para o peptídeo 1-a a sensibilidade e especificidade foi de 100-20 % (Figura 13-a) e para o peptídeo 1-b, 95-27 % respectivamente (Figura 14-a).

Foi possível perceber que os ensaios com o peptídeo 1-a e 1-b foi capaz de apresentar diferenças significativas ($P < 0,0001$ e $P < 0,0003$, respectivamente) quando comparamos os resultados encontrados nas amostras de soro de pacientes com histoplasmose e soro de indivíduos hígidos (NHS) (Figuras 13-b e 14-b). O ponto de corte foi calculado através da média das DOs das amostras dos indivíduos hígidos mais 2 vezes o desvio padrão (Quadro 3).

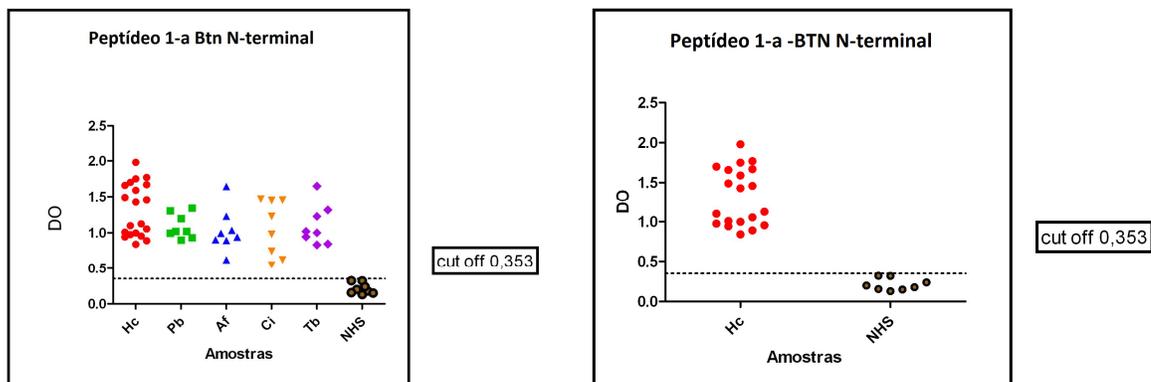


Figura 13-a e 13-b: Resultados obtidos na ELISA com peptídeo 1-a (adição de biotina na porção N-terminal), distribuição da média das densidades óticas obtidas (DO) nas diferentes amostras de soro analisadas (Hc- Histoplasmose, Pb- Paracoccidiodomicose, Af- Aspergilose, Ci- Coccidiodomicose, Tb- Tuberculose e NHS- Soro de indivíduos hígidos) [A]. Distribuição da média das densidades óticas obtidas entre as amostras de pacientes com histoplasmose (Hc) e indivíduos hígidos (NHS) [B].

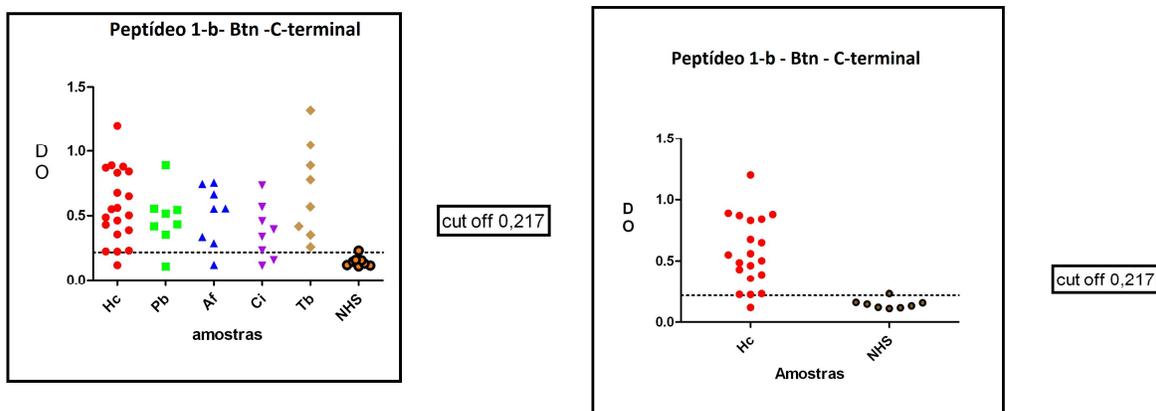


Figura 14-a e 14-b: Resultados obtidos na ELISA com peptídeo 1-b (adição de biotina na porção C-terminal), distribuição das médias de densidades óticas (DO) obtidas nas diferentes amostras de soro analisadas (Hc- Histoplasmose, Pb- Paracoccidiodomicose, Af- Aspergilose, Ci- Coccidiodomicose, Tb- Tuberculose e NHS- Soro de indivíduos hígidos) [A]. Distribuição da média das densidades óticas obtidas entre as amostras de pacientes com histoplasmose (Hc) e indivíduos hígidos (NHS) [B].

5.7.3 ELISA *sandwich* para detecção de anticorpo

Nesta metodologia após estudos prévios foi padronizada as seguintes condições: Para aplicação do anticorpo monoclonal utilizou-se 20 µg/ml, para a adição do peptídeo 1-e (P-T-K-I-I-P-E-E-L-V-P-F-T-P) foi utilizada a concentração de 0,5 µg/ml, nas amostras de soro analisadas a diluição empregada foi de 1:200, para estas reações o tampão de incubação selecionado foi o acrescido de *Skin Milk* 5 %, o conjugado foi aplicado na diluição de 1:3000. Os resultados obtidos entre as amostras analisadas não apresentaram diferenças significativas entre os valores de densidade ótica nos diferentes grupos analisados (figura 15). O ponto de corte estabelecido para esta reação também apresentou um resultado elevado, o que fez com que este ensaio apresentasse uma baixa sensibilidade (5 %)[Quadro 3].

