



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROSÁLIA HERNANDES FERNANDES-VIVAN

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE
HISTOPLASMA CAPSULATUM VAR. *CAPSULATUM* COM
ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE**

Londrina
2008

ROSÁLIA HERNANDES FERNANDES-VIVAN

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE
HISTOPLASMA CAPSULATUM VAR. *CAPSULATUM* COM
ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Eiko N. Itano

Londrina
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F363c Fernandes-Vivan, Rosália Hernandes.

Caracterização parcial de antígeno solúvel de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* com atividade hemaglutinante / Rosália Hernandes Fernandes Vivan. – Londrina, 2008. xiii, 55f.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Histoplasma – Teses. 2. Hemaglutinação – Teses. 3. Imunoglobulinas – Teses. 4. Teste imunoenzimático – Teses. 5. Eritrócitos – Teses. 6. Patologia experimental – Teses. I. Itano, Eiko Nakagawa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092.9

ROSÁLIA HERNANDES FERNANDES-VIVAN

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE
HISTOPLASMA CAPSULATUM VAR. *CAPSULATUM* COM
ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 29 de fevereiro de 2008.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina e contou com apoio financeiro da Fundação Araucária e FAEP/UEL.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, filhas, as avós e avô, por sua imensa ajuda,
pois sem vocês seria impossível a realização
desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a Dra. Eiko Nakagawa Itano, por sua dedicação, seu profissionalismo, paciência e por toda a sua ajuda na realização deste trabalho.

Aos coordenadores do Programa de Pós – Graduação em Patologia experimental: Prof^a Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe e Prof. Dr. Mario Augusto Ono.

Aos professores Dr. Mario Augusto Ono, Dr. Emerson José Venâncio e Dr. Celso Vataru Nakamura pela participação na banca Examinadora de Qualificação e/ou de Defesa de Dissertação da Tese com as suas valiosas orientações e sugestões para este trabalho.

A todos os professores e colegas do mestrado.

A Mari Sumigawa Kaminami e Nilson de Jesus Carlos, por seus ensinamentos, companheirismo e apoio.

Agradeço aos meus colegas de laboratório: Alexandre Augusto Sasaki, Andréa Longoni Fredrich Isaacson, Audrey de Souza Marques, Berenice Tomoko Tatibana, Carlos Eduardo Alves de Souza, Fernanda Akemi Nakanishi, Juliana Gerez Rubira, Kátia Key Oshiro, Luciene Aire Nagashima, Nádia Hizuru Kamiji, Solange Paula Ramos, Thiago Yuiti Castillo Massuda, Welder Franzini Amaral Callera, por se dedicarem e ajudarem na elaboração deste trabalho.

Agradeço em especial aos meus colegas Paula César Leonello e Thiago Cezar Fujita por todo incentivo, companheirismo, força e dedicação.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Patológicas do Centro de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização e desenvolvimento deste trabalho.

FERNANDES-VIVAN, Rosália Hernandes. **Caracterização parcial de antígeno solúvel de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* com atividade hemaglutinante.** 2008. 55f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* é um fungo dimórfico causador da histoplasmose, doença sistêmica e grave em imunossuprimidos. Tem sido relatada a atividade hemaglutinante do fungo e de casos de histoplasmose disseminada associada a autohemofagocitose. O objetivo do presente trabalho foi analisar e caracterizar parcialmente o(s) componente(s) solúvel(eis) com atividade hemaglutinante. Inicialmente foram obtidos *cell free antigen* (CFA) de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (isolado IMT/HC 128) e anticorpos policlonais de camundongos a componentes ligantes às hemácias (anti-Ea-CFA). Para análise de atividade hemaglutinante foram utilizados eritrócitos de camundongo incubados com amostras de CFA (E-CFA), com CFA previamente aquecida a 56 °C durante 30 minutos (E-CFAa) ou tratada com PBS (E-PBS). Os anticorpos anti-Ea-CFA foram testados quanto a sua capacidade em inibir a hemaglutinação e para análise das frações de CFA por ELISA. As frações foram obtidas por cromatografia de CFA em coluna de gel filtração (*Sephadex* G-75/120 e G-200). Adicionalmente foi realizada a análise de hemofagocitose, incubando-se hemácias autólogas sensibilizadas ou não com CFA e células peritoneais de camundongos BALB/c aderentes ao vidro. Os resultados obtidos demonstraram aglutinação positiva com E-CFA e negativa com E-CFAa ou E-PBS. Os anticorpos policlonais obtidos apresentaram a capacidade de inibir a atividade hemaglutinante e de interagir com as frações cromatográficas de alta MM. O ensaio de hemofagocitose demonstrou positividade com E-CFA e negativa com E-PBS. Concluímos que o fungo *H. capsulatum* var. *capsulatum* libera componente solúvel, termolábil, com atividade hemaglutinante e este trabalho evidencia pela primeira vez a indução da autohemofagocitose por componentes solúveis de *H. capsulatum* var. *capsulatum* e análise indireta utilizando anticorpos sugerem que os componentes responsáveis pela interação com as hemácias apresentam alta MM.

Palavras- chaves: Histoplasmose disseminada. Síndrome de ativação hemofagocítica. Hemaglutinação. Anticorpos. ELISA. Eritrócitos.

FERNANDES-VIVAN, Rosália Hernandes. **Partial characterization of soluble antigen of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* with hemagglutinin activity**. 2008. 55p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* is a thermally dimorphic fungus that causes histoplasmosis, a quite common systemic disease which can have serious or fatal outcomes, especially among immunocompromised patients. Both fungal hemagglutination activity and cases of reactive hemophagocytic syndrome (RHS) have been reported in the disseminated form of disease. The objective of the present study was to detect and partially characterize soluble components of *H. capsulatum* var. *capsulatum* with hemagglutinin activity. Initially, cell-free antigen (CFA) was obtained from *H. capsulatum* var. *capsulatum* (isolate IMT/HC128) and mouse polyclonal antibodies were raised against red blood cells (RBC) binding CFA components (anti-RBC-CFA). To analyze hemagglutination, RBC were incubated with CFA (RBC-CFA), with heated CFA (56 °C, 30 min) (CFA-hCFA) and with PBS (CFA-PBS) as a control. The anti-RBC-CFA antibodies were assayed for hemagglutination inhibition by pre-incubation with CFA and used to analyze chromatographic fractions (*Sephadex* G - 75/120 and *Sephadex* G-200) by immunoenzymatic assay (ELISA). Additionally, hemophagocytosis was analyzed by incubating BALB/c mouse peritoneal phagocytic cells with autologous RBC, sensitized or not with CFA. Hemagglutinin activity was observed with RBC-CFA but not with RBC-hCFA or RBC-PBS. The anti-RBC-CFA antibodies inhibited hemagglutination and reacted with high molecular mass (MM) CFA fractions. Hemophagocytosis was observed with RBC-CFA but not with RBC-PBS. In conclusion, the (37 °C) yeast form of *H. capsulatum* var. *capsulatum* releases thermolabile soluble components with hemagglutinin activity and it has been demonstrated for the first time that soluble components of the same fungus induce autohemophagocytosis. Also, the indirect analysis with antibodies suggests that high MM components are responsible for the interaction with the red blood cells.