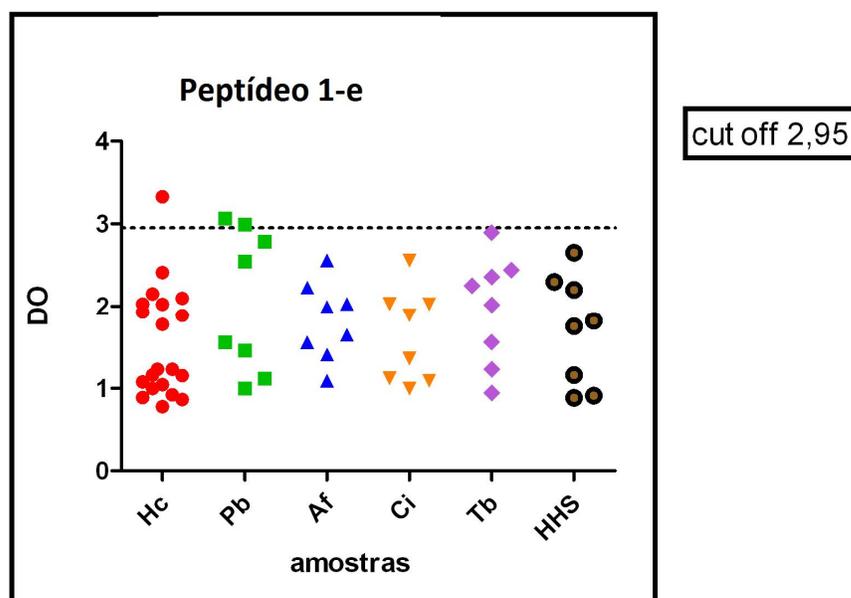


Figura 15: Resultados obtidos no ELISA com peptídeo 1-e (P-T-K-I-I-P-E-E-L-V-P-F-T-P), distribuição das médias das densidades óticas (DO) obtidas nas diferentes amostras de soro analisadas (Hc-Histoplasmoe, Pb-Paracoccidioidomicose, Af- Aspergilose, Ci- Coccidioidomicose, Tb-Tuberculose e NHS-Soro de indivíduos hígidos).

	Peptídeo 1-a	Peptídeo 1-b	Peptídeo 1-c	Peptídeo 1-e
sensibilidade	100 %	95 %	10 %	5 %
especificidade	20 %	27 %	82 %	92,5 %

Quadro 3: Sensibilidade e especificidade encontradas nos diferentes peptídeos analisados.

5.7.4 ELISA captura para detecção de antígeno

Os resultados encontrados neste ensaio apresentaram-se promissores. Quanto ao emprego dos anticorpos monoclonais 2B12 e 1A7 observamos uma variação nas leituras de densidades óticas, onde as leituras obtidas com o monoclonal 1A7 foram superiores quando comparado ao monoclonal 2B12. Quanto à diluição do soro policlonal de coelho a melhor diluição foi a 1:100, isto foi mais fortemente evidenciado quando o antígeno empregado foi a histoplasmina, onde foi observada uma queda nas leituras das amostras nas diluições do soro policlonal de 1:500 e 1:1000. Na amostra de soro empregada não foram observadas diferenças significativas nas diferentes diluições utilizadas nos ensaio de captura para detecção de antígeno (Quadro 4). Vale salientar que este ensaio necessita de maiores avaliações, como inserir um maior número de amostras de soro de pacientes com histoplasmosose, bem como de amostra de soros heterólogos e de indivíduos hígidos. Este ensaio nos permitiu obter as condições iniciais para avançarmos nas análises das amostras.

	1A7						2B12					
	Poli 1:100 Soro + 1:500		Poli 1:500 Soro + 1:1000		Poli 1:1000 Soro + 1:2000		Poli 1:100 Soro + 1:500		Poli 1:500 Soro + 1:1000		Poli 1:1000 Soro + 1:2000	
Mr 5µg	2,227	2,315	1,164	1,193	0,958	0,983	2,115	2,120	0,973	0,997	0,740	0,759
Hmin 1 µg	0,781	0,857	0,532	0,521	0,455	0,435	0,743	0,685	0,351	0,348	0,276	0,274
Hmin 2,5µg	0,769	0,854	0,470	0,501	0,448	0,461	0,718	0,676	0,326	0,304	0,274	0,297
Hmin 5 µg	0,782	0,843	0,453	0,538	0,443	0,458	0,711	0,648	0,313	0,302	0,265	0,286
20614	0,865	0,875	0,884	0,946	0,863	0,897	0,689	0,677	0,656	0,593	0,625	0,642
	0,345	0,336	0,314	0,337	0,294	0,196	0,204	0,196	0,197	0,187	0,286	0,277

	Sem policlonal
	Sem policlonal e sem antígeno
	Branco

Quadro 4: Resultados encontrados na ELISA de captura para detecção de antígeno. Poli-anticorpo policlonal anti-antígeno Mr; Mr- antígeno M recombinante; Hmin- Antígeno histoplasmina purificada e tratada; 20614-Soro de paciente com histoplasmose disseminada; Soro+ 20614; 1A7 e 2B12- anticorpo monoclonal anti-antígeno M recombinante.

6 DISCUSSÃO

A confirmação do diagnóstico da histoplasmose é obtida através da cultura deste microorganismo, o qual demanda um tempo relativamente grande, e em casos como na forma disseminada da doença, podendo ocorrer após óbito do paciente. Deste modo, o diagnóstico sorológico pode auxiliar fornecendo resultados de forma mais rápida e precisa. Na histoplasmose a sorologia tem sido usada rotineiramente para auxiliar o diagnóstico desta infecção. Entretanto a detecção de anticorpos pode produzir resultados falso positivos e negativos, devido às limitações das técnicas empregadas, tanto relacionadas à especificidade quanto à sensibilidade.

Os antígenos H e M têm alto valor diagnóstico por serem imunodominantes, pluripotentes, desencadeando tanto a resposta imune humoral quanto a celular (BRADLEY et al., 1974; GREEN ;PINE, 1985; HEINER, 1958; REISS et al., 1986).

Em estudos realizados com o antígeno M foi observado que os epítomos peptídicos são os responsáveis pela antigenicidade da glicoproteína M, porém foi constatado também que há presença de epítomos glicosilados resistentes à ação do metaperiodato de sódio (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1994-a).

Nosso grupo vem se dedicando a um maior conhecimento deste antígeno bem como sua aplicação em técnicas diagnósticas com maior limiar de detecção, por ser este considerado um marcador para doença em atividade e ser considerado imunodominante.

O antígeno M foi caracterizado como sendo uma catalase (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al.,1999). Nosso grupo avaliou a reatividade da proteína M recombinante em ELISA para detecção de anticorpos em soros de pacientes com histoplasmose comprovada onde foi observada 88% de sensibilidade e 85% de especificidade (dados não publicados). Esses resultados encontrados com o emprego da molécula M recombinante poderiam estar associados às características estruturais da molécula que podem comprometer a especificidade dos testes, uma vez que já foi descrito que diferentes microorganismos compartilham determinadas moléculas incluindo as de seus hospedeiros (NOYA et al., 2003).

Diante dos estudos realizados para um maior conhecimento desta molécula em trabalhos já citados anteriormente, onde dentre eles foi sugerido que a proteína M apresenta regiões específicas (GUEDES et al., 2003), e das análises realizadas através de testes de ELISA e estudos de bioinformática onde foram preditas regiões antigênicas presentes nesta molécula

(GUIMARÃES et al., 2008), visamos no presente estudo identificar peptídeos antigênicos presentes no antígeno M para utilização em ensaios imunoenzimáticos, e desta forma promover melhorias no diagnóstico da histoplasmose. Para tal, empregamos estratégias como a coimunoprecipitação combinada à análise por espectrometria de massas e a técnica de *Spot Synthesis*, para identificar possíveis determinantes antigênicos, visando posterior síntese e aplicação em ensaios imunoenzimáticos.