Keywords: Disseminated histoplasmosis. Reactive hemophagocytic syndrome. Hemagglutination. Antibodies. ELISA. Red blood cells.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Resultado de reação de aglutinação com hemácias de camundongos sensibilizadas com CFA de IMT/Hc 12851
- Figura 2** – Fracionamento de CFA de IMT/Hc 128 em coluna *Sephadex G-75/120* e reatividade das frações cromatográficas de CFA de IMT/Hc 128 com soro anti-Ea-CFA.....53
- Figura 3** – Fracionamento de CFA de IMT/Hc 128 em coluna *Sephadex G-200* e reatividade das frações cromatográficas de CFA de IMT/Hc 128 com soro anti-Ea-CFA.....54
- Figura 4** – Hemofagocitose de eritrócitos mediada por CFA de IMT/Hc 128.....55
-
- Tabela 1** – Resultado de análise da atividade hemaglutinante de CFA de IMT/Hc 128 e efeito de aquecimento de CFA de IMT/Hc 128 e de soro imune por reação de hemaglutinação.....52

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

λ = Comprimento de onda

μg = Micrograma

μl = Microlitro

μm = Micrômetro

Acs = Anticorpos

Ags = Antígenos

AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Anti-Ea-CFA = anticorpos policlonais a antígenos solúveis de *H. capsulatum* var. *capsulatum* ligados à hemácia autóloga

CCB = Centro de Ciências Biológicas

CFA = *Cell Free Antigen*

CFA IMT/Hc 128 = *Cell Free Antigen* de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* cepa 128

C3ib = Componente de ligação do sistema complemento

CIC = Complexos imunes circulantes

CR1 = receptor para complemento 1

DCs = Células dendríticas

DIC = *Disseminated intravascular coagulation*

E-CFA = eritrócitos de camundongo incubados com amostras de CFA

E-CFAa = eritrócitos de camundongo incubados com amostras de CFA previamente aquecidos a 56 °C por 30 minutos

ELISA = *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

E-PBS = eritrócitos de camundongo incubados com PBS

FC = Fixação do complemento

GM-CSF = Fator estimulador de colônia granulócitos - macrófagos

H. capsulatum = *Histoplasma capsulatum*

H. capsulatum* var. *capsulatum = *Histoplasma capsulatum* variedade *capsulatum*

Hc = *Histoplasma capsulatum*

HE = Hematoxilina eosina

HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana

h = hora

ID = Imunodifusão

IL = Interleucina
IMT = Instituto de Medicina Tropical
INF γ = Interferon gama
iNOS = *Inducible Nitric Oxide Synthase*
Kg = Quilograma
mg = Miligrama
min = minutos
ml = Mililitro
mM = Milimolar
MM = Massa molecular
ng = Nanograma
NOS = Óxido Nítrico Sintase
OPD = *Orto-Phenylenediamine*
PAT = Departamento de Ciências Patológicas
PCR = Reação em Cadeia da Polimerase
RIA = Radioimunoensaio
RHS = síndrome de reativação hemofagocítica
sp = Espécie
SRE = Sistema retículo-endotelial
TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa
UEL = Universidade Estadual de Londrina
Var = variedades
v/v = volume a volume

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1 HISTOPLASMA CAPSULATUM.....	13
1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA HISTOPLASMOSE	15
1.3 SÍNDROME DE REATIVAÇÃO HEMAFAGOCÍTICA (RHS).....	16
1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HISTOPLASMOSE	17
1.5 RESPOSTA IMUNE AO H. CAPSULATUM VAR. CAPSULATUM.....	19
2 OBJETIVO	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
4 ARTIGO – CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>HISTOPLASMA CAPSULATUM</i> VAR. <i>CAPSULATUM</i> COM ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	30
4.1 RESUMO	30
4.2 ABSTRACT	31
4.3 INTRODUÇÃO	32
4.4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.5 RESULTADOS.....	39
4.6 DISCUSSÃO	42
4.7 CONCLUSÃO	46
4.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 HISTOPLASMA CAPSULATUM

Histoplasma sp. foi descrito pela primeira vez em 1905, por Samuel Darling, patologista das forças armadas dos EUA, na realização de uma autópsia em um homem negro de 27 anos, imigrante do Canal do Panamá (SCHWARZ *et al.*, 1981), supostamente acometido por uma doença semelhante à leishmaniose visceral (DUBOS, 1948).

Taxonomicamente, *H. capsulatum* é um Eucarioto, do reino Fungi, da divisão (filó) Ascomycota, subdivisão (subfiló) Ascomycotina, classe Ascomycetes, ordem Onygenales, família Onygenaceae, gênero *Histoplasma* (*Ajellomyces*), espécie *Histoplasma capsulatum*; sendo que esta apresenta três variedades: *H. capsulatum var. capsulatum*, *H. capsulatum var. duboisii* e *H. capsulatum var. farciminosum* (PERROTTA *et al.*, 2001; KERSULYTE *et al.*, 1992; RIPPON, 1990).

O fungo *H. capsulatum var. duboisii* é encontrado apenas na África. Acomete pele e osso e raramente os pulmões (KHALIL *et al.*, 1999). A célula leveduriforme presente no tecido infectado é grande (8 – 15 µm de diâmetro), presente no interior do tecido inflamado (YAMAMOTO *et al.*, 2002). *H. capsulatum var. farciminosum* foi descrito como patógeno do sistema linfático de animais domésticos como cavalos e mulas em algumas áreas da Europa, África e Ásia (YAMAMOTO *et al.*, 2002).

H. capsulatum var. capsulatum é um fungo dimórfico causador da histoplasmose, uma doença sistêmica, e endêmica na região leste dos Estados Unidos e em quase toda América Latina (GARCIA *et al.*, 1990), de distribuição cosmopolita (LEIMANN *et al.*, 2005). A infecção ocorre via inalação de microconídeos do *H. capsulatum var. capsulatum* ou de pequenos fragmentos miceliais, que acumulam nos bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares (GILDEA *et al.*, 2001), podendo causar desde uma infecção pulmonar aguda benigna até uma infecção disseminada e fatal. Na forma disseminada habita preferencialmente o citoplasma das células do sistema retículo-endotelial (SRE) (COZAD –

SCALARONE, 1968; SEBGHATI *et al*, 2000).

Epidemiologicamente, *H. capsulatum* var. *capsulatum* é um microrganismo cosmopolita, prevalecendo em regiões de clima tropical e temperado, sendo encontrado principalmente no hemisfério norte (DRUTZ, 1988; DRUTZ, 1989; ZHAO *et al.*, 2001; TAYLOR *et al.*, 2005; GARCIA-VASQUEZ *et al.*, 2005; CANTELLA *et al.*, 2005; KAMEI, 2005).

No Brasil, a histoplasmose foi observada nos estados da Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e ainda no Distrito Federal (NEVES, 1983; PAULA; AIDÉ, 1985; SEVERO *et al.*, 2001; CHANG *et al.*, 2007). Normalmente os casos estão relacionados à visitação a cavernas.

O fungo é encontrado nos solos enriquecidos com excrementos de aves e morcegos, ricos em matéria orgânica e de baixo pH (REYES – MONTES *et al.*, 2000). Os pássaros não hospedam o fungo, pois a sua alta temperatura corporal não permite seu crescimento. Os morcegos podem hospedar *Histoplasma* em seu trato digestivo e disseminá-lo nas cavernas, porões e buracos em árvores, que consistem em seu *habitat* (WHEAT *et al.*, 1994).