A utilização de peptídeos sintéticos nos testes imunológicos apresentam vantagens de não dependerem de fonte natural de antígenos e de serem constituídos de uma composição definida (GOMARA; HARO, 2007), de modo geral o uso de epitopos peptídicos aumentam a especificidade e sensibilidade encontrada nos ensaios imunoenzimáticos empregados no diagnóstico (GEYSEN et al., 1987). Esse peptídeos são obtidos em quantidades suficientes e com alto grau de pureza, garantindo a homogeneidade e controle de qualidade dos lotes antigênicos (NOYA et al., 2003), o que em muito favorece sua aplicação em testes diagnósticos, já que a obtenção de extratos antigênicos para diagnóstico das infecções fúngicas apresentam variações que comprometem seu rendimento nas reações sorológicas que podem estar relacionadas ao fungo, a diferenças de meio de cultura e condições de cultivo dos mesmos (CALDINI et al., 2012).

Sendo assim, o emprego de peptídeos sintéticos como antígenos vem sendo estudado e obtido por diferentes metodologias, visando tanto seu emprego no diagnóstico quanto em esquemas de imunizações. A utilização de peptídeos sintéticos pode eliminar uma variedade de epitopos encontrados nos complexos antigênicos, e que poderiam ser responsáveis por reações cruzadas, aumentando assim a especificidade dos ensaios e contribuindo para um melhoramento no diagnóstico. Porém vale salientar, que vários parâmetros devem ser analisados quanto ao emprego dos possíveis epitopos antigênicos em ensaios imunológicos, dentre eles o tamanho da sequência, as características dos aminoácidos presentes, que determina o estado conformacional da molécula e parâmetros como solubilidade.

Para cumprimento dos objetivos do presente estudo foi realizada inicialmente a técnica de coimunoprecipitação combinada a análise em espectrometria de massas para detectar possíveis regiões antigênicas na molécula do antígeno M recombinante. Para esta etapa foi empregado anticorpo monoclonal (1A7) previamente analisado quanto à sua reatividade. Na reação de

coimunoprecipitação, após análise por espectrometria de massas foi possível detectar a sequência IIPEELVPFTPIGK. Esta sequência foi analisada quanto a homologia, onde apresentou resultados satisfatórios (BLAST UNIPROT).

Outra metodologia utilizada foi o mapeamento dos determinantes antigênicos pela técnica de *Spot Synthesis*. Nesta metodologia foi possível através do emprego do anticorpo monoclonal 1A7 obter como resultado a mesma sequência detectada pela coimunoprecipitação (PTKIIPEELVPFTP), a pequena diferença de alguns aminoácidos pode ser justificada pela ação da enzima tripsina durante o processo de digestão, podendo desta forma gerar fragmentos que não representam somente a região de formação do imunocomplexo.

Como foi observada uma área de sobreposição entre as sequências obtidas por ambas metodologias, e considerando que a técnica de *spot synthesis* tem um grande poder em identificar os aminoácidos exatos das sequências de pequenos epitopos (DE-SIMONE et al., 2013), nós optamos por sintetizar a sequência obtida pela técnica de *spot synthesis*. A sequência foi sintetizada com diferentes desenhos, visando melhor adsorção dos peptídeos aos suportes das reações. Porém quando realizamos os diferentes ensaios imunoenzimáticos com esta sequência nos deparamos com um número elevado de reações cruzadas.

É relatado que a adsorção direta dos peptídeos antigênicos às placas pode apresentar resultados insatisfatórios. Vários fatores já foram descritos que podem estar relacionados a estes resultados, dentre eles, a alteração conformacional quando imobilizado, levando à perda da formação do imunocomplexo e o tamanho do peptídeo (peptídeo com menos de 20 aminoácidos) (CANO A., et al., 2004; GEEG; ETZLER, 1993; RIBEIRO et al., 2010; VALERIE, 1991). Por outro lado, peptídeos longos podem ser formados por diversos epitopos e conseqüentemente apresentar um maior índice de reações inespecíficas nos ensaios imunológicos (BRIAND et al., 1985; TAM ; ZAVALA, 1989). Sendo assim deve-se selecionar as condições apropriadas para adsorção de peptídeos sintéticos nas reações sorológicas, diferentes metodologias já foram descritas para otimizar a adsorção de peptídeos sintéticos nos suportes plásticos, dentre elas, conjugação a proteínas carreadoras BSA (soro albumina bovina), OVA (ovalbumina), adição de resíduos de lisina, adição de biotina, entre outros (LOOMANS et al., 1998)

Neste estudo observamos que os diferentes ensaios apresentaram valores de sensibilidade e especificidade que variaram. Observamos que quando empregado os peptídeos biotinizados

obtivemos uma boa sensibilidade (100-95%), porém foram os peptídeos que apresentaram os menores valores de especificidade (20-27%). Por outro lado, quando analisamos somente os grupos de pacientes com histoplasmoses e de indivíduos hígidos, foi possível observar que estes peptídeos apresentaram um bom poder discriminatório entre estes dois grupos.

É de conhecimento que as catalases apresentam sequência de aminoácidos altamente conservadas em diferentes espécies, e desta forma tem sido mostrado extensivamente reações cruzadas entre diferentes espécies. Também tem sido reportado estudos onde as catalases se apresentam como antígeno alvo para produção de autoanticorpos, o mapeamento de epitopos para anticorpos autoreativos mostrou alta homologia com uma variedade de espécies (MIURA et al., 2000). Estes fatores devem ser levados em consideração, uma vez que a proteína M foi caracterizada anteriormente como sendo uma catalase, podendo desta forma esta relacionada às reações cruzadas encontradas nos ensaios realizados em nosso estudo.

Outra hipótese para as reações inespecíficas poderia ser o fato de que peptídeos de tamanhos pequenos e médios quando em contato com a água podem assumir uma conformação desordenada o que pode afetar a ligação com as moléculas de anticorpos (BARBIERE et al., 1998).

Um estudo demonstrou que a ligação dos anticorpos aos peptídeos sintéticos pode ocorrer através da conformação α -hélice dos peptídeos sintéticos (GRAS-MASSE et al., 1988). Chamekh e colaboradores, (1992), demonstraram que a ligação de um anticorpo monoclonal bem como soro de pacientes com hidatidose no reconhecimento de epitopos peptídicos poderia ser dependente da conformação α -hélice do antígeno.