Com maior freqüência a infecção é subclínica ou assintomática. Em pacientes com comprometimento da imunidade celular, pode ocorrer a histoplasmose sintomática. Pacientes de risco para histoplasmose disseminada incluem crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (WHEAT *et al.*, 2000; WHEAT; KAUFFMAN, 2003). A infecção pode acometer vários órgãos incluindo medula óssea, fígado, baço e glândulas supra-renais. Geralmente a disseminação progressiva da histoplasmose leva um curto período após a exposição, dependendo do estado da resposta imune do hospedeiro (ANDREU, 2001).

Em temperatura ambiente, de 25 a 30 °C, *H. capsulatum* var. *capsulatum* apresenta forma micelial (infectante), de aspecto branco algodinoso, de desenvolvimento lento, apresentando abundante hifas aéreas. Na fase micelial não há produção de pigmentos difusíveis no meio de cultura, apresentando colônias de coloração parda, com escasso micélio, hifas tenuamente pigmentadas e com grande número de macroconídeos tuberculados (ANDREU, 2001). A fase tecidual ou parasitária, ou quando incubados a 35 – 37 °C em meios de cultura *H. capsulatum* var. *capsulatum* apresenta forma de levedura (ANDREU, 2001; LEIMANN *et al.*, 2005). Células leveduriformes apresentam-se ovais (1-3µm de diâmetro) e são

microrganismos facultativos de células do SRE. A forma de levedura tem paredes finas e se reproduzem por gemulação polar, apresentando colônias cremosas e de coloração bege (MARESCA; KOBAYASHI, 1989; ANDREU, 2001). Coram-se por hematoxilina eosina (HE), mostrando área central basófila, e por métodos imunohistoquímicos como PAS (PÉREZ; CARRASCO, 2000).

A parede fúngica é composta de α e β -glucanas, e por fibras de quitina, que representam importante constituinte durante o brotamento. Na fase leveduriforme o fungo apresenta menor quantidade de β -glucanas que na fase micelial. A α -glucana é um polissacarídeo relacionado com a virulência do patógeno (MARESCA; KOBAYASHI, 1989) e a maior proporção de α -glucanas, protege as β -glucanas do sistema de defesa do hospedeiro (MEDEIROS *et al.*, 1999).

1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA HISTOPLASMOSE

A histoplasmose tem início com a inalação dos microconídeos, apresentando na maioria das vezes forma assintomática (90 a 95%) e autolimitada. Aproximadamente 5 a 10% dos infectados apresentam sintomatologia variável dependente do número de conídeos inalados e do estado imunitário do hospedeiro. A deficiência da imunidade celular predispõe à doença disseminada e potencialmente fatal, se não tratada (EISSENBERG; GOLDMAN, 1991; ANDREU, 2001; UNIS *et al.*, 2004a; UNIS *et al.*, 2004b).

O tempo de exposição também determina a gravidade da doença: aproximadamente 20 minutos de exposição proporcionam sintomas leves, enquanto que uma exposição de 50 a 60 horas acarreta doença grave (LARSH, 1983).

As principais formas clínicas são: pulmonar aguda; pulmonar crônica (cavitária); disseminada fatal (aguda, subaguda e subtipos crônicos); oportunista; e mediada imunologicamente como a ocorrência de histoplasmoma e síndrome ocular (NEGRONI *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2007).

A infecção pulmonar aguda resulta da infecção primária, manifestando febre, cefaléia, tosse produtiva, dor torácica pleurítica ou subesternal, mal-estar e mialgia, podendo ser confundida com um quadro gripal. A radiografia de

tórax pode mostrar a presença de infiltrado local com linfadenopatia que posteriormente se calcifica. Os sintomas desaparecem habitualmente sem tratamento em duas semanas e em poucas vezes podem durar mais de seis semanas. Esta forma raramente se revela fatal (ANDREU 2001; SIDRIN, 2004).

A histoplasmose pulmonar crônica ocorre predominantemente em indivíduos de meia idade, do sexo masculino, fumantes ou que apresentem problemas pulmonares pré-existentes (EISSENBERG; GOLDMAN, 1991). A sintomatologia assemelha-se à tuberculose. A colonização dos espaços aéreos determina a produção local de material líquido rico em elementos fúngicos que se disseminam, causando focos de pneumonite segmentar, ocasionando fibrose pulmonar progressiva (UNIS *et al.*, 2004a).

A histoplasmose disseminada representa a forma menos comum da doença, desenvolvendo-se em indivíduos imunocomprometidos, como receptores de órgãos tratados com drogas imunossupressoras, pacientes que fazem o uso de terapêutica antineoplásica, em indivíduos infectados pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida); e em lactentes com sistema imune imaturo (SEVERO *et al.*, 1998; D'AVILA; CHAPADEIRO, 1998). As lesões presentes nesta forma podem ser extras pulmonares, ocorrendo na cavidade oral ou intestinal. Na ausência de imunidade celular efetiva a infecção pelo *H. capsulatum* var. *capsulatum* tem progressão fatal (VALLE *et al.*, 2006). Os sintomas incluem febre, perda de peso, hepato e esplenomegalia e aumento dos nódulos linfáticos (CHANG *et al.*, 2007).

A anfotericina B é utilizada para o tratamento da histoplasmose em pacientes imunocomprometidos apresentando a forma disseminada. Podem ser utilizadas drogas como itraconazol, que apresenta resultados favoráveis. Ambas terapêuticas necessitam de tratamento crônico para conter a expansão de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (WHEAT *et al.*, 1997).

1.3 SÍNDROME DE REATIVAÇÃO HEMOFAGOCÍTICA (RHS)

A síndrome de reativação hemofagocítica (RHS) é uma desordem rara caracterizada por ativação de monócitos-macrófagos, levando à hemofagocitose excessiva. Ocorre em pacientes imunossuprimidos, sendo supostamente causada

por hiperativação de linfócitos T, resultando em excessiva secreção de citocinas e ativação de células monocíticas - macrófágicas (FUJIWARA *et al.*, 1993; OHGA *et al.*, 1993; TSUDA 1997). Pode levar a manifestações como febre, pancitopenia, coagulação intravascular disseminada (DIC), danos alveolares difuso, hepatoesplenomegalia, elevação dos níveis séricos de ferritina, triglicérides e de enzimas hepáticas e também ocasionar desordens neurológicas (FUJIWARA *et al.*, 1993; OHGA *et al.*, 1993; JANKA *et al.*, 1998; JANKA 2007). RHS pode ser iniciada por condições neoplásicas, infecções bacterianas, virais e fúngicas, desordens linfoproliferativas, doenças autoimunes e agentes terapêuticos (WANG *et al.*, 2006).

RHS tem sido relatada em associação com histoplasmose disseminada em pacientes com AIDS, e em menor frequência em pacientes imunossuprimidos (KUDORI *et al.*, 1995; CHEMLAL *et al.*, 1997).

O tratamento consiste na supressão da ativação excessiva dos linfócitos/ macrófagos com terapia específica contra os processos infecciosos que levam a manifestação da RHS (JANKA; STADT, 2005).

1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HISTOPLASMOSE

O diagnóstico da histoplasmose depende de um alto grau de suspeição clínica e devido ao diminuto tamanho da apresentação tecidual do fungo e à semelhança com outros elementos fúngicos leveduriformes, e com outras estruturas não fúngicas (UNIS *et al.*, 2004a).

Segundo Gómez *et al.* (1999) o diagnóstico definitivo da histoplasmose consiste no isolamento e identificação do *H. capsulatum* var. *capsulatum* por cultura ou visualização direta do fungo. O sucesso do isolamento e correta identificação do fungo, depende de diversos fatores, como coleta adequada e correto processamento do material no laboratório; podendo levar a resultados falso-negativos quando não verificados. O uso de meios seletivos, como ágar Mycosel, para o isolamento fúngico impede o desenvolvimento de bactérias e fungos contaminantes, permitindo o isolamento do *H. capsulatum* var. *capsulatum*, de crescimento mais lento (UNIS *et al.*, 2004a). Porém, os resultados só podem ser obtidos após longo período (3 – 4 semanas) (DURKIN *et al.*, 1997). As provas

sorológicas apresentam um grande valor no diagnóstico na histoplasmose, sendo empregadas rotineiramente nos testes laboratoriais.

Na mensuração de anticorpos contra *H. capsulatum* var. *capsulatum*, conforme descrito por Durkin *et al.* (1997), pode ocorrer resultados falso-positivo com outras infecções fúngicas, e falso-negativo podem resultar durante o primeiro mês de infecção. Também, pacientes imunodeprimidos, por não desenvolverem resposta humoral ao *H. capsulatum* var. *capsulatum*, resultando em sorologia positiva em apenas 60% dos casos.

A determinação de anticorpos da classe IgG por radioimunoensaio (RIA) é duas vezes mais sensível que a reação de fixação do complemento (FC) e imunodifusão (ID). Contudo os níveis de anticorpos circulantes persistem nos pacientes, dificultando o diagnóstico da infecção ativa (HAMILTON, 1998).

O RIA para detecção de antígenos do *H. capsulatum* var. *capsulatum* foi estabelecido como método de diagnóstico da histoplasmose e monitoramento da resposta ao tratamento; podendo ser detectados em 80% dos pacientes que apresentam histoplasmose disseminada (WHEAT *et al.*, 1986). Segundo Durkin *et al.* (1997), o ELISA é tão sensível e específico quanto o RIA para detecção de antígenos do *Histoplasma*, e apresenta também excelente reprodutibilidade.

Em pacientes, que apresentam histoplasmose disseminada, tem se demonstrado a correlação da antigenemia com a efetividade da terapia, podendo monitorar desta maneira a resposta ao tratamento. Uma maneira eficiente de realizar o diagnóstico de histoplasmose ou identificação de recidivas é através da detecção de antígeno (WHEAT *et al.*, 2001) por ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura (WILLIAMS *et al.*, 1994; WHEAT *et al.*, 2001), onde o antígeno pode ser detectado na urina (92%) e no soro (82%) de pacientes com forma disseminada da histoplasmose (WILLIAMS *et al.*, 1994).

O antígeno H pode ser detectado por eletroforese, através do reconhecimento da banda de 94 KDa, permitindo diagnosticar uma infecção ativa (PIZZINI *et al.*, 1999). Embora a detecção de antígenos seja mais sensível que os ensaios para detecção de anticorpos no soro, há possibilidade de apresentar reação cruzada a outros patógenos, como *Paracoccidioides brasiliensis* (WHEAT *et al.*, 1986). Bracca *et al.* (2003) propuseram o diagnóstico da histoplasmose através de *seminested* – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que amplifica a porção do gene antígeno H. Este ensaio é altamente sensível e específico, sendo capaz de

detectar material genômico correspondentes a menos de 10 células leveduriformes, sem apresentar reação cruzada contra outras bactérias ou fungos patogênicos.

1.5 RESPOSTA IMUNE AO *H. CAPSULATUM* VAR. *CAPSULATUM*

A eficácia da resposta imune protetora contra *H. capsulatum* var. *capsulatum* requer a ação de diversas células e citocinas (ALLEN; DEEPE Jr, 2005). Os leucócitos polimorfonucleares e monócitos/ macrófagos constituem importantes células na defesa à infecções, participando das respostas inflamatórias (ABBAS; LITCHMAN; POBER, 2003). As células T CD4⁺ e CD8⁺ contribuem para o *clearance* do organismo, tanto em infecções primárias quanto em secundárias, embora exerçam sua influência em diferentes etapas (ALLEN; DEEPE Jr, 2005).

Citocinas como TNF- α , INF- γ , fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), e IL-12 contribuem para a eliminação de fungos, por induzir a ativação de macrófagos, e intensificar a produção de óxido nítrico sintase (NOS) (SMITH *et al.*, 1990; LANE *et al.* 1993; ALLENDOERFER *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 1998; DEEP Jr. *et al.*, 1999). O TNF- α é um importante mediador das defesas do hospedeiro, sendo necessário na resposta imune primária e secundária em infecções em camundongos (ALLENDOERFER *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 1998). Deep Jr. e Gibbons (2006) demonstraram que as células T são uma importante fonte de TNF- α em camundongos infectados pelo *H. capsulatum* var. *capsulatum*. Esta citocina deve estar presente precocemente no período de infecção para melhor expressão da imunidade protetora. Em contraste, IL-4 e IL-10 aumentam a susceptibilidade do hospedeiro às infecções fúngicas, através da inibição da produção de iNOS por macrófagos e células dendríticas (DCs), por estimularem a liberação de outras citocinas do padrão Th2 (DEEP Jr.; GIBBONS, 2003; GILDEA *et al.*, 2003).

As DCs podem ingerir uma variedade de patógenos auxiliando tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa. Gildea *et al.* (2001) demonstraram que o reconhecimento e captura do *H. capsulatum* var. *capsulatum* é realizado através de receptores de adesão VLA-5, que possivelmente estaria relacionado com

o não crescimento intracelular de células fúngicas. Em 2005 Gildea *et al.*, sugeriram que o maior mecanismo pelo qual DCs humanas medeiam a atividade anti-*Histoplasma* pela exposição das leveduras as hidrolases lisossomais das DCs.

Lesões pulmonares por leveduras do *H. capsulatum* var. *capsulatum* no homem ou em modelos experimentais são caracterizadas por grande quantidade de macrófagos parasitados. Bullock e Wright (1987) descreveram que as leveduras fagocitadas reproduzem-se no interior dos macrófagos alveolares em 9 - 11 h, rompendo a célula e liberando *H. capsulatum* var. *capsulatum*, que é fagocitado por outra célula atraída para o local da infecção. Eissenberg e Goldman (1991) descreveram que as leveduras de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, revestidas por C3ib (componente de ligação do sistema complemento), não induz a sinalização para fagocitose. *H. capsulatum* var. *capsulatum* provoca pouca ou nenhuma resposta oxidativa em macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de murinos ou em polimorfonucleares humanos (EISSENBERG; GOLDMAN, 1987; SCHNUR; NEWMAN, 1990).