Sendo assim vários são os fatores que podem interferir na aplicação de peptídeos sintéticos no diagnóstico de alguns quadros patológicos, o que por vezes justifica o fato da análise *in silico* não ser confirmada por estudos *in vitro*. No presente estudo observamos que a sequência peptídica analisada não apresentou boa reatividade nos ensaios imunoenzimáticos realizados. Novas análises devem ser realizadas para obtenção de um melhor mapeamento de epitopos na proteína M, análises por *spot synthesis* e/ou coimunoprecipitação combinada a espectrometria de massa devem ser realizadas frente a pool de soros de pacientes com histoplasmoses comprovadas. Uma vez identificado os possíveis candidatos a epitopos seria indicado a realização de análises *in silico* para avaliação de parâmetros como acessibilidade e

homologia da sequência. Sendo encontrada mais de uma sequência peptídica como possível epítipo antigênico poderemos avaliar também a possibilidade do emprego de um polipeptídeo nas reações imunoenzimáticas.

Estudos realizados com o emprego da tecnologia *pepscan* demonstraram que os aminoácidos presentes na sequência peptídica apresentam um papel individual na participação da interação epítipo-paratopo, o que representa uma outra alternativa para se obter avanços na aplicação de peptídeos sintéticos no diagnóstico de algumas patologias (LOOMANS et al., 1997), uma vez que já foi demonstrado que um único resíduo pode definir a antigenicidade de um epítipo no reconhecimento e ligação antígeno-anticorpo (De-SIMONE et al., 2013). Frank, 2002 também demonstrou que resíduos de leucina são importantes para formação do complexo antígeno-anticorpo em epítopos do citomegalovírus. Mais uma vez reforçamos que vários aspectos devem ser analisados para a seleção e emprego de peptídeos em ensaios imunoenzimáticos, porém devemos salientar que estas metodologias apresentam um custo relativamente alto.

Como em certos quadros clínicos da histoplasmose, como na forma disseminada desta infecção os testes que visam detectar anticorpos apresentam limitações, iniciamos uma padronização de um ensaio imunoenzimático visando detectar antígeno circulante em amostras clínicas, onde os resultados inicialmente encontrados foram promissores, porém devemos ampliar nosso estudo empregando amostras de soro homólogos para avaliar a sensibilidade e amostras de soro heterólogos para análise da especificidade, bem como avaliar seu rendimento nas diferentes formas clínicas da histoplasmose.

7 CONCLUSÕES

- A sequência detectada por este estudo corrobora dados encontrados por nosso grupo, onde a região entre o aminoácido 212 e 442 foi apontada como a região mais antigênica da molécula M recombinante, uma vez que a sequência encontrada no presente estudo encontra-se localizada nesta porção da molécula.
- O emprego do peptídeo sintético nos ensaios imunoenzimáticos não apresentou resultados concordantes com a análise *in silico* no que refere-se a homologia da sequência.
- Dentre os ensaios realizados neste trabalho o que apresentou poder discriminatório foi o ensaio com o peptídeo 1-a e 1-b marcado com biotina, onde pode ser observado diferenças significativas nos valores das DOs encontradas entre o grupo de pacientes com histoplasmose e o grupo de indivíduos normais.
- O ensaio de captura de antígeno se mostrou promissor para detecção de antígeno em amostra de soro de pacientes com histoplasmose, necessitando porém de maiores estudos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajello L, Zeidberg LD. Isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Allescheria Boydii* from soil. Science. 1951; 8(113):662-663.

Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML, Frases S, Casadevall A, Zancope-Oliveira RM, et al. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. Cell Microbiol. 2008;10:1695-1710.

Alvarenga LM, Diniz CR, Granier C, Chavez-Olortegui C. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. Toxicon. 2002; 40:89-95.

Aravalli RN, Hu SU, Woods JP, Lokensgard JR. *Histoplasma capsulatum* yeast phase-specific protein Yps3p induces Toll-like receptor 2 signaling. J Neuroinflammation. 2008; 5: 30.

Barbieri M, Fernandez V, Gonzalez G, Luaces VM, Nieto A. Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. Parasite Immunology. 1998;20: 51-61.

Batanghari JW, Deepe GS Jr, Di Cera E, Goldman WE. *Histoplasma* acquisition of calcium and expression of CBP1 during intracellular parasitism. Mol Microbiol. 1998;27:531-539.

Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertson VJ, Knobloch J, et al. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. J Clin Microbiol. 2002; 40:1644-1647.

Bohse ML, Woods PJ. RNA Interference-Mediated Silencing of the *YPS3* Gene of *Histoplasma capsulatum* reveals virulence defects. Infect Immun. 2007 ; 75: 2811–2817.

Borges AS, Ferreira MS, Silvestre MTA, Nishioka SA, Rocha A. Histoplasmoses em pacientes imunodeprimidos: estudo 18 casos observados em Uberlândia – MG. Rev Soc Bras Med Trop. 1997; 30: 119-124.

Boyer MJ, Scalarone GM. The use of Histolyn CYL in an enzyme immunoassay to detect *Histoplasma capsulatum* antibodies. Sabouraudia. 1983; 21: 303-315.

Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. J Clin Microbiol. 2003;41:1753-1755.

Bradley G, Pine L, Reeves MW and Moss CW. Purification, composition, and serological characterization of histoplasmin H and M antigens. Infect and Immun. 1974; 9:870-880.

Briand JP, Muller S, Van Regenmortel MHV. J Immunol Methods. 1985;78:59-69.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72: 248-254.

Brummer E, Stevens DA. Activation of murine polymorphonuclear neutrophils for fungicidal activity with supernatants from antigen-stimulated immune spleen cell cultures. Infect Immun. 1984; 45:447-452.

Brummer E, Stevens DA. Antifungal mechanisms of activated murine bronchoalveolar or peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. Clin. Exp. Immunol. 1995; 102: 65-70.

Buitrago MJ, Berenguer J, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006; 25:665-668.

Buitrago MJ, Bernal-Martínez L, Castelli MV, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. *Travel Med.* 2011; 18:26-33.

Buitrago MJ, Canteros CE, De Leon GF, Gonzalez A, Marques-Evangelista de Oliveira M. et al. Comparison of PCR protocols for detection *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. *Rev Iber de micologia.* 2013. *In press.*

Bullock WE, Wright SD. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95, in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages. *J Exp Med.* 1987; 165:195-210.

Caldini CP, Xander P, Kioshima ES, Bachi ALL, Camargo ZP, Mariano M et al. Synthetic peptides mimic gp75 from *Paracoccidioides brasiliensis* in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2012; 174: 1–10.

Cano MV, Hajjeh RA. The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Semin Respir Infect.* 2001; 16:109-118.