Taylor *et al.* (2004) demonstraram que leveduras do *H. capsulatum* var. *capsulatum* são capazes de induzir aglutinação de eritrócitos humanos, independentemente do grupo sanguíneo, sendo esta característica importante para a patogênese do *H. capsulatum* var. *capsulatum*, não apenas na disseminação da doença, mas também na formação de coágulo, mediada pela capacidade hemaglutinante das leveduras. O conhecimento dos componentes que afetam as células do hospedeiro poderá contribuir para melhor compreensão da patogênese da histoplasmose.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar parcialmente o antígeno solúvel de *H. capsulatum* var. *capsulatum* com atividade hemaglutinante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Obter antígenos solúveis de *H. capsulatum* var. *capsulatum*;
- 2.2.2. Analisar a capacidade do CFA de *H. capsulatum* var. *capsulatum* em aglutinar hemácias de camundongos;
- 2.2.3. Analisar efeito do CFA aquecida a 56 °C na aglutinação de hemácias de camundongos;
- 2.2.4. Obter anticorpos policlonais a antígenos solúveis de *H. capsulatum* var. *capsulatum* ligados à hemácia autóloga (anti-Ea-CFA);
- 2.2.5. Analisar a inibição da atividade hemaglutinante pelo soro anti-Ea-CFA;
- 2.2.6. Fracionar antígenos de *H. capsulatum* var. *capsulatum* através de cromatografia de gel filtração;
- 2.2.7. Analisar a reatividade do soro anti-Ea-CFA às frações cromatográficas de CFA de IMT/Hc 128;
- 2.2.8. Evidenciar a hemofagocitose *in vitro* mediada por antígenos solúveis de *H. capsulatum* var. *capsulatum*;

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. 4th ed. Saunders Company, p-544, 2003.

ALLEN, H.L.; DEEPE JR., G.S. Apoptosis modulates protective immunity to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 10, p. 2875 – 2885, 2005.

ALLENDOERFER, R.; DEEPE JR., G.S. Blockade os endogenous TNF- α exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis. **J. Immunol.**, v.160, p. 6072-6082, 1998.

ANDREU, C.M.F. *Histoplasma capsulatum*. In: Llop, A; Valdés-Dapena, M.; Zuazo, J.L. (ed) **Microbiología y parasitología médicas** . La Habana, Editorial Ciencias Médicas, Capítulo 49, p. 509-515, 2001.

BULLOCK, W.E.; WRIGTH, S.D. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p 150, 95, in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 165, p. 195-210, 1987.

BRACCA, A.; TOSELLO, M.E.; GIARDINI, J.E.; AMIGOT, S.L.; GOMEZ, C.; SERRA, E. Molecular detection os *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n.4, p. 1753-1755, 2003.

CANTELLA, G.; COPPENS, L.; VAN ESPEN, A.; DUMON, J.; SALHADIN, A; SZTERN, B. Bucal ulcerations in an Ecuadorian patient. **Rev. Med. Brux.**, v.3, n.26, p. 169-171, 2005.

CHANG, M.R.; TAIRA, C.L.; PANIAGO,A.M.M.; TAIRA, D.L.; CUNHA,R.V.; WANKE,B. Study of 30 cases of histoplasmosis observed in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.49 (1), p.37-39, 2007.

CHEMLAL, K.; ANDRIEU-BAUTRU, V.; COUVELARD, A. Hemophagocytic syndrome during *Histoplasma capsulatum* infection. **Haematologia**, v.82, p.726, 1997.

COZAD, G.C.; SCALARONE, G.M. Effect of Histoplasmosis on Antibody Response to an Erythrocyte Antigen. **J. Bacteriol**, v.97, n.2, p.576-580, 1968.

D'AVILA, S.C.G.P.; CHAPADEIRO, E. Histopathology and immunohistochemistry of skin and oral mucosa in disseminated histoplasmosis associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.31, n.6, p.539-547, 1998.

DEEP JR., G.S.; GIBBSON, R. WOODWARD, E. Neutralization of endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulation factor subverts the protective immune response to *Histoplasma capsulatum*. **J. Immunol.**, v. 163, p. 4985-4993, 1999.

DEEP JR., G.S.; GIBBONS, R. Protective and memory immunity to *Histoplasma capsulatum* in the absence of IL-10. **J. Immunol.**, v.171, p. 5353- 5362, 2003.

DEEP JR., G.S.; GIBBONS, R.S. T cells require tumor necrosis factor - α to provide protective immunity in mice infected with *Histoplasma capsulatum*. **J. Inf. Dis.**, v.193, n.2, p. 322-330, 2006.

DUBOS, R.J. **Bacterial and mycotic infections of man**. 2 ed. United States, 785p, 1948.

DURKIN, M.M.; CONNOLLY, P.A.A.; WHEAT, L.J. Comparison of Radioimmunoassay and Enzyme – Linked Immunoassay Methods for Detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* Antigen. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.9, p.2252-2255, 1997.

DRUTZ, DJ, editor: Systemic fungal infections: diagnosis and treatment. I. **Med Clin. North Am.**, v.3, 1988.

DRUTZ, DJ, editor: Systemic fungal infections: diagnosis and treatment. II. **Med Clin. North Am.**, v.4, 1989.

EISSENBERG, L.G.; GOLDMAN, W.E. *Histoplasma capsulatum* fails to trigger release of superoxide from macrophages. **Inf. Immun.**, v.55, p. 29-34, 1987.

EISSENBERG, L.G.; GOLDMAN, W.E. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. **J. Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, n.4, p.411-421, 1991.

FUJIWARA, F.; HIBBI, S.; IMASHUKU, S. Hypercytokinemia and hemophagocytic syndrome. **Am. J. Ped. Hematol. Oncol.**, v.15, p. 92-98, 1993

- GARCIA, N. M.; ASSIS, C. M.; DEL NEGRO, G. M. B.; LACAZ, C. S. *Obtenção de exoantígenos de Histoplasma capsulatum em meio de neopeptona, glicose, tiamina e asparagina (NGTA)*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**; 32(5):370-374, 1990.
- GARCIA-VASQUEZ, E.; VELASCO, M.; GASCON, J.; CORACHAN, M.; MEJIAS, T.; TORRES-RODRIGUEZ, J.M. *Histoplasma capsulatum* infection in a group of travelers to Guatemala. **Enf. Inf. Microbiol. Clin.**, v.5, n.23, p.274-276, 2005.
- GILDEA, L.A.; MORRIS, R.E.; NEWMAN, S.L. *Histoplasma capsulatum* yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. **J. Immunol.**, v.166, p.1049-1056, 2001.
- GILDEA, L.A.; GIBBONS, R.; FINKELMAN, F.D.; DEEP JR., G.S. Overexpression of interleukin – 4 in lungs of mice impairs elimination of *Histoplasma capsulatum*. **Inf. Immun.**, v.71, n.7, p.3787-3793, 2003.
- GILDEA, L.A.; CIRAULO, G.M.; RANDAL, E.M.; NEWMAN, S.L. Human Dendritic Cell Activity against *Histoplasma capsulatum* Is mediated via Phagolysosomal Fusion. **Inf. Immun.** v.73, p.6803-6811, 2005.
- GÓMEZ, B.L.; FIGUEROA, J.I.; HAMILTON, A.J.; DIEZ, S.; ROJAS, M.; TOBON, A.; RESTREPO, A.; HAY, R.J. Detection of the 70-kilodalton *Histoplasma capsulatum* antigen in serum of histoplasmosis patients correlation between antigenemia and therapy during follow-up. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.3, p. 675-680, 1999.
- HAMILTON, A.J. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii; current status and future trends. **Med. Mycol.**, v.36, p.351-364, 1998.
- JANKA, G.; IMASHUKU, S.; ELINDER, G.; SCHEIDER, M.; HENTER, J.L. Infection and malignancy-associated hemophagocytic syndromes. Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Hematol. Oncol. Clin. Noth. Am.**, v.12, p. 435- 444, 1998.
- JANKA, G.; STADT, U. Z. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. Hematology. **Am. Soc. Hematol. Ed. Prog.**, v.5, p. 82-88, 2005.
- JANKA, G.E. Hemaphagocytic syndromes. **Blood Rev.**, v.21, 5^a ed., p. 245-253, 2007.

KAMEI, K. Imported mycoses in Japan: their present status and problems. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v.1, n.46, p.17-20, 2005.

KHALIL, M.; EKANEM, I.A.; GUGNANI, H.C.; ATTAH, E.B. Some deep mycoses diagnosed by histopathology in South Eastern Nigeria. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.16, p.221-224, 1999.

KERSULYTE, D.; WOODS, J.P.; KEATH, E.J.; GOLDMAN, W.E.; BERG, D.E.: Diversity among clinical of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. **J. Bacteriol**, v.174, p.7075-7079, 1992.

KODURI, P.R.; CHUNDI, V.; DEMARAIS, P. Reactive hemophagocytic syndrome: a new presentation of disseminated histoplasmosis in patients with AIDS. **Clin. Inf. Dis.**, v.21, p.1463-1465, 1995.

LANE, T.E.; WU-HSIEH, B.A.; HOWARD, D.H. Gamma Interferon cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state. **Inf. Immun.**, v.61, n.4, p. 1498-1473, 1993.

LARSH, H. W. Histoplasmosis. In: di Salvo AF. Occupational mycoses. **Philadelphia: Lea & Febiger**; p.29-42, 1983

LEIMANN, B.C.Q.; PIZZINI, C.V.; MUNIZ, M. M. et al. – Histoplasmosis in a Brazilian center clinical forms and laboratory tests. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.22, p.141-146, 2005.

MARESCA, B.; KOBAYASHI, G.S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. **Microbiol. Rev.**, v.53, n.2, p.186-209, 1989.

MEDEIROS, A.I.; SILVA, C.L.; MALHEIRO, A.; MAFFEI, C.M.L.; FACCIOLI, L.H. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the β -glucan present in their cell wall. **Brit. J. Pharmacol.**, v.128, p.1529-1537, 1999.

NEGRONI, R. Histoplasmosis. In VERONESI, R. & FOCACCIA, R. ed. **Tratado de infectologia**. São Paulo, Atheneu, p.1140-1149, 2002.

NEVES, J. **Diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. 2ª.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1248, 1983.

OHGA, S.; MAATSUZAKI, A.; NISHIZAKI, M. Inflammatory cytokines in vírus – associated hemophagocytic syndrome: interferon gamma as a sensitive indicator of disease activity. **Am. J. Ped. Hematol. Oncol.**, v.15, p. 291-298, 1993.

PAULA, A.V.; AIDÉ, M.A. As microepidemias de histoplasnose do Estado do Rio de Janeiro. **J. Bras. Med.**, v.49, p.18–28, 1985.

PIZZINI, C.V.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; REISS, E.; HAJJEL, R.; KAUFMAN, L.; PERALTA, J.M. Evaluation of a western blot in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.6, n.1, p. 20-23, 1999.

PÉREZ, J.; CARRASCO, L. Diagnóstico histopatológico de micosis en patología veterinária. **Rev. Iberoam. Micol.** V.17, p.S18 – S22, 2000.

PERROTTA, D.; ABRANTES, R.; CANTEROS, C.; RODERO, L.; DAVEL G. :Molecular characterization of isolates of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* by RAPD-PCR in Argentina. **Rev. Argent. Microbiol.**, v.33(3), p.160-166, 2001.

REYES-MONTES, M.D.R.; TAYLOR, M.L.; CURIEL-QUESADA, E.; ARANGO, A.C.M. Current knowledge on the strain typing of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: a review of the findings. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, op. 121-126, 2000.

RIPPON, J.W. **Tratado de Micología Médica, Hongos y Actinomicetos Patógenos**. 3ª ed Interamericana MacGraw Hill. Buenos Aires, 1990.

SCHNUR, R.A.; NEWMAN, S.L. The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils. Evidence for intracellular trapping of superoxide anion. **J. Immunol.**, v. 144, p. 4765-4772, 1990.

SCHWARZ, J. **Histoplasmosis**. New York: Praeger Publishers, p. 472; 1981.

SEBGHATI, T.S.; ENGLE, J.T.; GOLDMAN, W.E. Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. **Science**, v. 290, n.5495, p. 1311-1312, nov. 2000.

SEVERO, L.C.; ZARDO, I.B.; ROESCH, E.W.; HARTMANN, A.A. Acute Disseminated Histoplasmosis in Infancy in Brazil: Reporto a Case and Review. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 15, p. 18-50, 1998.

SEVERO, L.C.; OLIVEIRA, F.M.; IRION, K.; PORTO, N.S.; LONDERO, A.T. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** ;v. 43, p.183–7, 2001.

SIDRIN, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica a Luz de Autores Contemporâneos**. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 2004.

SMITH, J.G.; MAGEE, D.M.; WILLIAMS, D.M.; GRAYBILL, J.R. Tumor necrosis factor - α plays a role in host defense against *Histoplasma capsulatum*. **J. Inf. Dis.**, v. 162, p.1349-1353, 1990.

TAYLOR, M.L.; DUARTE-ESCALANTE, E.; PÉREZ, A.; ZENTENO, E.; TORIELLO, C. *Histoplasma capsulatum* yeast cells attach and agglutinate human erythrocytes. **Med. Mycol.** V. 42, p.287-292, 2004.

TAYLOR, M.L.; RUIZ-PALACIOS, G.M.; REYES-MONTES, M.R.; RODRIGUEZ-ARELLANES,G.; CARRETO-BINAGHI,L.E.; DUARTE-ESCALANTE,E.; HERNANDEZ-RAMIREZ,A.; PEREZ,A.; SUAREZ-ALVAREZ,R.O.; ROLDAN-ARAGON,Y.A.; ROMERO-MARTINEZ,R.; SAHAZA-CARDONA, J.H.; SIFUENTES-OSORNIO,J.; SOTO-RAMIREZ,L.E.; PENA-SANDOVAL,J.H.; Identification of the infections source of an unusual outbreak of histoplasmosis in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 45, n.3, p.435-441, 2005.

TSUDA, H. Hemophagocytic syndrome (HPS) in children and adults. **Int. J. Hematol.**, v.65, p. 215-226, 1997.

UNIS, G.; SILVA,V.B. da; SEVERO,L.C. Disseminated histoplasmosis and AIDS. The role of culture médium for the bronchoscopic clinical specimens. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, n.3, p.234-237, 2004a.