Cano A, Viveros M, Acero G, Govezensky T, Munguia ME, Gonzalez E et al. Antigenic properties of phage displayed peptides comprising disulfide-bonded loop of the immunodominant region HIV-1 –gp 41. *Immunol Let.* 2004 ; 95: 207-212.

Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans* . *Curr Opin Microbiol.* 2000 ; 3:354-358.

Centers for Disease Control and Prevention. Revision of the CDC surveillance case definition for the acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1987;36(Suppl 1):1-15.

Chamekh M, Grass-Masse H, Bossus M, et al. Diagnostic value of a synthetic peptide derived from *Echinococcus granulosus* recombinant protein. J of Clin Invest. 1992; 89: 458-464.

Chandler F W, Kaplan W, Ajello L. Color Atlas and Text of the Histopathology of Mycotic Disease, Year Book Medical Publishers.Chicago. 1980: 63-66.

Chavez-Olortegui C, Molina F, Granier C. Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with alpha- and beta-toxins from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion. Mol Immunol. 2002; 38: 867-876.

Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. Cell. Mol. Life Sci. 2004; 61:192-208.

Chemaly RF, Tomford JW, Hall GS, Sholtis M, D. Chua J, Procop GW. Rapid Diagnosis of *Histoplasma capsulatum* Endocarditis using the AccuProbe on an excised valve. J Clin Microbiol. 2001; 39: 2640–2641.

Deepe GS, *Histoplasma capsulatum*. In: Mandell's, Douglas and Buschett's. Principles and practice of infections disease. 5th . ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2000; 2718 -2732.

DeMonbreun WA. Cultivation and cultural characteristics of Darling's *Histoplasma capsulatum*. Am. J. Trop. Med. 1934; 14: 93-125.

De-Simone SG, Gomes LP, Gemal A, Quirino FS, Provance DW. Journal of Biotechnology letters. 2013; (4): 84-90.

Eissenberg LG, Goldman W E. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 1991; 4: 411-421.

Egan L, Connolly PA, Fuller D, Davis TE, Witt J 3rd, Knox KS et al. Detection of *Histoplasma capsulatum* antigenuria by ultrafiltration of samples with false-negative. Clin. Vaccine Immunol. 2008; 46(1): 93-95.

Farina C, Rizzi M, Ricci L, Gabbi E, Caligaris S et al., Imported and autochthonous histoplasmosis in Italy: new cases and old problems. Rev Iberoam Micol. 2005; 22:169-171.

Fernandez Andreu CC, Illnait Zaragoza MT, Martinez Machig, Perurena Lancha MR, Monroy Vaca E. Rev. Cubana Med. Tropical. 2011; 63(3):189-205.

Ferreira MS, Borges AS. Histoplasmosis. Rev Soc Bras de Med Trop. 2009; 42(2):192-198.

Flor A, Estivill D, Pérez R.; Ordeig J, Ramos F, Behy JS et al. Histoplasmosis pulmonar aguda em un viajero español a Nicaragua: ejemplo de enfermedad importada. Rev. Iberoam. Micol. 2003; 20: 24-28.

Frank R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. 1992;Tetrahedron 48, p. 9217.

Frank R, Overwin H. SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. 1996; In: Methods Mol. Biol., vol. 66, Totowa, NJ:Humana Press, 149-169.

Frank R. J. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. Immunol. Meth. 2002; 267:13-26.

Furcolow ML, Salvin, SB. The precipitin test in human histoplasmosis. Public Health Monogs. 1956; 39: 129-131.

Furcolow ML. Histoplasmosis. GP. 1958; 18: 105-114.

Gass M, Kobayashi GS. Histoplasmosis. An illustrative case with unusual vaginal and joint involvement. *Arch Dermatol.* 1969; 100(6):724-727.

Gaur PK, Lichtwardt RW. Comparative study of a new *Chrysosporium* species with *Histoplasma capsulatum*. *Med. Mycol.* 1980; 18:105-114.

Geeg CV, Etzler ME. Directional Coupling of Synthetic Peptides to Poly- L-. Lysine, and Applications to the ELISA. *Anal. Biochem.* 1993; 210: 309-313.

Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, Tribbick G, Schoofs PG. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J. Immunol. Methods.* 1987;102: 259-274.

Gomara MJ, Haro I. Synthetic Peptides for the Immunodiagnosis of Human Diseases. *Current Medicinal Chemistry.* 2007; 14: 531-546.

Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz BL, Robledo MA, Restrepo A, Hay RJ. Development of novel antigen detection test for histoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:2618-2622.

Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Diez S, Rojas M, Tobon A, et al. Detection of the 70-kilodalton *Histoplasma capsulatum* antigen in serum of histoplasmosis patients: correlation between antigenemia and therapy during follow-up. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:675-680.

Gomez BL, Nosanchuk JD, Diez S, Youngchim S, Aisen P, Cano LE, et al. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* *in vitro* and during infection. *Infect Immun.* 2001; 69:5760-5767.

Gomez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. *Cur Opin Dis.* 2003;16:91-96.

Goldman L, Bennet JC. Tratado de Medicina Interna. v. II, 21ªEdição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 2001.

Goodwin Jr RA, Dez Prez RW, Histoplasmosis, state of the art. The Am Rev of Respir Dis. 1978; 117:929-956.

Grass-Masse H, Jolivet M, Drobecq H. Influence of helical organization on immunogenicity and antigenicity of synthetic peptides. Mol Immun. 1988; 25: 673-678.

Green HJ, Pine L. Preparation of H and M antigen of *Histoplasma capsulatum* free heterologous antigens. Current microbiology. 1985; 12: 209-216.

Guedes HLM, Guimarães AJ, Muniz MM, Pizzini CV, Hamilton JA, Peralta JM et al. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of M antigen. J. Clin. Microbiol. 2003; 41:535-539.

Gueho E, Leclerc MC, Hoog GS and Dupont B. Molecular taxonomy and epidemiology of *Blastomyces* and *Histoplasma* species. Mycoses. 1997; 40: 69-81.

Guimarães AJ, Pizzini CV, Guedes HLM, Albuquerque PC, Peralta JM, Hamilton AJ, Zancopé-Oliveira R M. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. 2004; J Med Microbiol. 53(6):509-514.

Guimarães AJ. Proteína M recombinante do *Histoplasma capsulatum*: Mapeamento de epítomos e aplicações no diagnóstico da histoplasmoze. Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Biologia Celular e Molecular . Instituto Oswaldo Cruz. 2006-a.

Guimarães AJ , Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Diagnosis of histoplasmosis. J. Microbiol. 2006-b; 37:1-13.

Guimarães AJ, Hamilton AJ, Guedes MHL, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Biological function and molecular mapping of M antigen in yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. Plos one. 2008; 3(10):3449.