UNIS, G.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C. Disseminated histoplasmosis in Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** , v.37, n. 6, p. 463-468, 2004b.

VALLE, A.C.F.; MOREIRA, L.C.; ALKEIDA-PAES, R.; MOREIRA, J.S.; PIZZINI, C.V., MUNIZ, M.M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Chronic disseminated histoplasmosis with lesions restricted to the mouth: case report. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.48, n.2, p. 113-116, 2006.

WANG, Z.; DUARTE, A.G.; SCNADIG, J. Fatal reactive hemophagocytosis related to disseminates histoplasmosis with endocarditis: an unusual case diagnosed at autopsy. **South. Med. Assoc.** , v.100, n. 2, p. 208-211, 2006.

WHEAT, L.J.; KOHLER, R.B.; TEWARI, R.O. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. **N. Engl. J. Med.**, v.314, p. 83-88, 1986.

WHEAT, J. Histoplasmosis: recognition and treatment. **Clin. Inf. Dis.**; 19 Suppl 1, p.19–27, 1994.

WHEAT, L.J.; MARICHAL, P.; BOSSCHE, H.V.; LE MONTE,A.; CONNOLLY, P. Hypothesis on the mechanism of resistance to fluconazole in *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.41, n.2, p.410-414, 1997.

WHEAT, L.J.; SAROSI, G. McKINSEY, D. HAMILL,R., BRADSHER, R., JOHNSON, P., LOYD, J. KAUFFMAN, C. Practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis. Infectious Diseases Society of America. **Clin. Inf. Dis.** , v.30, p. 688-695, 2000.

WHEAT, L.J.; CLOUD,G.; JOHNSON,P.C.; CONNOLLY,P.; GOLDMAN,M.; LE MONTE, A.; FULLER,D.E.; DAVIS,T.E.; HAFNER,R. Clearance of fungal burden during treatment of disseminated histoplasmoses with liposomal amphotericin B versus itraconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45,n.8,p.2354-2357, 2001.

WHEAT, L.J., KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis. **Clin. Inf. Dis** , v.17, p.1-19, 2003.

WILLIAMS, B.; FOJTASEK, M.; CONNOLLY-STRINGFIELD, P; WHEAT, L.J. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection during an outbreak in Indianapolis, Ind. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.118, p.1205-1208, 1994.

ZHAO, B.; XIA, X.; YIN,J.; ZHANG,X.; WU,E.; SHI,Y.; TONG,M.; SUN,S.; GUI, X.; ZHAO,Z.; AYINUER; FENG X. Epidemiological investigation of *Histoplasma capsulatum* infection in China. **Chin. Med. J.**, v.7, n.114, p.743-746, 2001.

ZHOU, P.; MILLER, G.; SEDER, R.A. Factors involved in regulating primary and secondary immunity to infection with *Histoplasma capsulatum*: TNF $-\alpha$ plays a critical role in maintaining secondary immunity in the absence of IFN $-\gamma$. **J. Immunol.**, v. 160, p.1359- 1368, 1998.

YAMAMOTO, K.; MIYAJI, M.; MORETTI-BRANCHINI, M.L.; SCHREIBER, A.Z.; AOKI, F.H.; NISHIMURA, K.; TAGUCHI, H.; YAMANAKA, A. **Fungos Patogênicos. Guia prático de laboratório, projeto de pesquisa clínica e de treinamento médico da Unicamp**, v.1, Capítulo 6, p.50., 2002.

4. ARTIGO: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE HISTOPLASMA CAPSULATUM VAR. CAPSULATUM COM ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

4.1. RESUMO

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* é um fungo dimórfico causador da histoplasmose, doença sistêmica e grave em imunossuprimidos. Tem sido relatada a atividade hemaglutinante do fungo e de casos de histoplasmose disseminada associada a autohemofagocitose. O objetivo do presente trabalho foi analisar e caracterizar parcialmente o(s) componente(s) solúvel(eis) com atividade hemaglutinante. Inicialmente foram obtidos *cell free antigen* (CFA) de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (isolado IMT/HC 128) e anticorpos policlonais de camundongos a componentes ligantes às hemácias (anti-Ea-CFA). Para análise de atividade hemaglutinante foram utilizados eritrócitos de camundongo incubados com amostras de CFA (E-CFA), com CFA previamente aquecida a 56 °C durante 30 minutos (E-CFAa) ou tratada com PBS (E-PBS). Os anticorpos anti-Ea-CFA foram testados quanto a sua capacidade em inibir a hemaglutinação e para análise das frações de CFA por ELISA. As frações foram obtidas por cromatografia de CFA em coluna de gel filtração (*Sephadex* G-75/120 e G-200). Adicionalmente foi realizada a análise de hemofagocitose, incubando-se hemácias autólogas sensibilizadas ou não com CFA e células peritoneais de camundongos BALB/c aderentes ao vidro. Os resultados obtidos demonstraram aglutinação positiva com E-CFA e negativa com E-CFAa ou E-PBS. Os anticorpos policlonais obtidos apresentaram a capacidade de inibir a atividade hemaglutinante e de interagir com as frações cromatográficas de alta MM. O ensaio de hemofagocitose demonstrou positividade com E-CFA e negativa com E-PBS. Concluimos que o fungo *H. capsulatum* var. *capsulatum* libera componente solúvel, termolábil, com atividade hemaglutinante e este trabalho evidencia pela primeira vez a indução da autohemofagocitose por componentes solúveis de *H. capsulatum* var. *capsulatum* e análise indireta utilizando anticorpos sugerem que os componentes responsáveis pela interação com as hemácias apresentam alta MM.

Palavras-chave: Histoplasmose disseminada. Síndrome de ativação hemofagocítica. Hemaglutinação. Anticorpos. ELISA. Eritrócitos.

4.2. ABSTRACT

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* is a thermally dimorphic fungus that causes histoplasmosis, a quite common systemic disease which can have serious or fatal outcomes, especially among immunocompromised patients. Both fungal hemagglutination activity and cases of reactive hemophagocytic syndrome (RHS) have been reported in the disseminated form of disease. The objective of the present study was to detect and partially characterize soluble components of *H. capsulatum* var. *capsulatum* with hemagglutinin activity. Initially, cell-free antigen (CFA) was obtained from *H. capsulatum* var. *capsulatum* (isolate IMT/HC128) and mouse polyclonal antibodies were raised against red blood cells (RBC) binding CFA components (anti-RBC-CFA). To analyze hemagglutination, RBC were incubated with CFA (RBC-CFA), with heated CFA (56 °C, 30 min) (CFA-hCFA) and with PBS (CFA-PBS) as a control. The anti-RBC-CFA antibodies were assayed for hemagglutination inhibition by pre-incubation with CFA and used to analyze chromatographic fractions (*Sephadex* G - 75/120 and *Sephadex* G-200) by immunoenzymatic assay (ELISA). Additionally, hemophagocytosis was analyzed by incubating BALB/c mouse peritoneal phagocytic cells with autologous RBC, sensitized or not with CFA. Hemagglutinin activity was observed with RBC-CFA but not with RBC-hCFA or RBC-PBS. The anti-RBC-CFA antibodies inhibited hemagglutination and reacted with high molecular mass (MM) CFA fractions. Hemophagocytosis was observed with RBC-CFA but not with RBC-PBS. In conclusion, the (37 °C) yeast form of *H. capsulatum* var. *capsulatum* releases thermolabile soluble components with hemagglutinin activity and it has been demonstrated for the first time that soluble components of the same fungus induce autohemophagocytosis. Also, the indirect analysis with antibodies suggests that high MM components are responsible for the interaction with the red blood cells.