Guimarães AJ, Frases S, Gomez FJ, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. 2009; Infect. Immun. 77:1357–1367.

Guimarães AJ, Pizzini CV, De Abreu Almeida M, Peralta JM, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using purified, deglycosylated histoplasmin for different clinical manifestations of Histoplasmosis. Microbiol Research. 2010; 17: 2(1).

Hage CA, Ribes JA, Wengenack NL, Baddour LM, Assi M, McKinsey DS et al. a multicenter evaluation of tests for diagnosis of histoplasmosis. Clin Infect Dis. 2011; 55(5):448-454.

Hamilton JM, Bartholomew MA, Fenelon LE, Figueroa J, Hay RJ. A murine monoclonal antibody exhibiting high species specificity for *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. J. Gen. Microbiol. 1990; 136(2): 331-335.

Hay RJ. Deep fungal infection. In: Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 5th ed. London: Mc Graw-Hill; 1999: 2977- 2979.

Heiner D C. Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. Pediatrics. 1958; 22(4part1):616-27.

Hilty J, George Smulian A, Newman SL. *Histoplasma capsulatum* utilizes siderophores for intracellular iron acquisition in macrophages. Med Mycol. 2011;49:633-42.

- Hogan LH, Klein BS. Altered expression of surface α 1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infect Immun*. 1994; 62:3543-3546.
- Hopfer RL, Walden P, Setterquist S, Highsmith WE. Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *J Med Vet Mycol*. 1993; 31:65-75.
- Howard BA. Studies on the catalase of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immunit*. 1983; 39:1161-1166.
- Hwang LH, Mayfield JA, Rine J, Sil A. Histoplasma requires SID1, a member of an iron-regulated siderophore gene cluster, for host colonization. *PLoS Pathog*. 2008; 4(4):e1000044.
- Ignatov A, Keath EJ. Molecular cell biology and molecular genetics of *Histoplasma capsulatum*. *Int J Med Microbiol*. 2002; 292:349-361.
- Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. 2003; Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol Immunol* 47: 271-277.
- Jaimes A, Mudvi S, Alvarado Z, Rodríguez G. Perforation of the nasal septum as the first sign of histoplasmosis associated with aids and review of published literature. *Mycopathologia*. 2013; 176:145-150.
- Johnson CH, Klotz MG, York JL, Kruft V, McEwen JE. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. *Microbiology*. 2002; 148:1129-1142.
- Johson PC, Sarosi GA, Septimus E, Satterwhite. Progressive disseminated histoplasmosis in patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Semin Resp Infect* 1986; 1:1-9.
- Youngchim S, Roderick JH, Hamilton AJ. Melanization of *Penicillium marneffeii* *in vitro* and *in vivo*. *Microbiology*. 2005;151:291-299.

Karimi K, Wheat JL, Connolly P, Cloud G, Hajjeh R, Wheat E, et al. Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. *J. Infect. Dis.* 2002; 186: 1655-1660.

Kasuga T., Taylor J.W., White T.J. Phylogenetic relationship of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:653-663.

Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castaneda E, et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol.* 2003; 12:3383-3401.

Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:115-132.

Kauffman CA. Histoplasmosis. *Clin Chest Med.* 2009; 30:217-225.

Kaufman L. Laboratory methods for diagnosis and confirmation of systemic mycoses. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 14:23-29.

Keath EJ, Kobayashi GS, Medoff G. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. *J of Clin Microbiol.* 1992; 30: 2104-2107.

Kersulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J Bacteriol.* 1992; 174:7075-7079.

Klimpel KR, Goldman WE. Cell walls from avirulent variants of *Histoplasma capsulatum* lack α -(1,3)-glucan. *Infect Immun.* 1988; 56: 2997-3000.

Koepsell SA, Hinrichs SH, Iwen PC. Applying a real-time PCR assay for *Histoplasma capsulatum* to clinically relevant formalin-fixed paraffin-embedded human tissue. J Clin Microbiol. 2012; 50:3395-3397.

Kwon-Chung KJ, Bennet JE. Histoplasmosis Medical Micology. Philaelpia: Lea & Febigerp. 1992; 464-513.

Lacaz CS et al. HP clássica. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de micologia médica Lacaz. São Paulo: Sarvier, 2002; 594-614.

Laune D, Molina F, Ferrieres G, Villard S, Bes C, Rieunier F, Chardes T, Granier C. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. J. Immunol. Methods. 2002; 267: 53-70.

Levitz SM, Diamond RD. Mechanisms of resistance of *Aspergillus fumigatus* conidia to killing by neutrophils in vitro. J. Infect. Dis.1985; 152:33-42.

Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, Morrison CJ. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. J Clin Microbiol. 2001;39:3505-3511.

Loomans EE, Petterson-Van Ettekoven A, Bloemers HP, Schielen WJ. Direct coating of poly(lys) or acetyl-thio-acetyl peptides to polystyrene: the effects in an enzyme-linked immunosorbent assay. Anal. Biochem. 1997; 15:117-129.

Loomans EE, Nijholt LJ, Cremers AJ, Paulij WP, Schielen WJ. Epitope mapping and serodiagnosis using Ata- and (Lys)⁷ peptides. Biochim Biophys Acta. 1998; 1379:273-281.

Long KH, Gomez FJ, Morris RE, Newman SL. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. J Immunol. 2003; 170:487-494.

López CE. Dimorphism and pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. Rev. Argent. Microbiol. 2006;38:235-242.

Machado de Ávila RA, Alvarenga LM, Tavares CA, Molina F, Granier C, Chavez-Olortegui. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. Toxicon. 2004; 44: 233-241.

Maresca B, Kobayashi G S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. Microbiol. Rev. 1989; 53: 186-209.

Martagon-Villamil J, Shresth N, Sholtis M, Isada CM, Hall GS, Bryne T et al. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 2003;41(3):1295-1298.

McEwen JG, Sugar AM, Brummer E, Restrepo A, Stevens DA. Toxic effect of products of oxidative metabolism of the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Med. Microbiol. 1984; 423-428.

Medoff G, Maresca B, Lambowitz AM, Kobayashi G, Painter A, Sacco M, et al. Correlation between pathogenicity and temperature sensitivity in different strains of *Histoplasma capsulatum*. J Clin Invest. 1986-a; 78(6):1638-1647.

Medoff G, Sacco M, Maresca B, Schlessinger D, Painter A, Kobayashi GS, et al. Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. Science. 1986-b; 31:476-479.

Meloi-Bruneri LH, Campa A, Abdalla DSP, Calich VLG, Lenzi HL, Burger E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *Paracoccidioides brasiliensis* after air pouch of susceptible and resistant mice. J. Leukoc. Biol. 1996; 59: 526-533.

Miura H, Tobe T, Miura K, Kobayashi K, Higashi T. Identification of epitopes for cross-reaction, auto-reaction and autoantibodies to catalase. *J of autoimm.* 2000;15:433-440.

Morrison CJ, Isenberg RA, Stevens DA. Enhanced oxidative mechanisms in immunologically activated versus elicited polymorphonuclear neutrophils: correlations with fungicidal activity. *J. Med. Microbiol.* 1988; 25: 115-121.

Morris-Jones R, Youngchim S, Gomez BL, Aisen P, Hay RJ, Nosanchuk JD, et al. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun.* 2003; 71:4026-4033.

Moura H, Terilli RR, Woolfitt AR, Gallegos-Candela M, McWilliams LG, Solano MI, et al. Studies on botulinum neurotoxins type/C1 and mosaic/DC using endopep-MS and proteomics. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011; 61: 288-300.

Muniz MM, Pizzini CV, Peralta JM, Reiss E, Zancopé-Oliveira RM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:4487-4494.

Muniz MM, Morais e Silva Tavares P, Meyer W, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Comparison of different DNA-Based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*. *Appl and envir microbiol.* 2010; 76:4438-4447.

Munõz C, Gómez BL, Tobón A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, Muskus C, Cano LE and González A. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, south America. *Clin and vac immun.* 2010;62-67.

Negróni, R. Inmologia de lãs micosis. In: Margini, R. A. Inmunologia e immunoquimica. Fundamento. La Habana. Ed. Revolucionária. 1982; p.340-362.

Negróni, R. Histoplasmose. In: FOCACCIA, R. (Ed.). Tratado de Infectologia Veronesi. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 1415-1426.

Nemecek JC, Wuthrich M, Klein BS. Global control of dimorphism and virulence in fungi. Science. 2006; 312:583-588.

Noya O, Patarroyo ME, Guzmán F, Noya A. Current protein and peptide Science. 2003; 4: 299-308.

Nosanchuk JD, Gomez BL, Youngchim S, Diez S, Aisen P, Zancope-Oliveira RM, et al. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. Infect Immun. 2002; 70:5124-5131.

Nosanchuk JD, Steenbergen JN, Shi L, Deepe GSJr, Casadevall A. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. J. Clin. Invest. 2003; 112: 1164-1175.

Nosanchuk JD, van Duin D, Mandal P, Aisen P, Legendre AM, Casadevall A. *Blastomyces dermatitidis* produces melanin in vitro and during infection. FEMS Microbiol Lett. 2004; 239:187-193.

Nosanchuk JD, Yu JJ; Hung CY, Casedavall A; Cole GT. *Coccidioides posadasii* produces - melanin *in vitro* and during infection. Fung Genetic and Biol. 2007;44:517-520.

Nosanchuk JD, Nimrichter L, Casadevall A, Rodrigues ML. A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. Commun Integr Biol. 2008;1:37-39.

Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. J Infect Chemother, 2013 “In press”.

Ouchterlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. II. Prog. Allergy. 1962; 6:30-154.

Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for research and Treatment of Cancer/Invasive. Clin. Infect. Dis. 2008; 46:1813-1821.

Petres EJG, Kauffman RH and Blok P. Fever and high lactate dehydrogenase in HIV-positive patients from the Antilles and Surinam: histoplasmosis? The J mof med. 2006; 64: 302-306.

Pine L. Morphological and physiological characteristics of *Histoplasma capsulatum*. In: Sweany HD. Histoplasmosis Springfield: Charles C. Thomas. 1960;40–75.

Pizzini CV. Avaliação da técnica de *Western blot* no sorodiagnóstico da histoplasmoze. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz-IOC. 1997.

Pizzini CV, Zancope-Oliveira R M., Reiss E, Hajjeh R, Kaufman L, Peralta J M. Evaluation of a western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1999. 6 (1) 20-23.

Raman C, Khardori N, Von Behren LA, Wheat LJ e Tewari RP. Evaluation of an ELISA for the detection of anti-*Histoplasma* ribosomal and antihistoplasmin antibodies in histoplasmosis. J Clin Lab Anal . 1990; 4: 199–207.

Ramos-e-Silva M, Lima OMC, Schechtman RC, Trope MB, Carneiro S. Systemic Mycoses in immunodepressed patients (AIDS). Clinics in Dermatology. 2012; 3: 616-627.

Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Mol Microbiol.* 2004;53:153–165.

Rappleye CA, Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma capsulatum* alpha- (1,3) glucan brocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007; 10: 1366-1370.

Reiss E, Knowles JB, Bragg SL, Kaufman B. Monoclonal antibodies against the M protein and carbohydrate antigens of histoplasmin characterised by the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. *Infect and Immun.* 1986; 53:540-546.

Reiss E, Obayashi T, Orle K, Yoshida M, Zancope-Oliveira R M. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections.; *Med. Mycol.* 2000; 38 Suppl 1, 147-159.

Ribeiro VS, Manhani MN, Cardoso R, Vieira CU, Goulart LR, Costa-Cruz JM. Selection of high affinity peptide ligands for detection of circulating antibodies in neurocysticercosi. *Immun lett.* 2010;129:94-99.

Rickerts V, Bialek R, Tintelnot K, Jacobi V, Just-Nübling G. Rapid PCR-based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21:821-823.

Da Rocha –Lima, H. Histoplasmosis and epizootische lymphangitis. *Arch. F. Schiffi.-u-Tropen. Hyg.* 1912; 16:79-85.

Rodrigues C C. Avaliação da infecção pelo *Histoplasma capsulatum* por meio de reações intradérmicas em moradores da zona urbana e rural do município de Pratânia (SP). 2004. Tese de doutorado. Botucatu: faculdade de medicina de Botucatu, Unesp.

Rodrigues JC, Avery RK, Larde M, Budev M, Gordon SM, Shrestha NK, Van Duin D, Oethinger M and Mawloiter SD. Histoplasmosis in solid organ transplant recipients: 10 years of experiences at a large transplant center in an endemic area. *Clin Infect Dis*. 2009;49:710-716.

Rosenberg JD, Scheirfeld NS. Cutaneous histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Cutis*. 2003; 72:439-445.

Rossini TF, Goulart LS. Histoplasmosse clássica : revisão-classic histoplasmosis: review. *Rev. bact.* 2006; vol. 38: 275-279.

San-Blas G, Moreno N. Biochemical studies on the mycelial cell wall of *Histoplasma duboisii*. *Acta Cient Venez*. 1977;28:333-337.

Sathapatayavongs B, Batteiger BE, Wheat J, Slama TG, Wass JL. Clinical and laboratory features of disseminated histoplasmosis during two large urban outbreaks. *Medicine (Baltimore)*. 1983; 62(5):263-270.

Schell MC, Samayoa B, Herrera A, Lindsley, MD, Benjamin L, Reed Y..Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay To Detect *Histoplasma capsulatum* Antigenuria in Immunocompromised Patients. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16: 852–858.

Schnur RA, Newman SL. The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils. Evidence for intracellular trapping of superoxide anion. 1990;144:4765-4772.

Sebghati TS, Engle JT, Goldman WE. Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. *Science*. 2000; 290: 1368-1372.

Sidrin JJ C, Rocha M F.G. *Micologia Médica a Luz de Autores Contemporâneos*. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 2004.

Swartzentruber S, LeMonte A, Witt J, Fuller D, Davis T, Hage C. Improved Detection of *Histoplasma* Antigenemia following Dissociation of Immune Complexes .Clin Vaccine Immunol. 2009; 16: 320–322.

Smith JA, Kauffman CA. Pulmonary fungal infections. Respirology. 2012; 17: 913-926

Sptizer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS and Medoff G. Use mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. Infection and immunity. 1989; 57: 1409-1412.

Sptizer ED, Keath EJ, Travis SJ, Painter AA, Kobayashi GS and Medoff G. Temperature-Sensitive Variants of *Histoplasma capsulatum* isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. The J of infect disea. 1990; 162:258-261.

Standard PG, Kaufman L. Specific immunological test for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*. J of clin microbiol. 1976; 3:191-199.

Stockman L, Clark KA, Hunt JM, Roberts GD. Evaluation of commercially acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of *Blastomyces dermatitides*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum*. J of clin microbiol. 1993; 31: 845-850.

Taborda CP, DA Silva MB, Nosanchuk JD & Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a mini review. Mycopathologia. 2008; 165: 331-339.

Tam JP, Zavala F. Multiple antigen peptide: a novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptides in solid-phase immunoassays. J. Immunol. Methods. 1989; 124: 53-61.

Taylor M, Ruiz-Palacios GM, Reyes-Montes MR, Rosdriguez-Arellanes G, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, et al. Identification of the infections source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005;45:435-441.

Torres M, Diaz H, Herrera T, Sada E. Evaluation of enzyme linked immunosorbent-assay and Western blot for diagnosis of histoplasmosis. *Rev Invest Clin.* 1993; 45: 155–160.

Unis G, Roesch EW, Severo LC. Histoplasmosse pulmonar aguda no Rio Grande do Sul. *J Bras de Pneum.* 2005; 31(1) :52-59.

Untereiner WA, Scott JA, Naveau FA, Single L, Bachewich J, Angus A. The *Ajellomycestaceae*, new family of vertebrate-associated *Onygenales*. *Mycologia.* 2004; 96: 812-821.

Valerie L. Ng. Serological diagnosis with recombinant peptides/proteins. *Clin chem.* 1991; 37(10): 1667-1668.

Vicentini-Moreira AP, Kohara VS, Passos NA, Feliciano RS, Barreto LC, Freitas RS et al. Microepidemia de histoplasmosse no municipio de Arapeí, São Paulo. *Boletim epidemiológico Paulista. Publicação Mensal sobre agravos à saúde pública.* 2008; 5: 8-11.

Vincent RD, Goewert R, Goldman WE, Kobayashi GS, Lambowitz AM, Medoff G. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms. *J Bacteriol.* 1986; 165:813-818.

Wheat LJ, French MLV, Kohler RB, et al., the diagnostic laboratory tests for histoplasmosis: analysis of experience in a large urban outbreak. *Ann Intern Med.* 1982; 97:680-685.

Wheat LJ, Wass J, Norton J, Kohler RB, French ML. Cavitary histoplasmosis occurring during two large urban outbreaks : analysis of clinical, epidemiologic, roentgenographic, and laboratory features. *Medicine (Baltimore)* 1984;63:201-209.

Wheat L J, Morris L V F, Kamel S & Tewari R P. Evaluation of cross-reactions in *Histoplasma capsulatum* serologic tests. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 23: 493-499.

Wheat LJ, Connolly-Stringfield PA, Baker RL et al. Disseminated histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome: clinical findings, diagnosis and treatment, and review of the literature. *Medicine(Baltimore)*. 1990; 69:361-374.

Wheat L. J., et al. Effect of successful treatment with amphotericin B on *Histoplasma capsulatum* variety capsulatum polysaccharide antigen levels in patients with AIDS and histoplasmosis. *Am. J. Med.*1992; 92:153–160.

Wheat LJ. Histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Curr Top Med Mycol.* 1996;7:7-18.

Wheat LJ, Garringer T, Brizendine E, Conolly P. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 43:29–37.

Wheat L J , Kauffman CA .Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2003; 17: 1–19.

Wheat L.J. Clinical and laboratory features of disseminated histoplasmosis during two large urban outbreaks. *Medicine (Baltimore) TRENDS in Microbiology.* 2003; 62: 263–270 .

Wheat LJ, Freifeld AG, Kleiman MB, Baddley JW, McKinsey DS, Loyd JE et al. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the infections diseases society of america. *Clin Infect Dis.* 2007; 45:807-825.

Woods J P. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. Fungal Genet. 2002; 35: 81-97.

Youngchim, S., Hay, R.J., and Hamilton, A.J. (2005) Melanization of *Penicillium marneffeii* in vitro and in vivo. Microbiology 151: 291–299

Zámocky M, Koeller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. Prog in Bioph and Mol Biol. 1999; (72): 19-66.

Zancopé-Oliveira RM, Bragg SL, Hurst SF, Peralta JM, Reis E. Evaluation of cation exchange chromatography for the isolation of M glycoprotein from histoplasmin. J. Med. Vet. Mycol. 1993; 31: 29-41.

Zancopé-Oliveira RM, Bragg SL, Reiss E, and Peralta JM. Immunochemical analysis of the H and M glycoproteins from *Histoplasma capsulatum* Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1994-a; 1:563–568.

Zancopé-Oliveira RM, Bragg SL, Reiss E, Wanke B, Peralta J M. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1994-b. 1: 390-393.

Zancopé-Oliveira RM, Reiss E e cols. Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun . 1999; 67: 1947-1953.

Zancopé-Oliveira RM, Tavares PS, Muniz MM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2005; 45:443-449.

Zancopé-Oliveira RM, Muniz MM, Wanke B. Histoplasmoses. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan; 2ª edição. 2013-.p.1238-49.

Zeidberg LD, Ajello L, Webster RH. Physical and chemical factors in relation to *Histoplasma capsulatum* in soil. *Science*. 1955; 122(3157):33-34.

Zomboni M, Romano S, & Toscano E. Histoplasmose cavitária - Relato de um caso. *Pulmão RJ*. 2004.13(1): 54-57.