Keywords: Disseminated histoplasmosis. Reactive hemophagocytic syndrome. Hemagglutination. Antibodies. ELISA. Red blood cells.

4.3. INTRODUÇÃO

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* é um fungo dimórfico causador da histoplasmose, micose sistêmica, endêmica na região leste dos Estados Unidos e em quase toda América Latina, de distribuição cosmopolita (REYES – MONTES *et al.*, 2000; WHEAT, L.J., 2001; Unis *et al.*, 2004a; LEIMANN *et al.*, 2005). A infecção se dá por inalação de microconídeos do *H. capsulatum* var. *capsulatum* na fase micelial, sendo na maioria das vezes assintomática ou autolimitada, podendo resultar em uma variedade de manifestações clínicas: histoplasmose pulmonar aguda benigna até histoplasmose disseminada e fatal (EISSENBERG; GOLDMAN, 1991; UNIS *et al.*, 2004a; UNIS *et al.*, 2004b).

Histoplasmose disseminada fatal e irreversível é classicamente descrita em pacientes imunossuprimidos, especialmente àqueles com AIDS, tendo sido observada também em indivíduos apresentando linfocitopenia idiopática de CD4⁺ e naqueles muito jovens ou em idade avançada (WHEAT *et al.*, 2000). Os sintomas mais freqüentes nestes casos são: febre, acometimento pulmonar, anorexia, hepatomegalia, sintomas neurológicos, esplenomegalia, linfadenopatia e meningite (RACHID *et al.*, 2003).

Tem sido relatado casos de histoplasmose disseminada apresentando síndrome de reativação hemofagocítica (RHS), principalmente em pacientes com HIV ou imunossuprimidos (TSUDA, 1997; WANG *et al.*, 2006; GUIOT *et al.*, 2007). A RHS é uma desordem clinicopatológica caracterizada por uma proliferação exacerbada, de células não malignas, da linhagem de monócitos-macrófagos-histiócitos. Os sintomas incluem febre elevada persistente, citopenias e hepatoesplenomegalia (JANKA *et al.*, 1998; FISMAN, 2000; JANKA; STADT, 2005; GUIOT *et al.*, 2007).

Vários fatores de virulência do fungo devem contribuir para a patogênese da

histoplasmose, tais como a proteína de 50 kDa, ligadora da laminina (Mc MAHON *et al.*, 1995), componente do fungo com capacidade de induzir aglutinação de eritrócitos humanos, independentemente do grupo sanguíneo, pode ser importante não apenas na disseminação da doença, mas também como um possível co-fator na formação de coagulo, mediada pela capacidade hemaglutinante das leveduras (TAYLOR *et al.*, 2004).

Além dos componentes ligados ao fungo, os componentes solúveis também devem interferir na relação parasito-hospedeiro. Sá-Nunes *et al.* (2004) introduziram *cell free antigens* (CFA) como fonte de Ags de *H. capsulatum* var. *capsulatum* para avaliação da imunidade celular e indução de proteção na histoplasmose experimental em camundongos.

O presente trabalho introduziu CFA de *H. capsulatum* var. *capsulatum* para análise e caracterização parcial de antígeno solúvel com atividade hemaglutinante e para avaliação da hemofagocitose utilizando células de camundongos.

4.4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1. Microrganismo

Fungo *H. capsulatum* var. *capsulatum* cepa 128 (IMT/Hc128) isolado de paciente com histoplasmose, proveniente do Instituto de Medicina Tropical (IMT), Lima, Peru.

4.4.2. Cultura de *H. capsulatum* var. *capsulatum* e obtenção de CFA

Amostra de massa fúngica do isolado IMT/Hc 128, na fase leveduriforme, cultivado em meio Sabouraud Dextrose Ágar (ACUMEDIA®) (35 °C, 5 dias de cultura) foi suspendida em solução salina tamponada com fosfato – PBS 0,15 M pH 7,2, 0,05% de thimerosal e 1mM de fluoreto de fenilsulfonil – PMSF (P7626, SIGMA®); (v/v). Após homogeneização em Vórtex (2 ciclos de 2 minutos) e repouso no gelo por 1 h, foi submetida a centrifugação (5000 rpm por 10 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi centrifugado novamente a 4 °C a 14000 rpm por 20 minutos, obtendo-se CFA. A concentração de proteínas totais do CFA foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). As amostras foram aliquotadas e armazenadas a – 80 °C.

4.4.3. Obtenção de hemácias (1% e 5%)

A partir de amostra de sangue periférico de camundongo BALB/c coletada em tubo heparinizado, as hemácias foram obtidas por centrifugação, seguida de três lavagens com PBS 0,15 M pH 7,2 a 3000 rpm por 5 minutos e ajustadas a concentração de 1% e 5% em PBS.

4.4.4. Teste de hemaglutinação com CFA de *H. capsulatum* var. *capsulatum*

Em uma microplaca de 96 orifícios (fundo V) foram adicionados 50 µl/orifício de CFA de IMT/Hc 128 a 4,1 mg/ml, puro e em diluições seriadas (1/2 até 1/1024) e como controle negativo PBS e a seguir solução de hemácias de camundongo BALB/c 1% (50 µl/orifício). A placa foi incubada a 37 °C por 1 hora e a leitura realizada visualmente, verificando-se a formação ou não da hemaglutinação. Utilizando a mesma metodologia, foi realizada adicionalmente a análise de CFA previamente aquecido a 56 °C por 30 minutos (E-CFAa).

4.4.5. Obtenção de Acs policlonais a antígenos solúveis de *H. capsulatum* var. *capsulatum* ligados à hemácia autóloga (anti-Ea-CFA)

Quatorze camundongos BALB/c, machos, 60 dias, mantidos com água e ração *ad libitum* no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas (PAT), CCB, UEL, à temperatura constante de 25 °C, foram inoculados por via subcutânea, região peritoneal, com 50 µl de preparação antigênica. A preparação antigênica foi obtida a partir de CFA de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (em dose subaglutinante) v/v com hemácia autóloga a 5%, incubados previamente por 1 h a 37 °C e 1 h a 4°C, lavado três vezes com solução de hank's gelada. Após ressuspender com solução de hank's, a preparação antigênica foi emulsionada v/v com Adjuvante Completo de Freund (F-5881, SIGMA®). Para segunda e terceira dose os animais receberam 50 µl de preparação antigênica emulsionando v/v com Adjuvante Incompleto de Freund (F-5506, SIGMA®). Sete dias após a última dose foi realizada sangria de prova. No décimo dia após a última dose foi coletado sangue por punção cardíaca. O soro foi obtido por centrifugação a 1600 rpm por 5 minutos. A manipulação de camundongos foi realizada de acordo com as normas de biotério da UEL e o projeto submetido ao

Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL.

4.4.6. Teste de inibição da atividade hemaglutinante pelo soro anti-Ea-CFA

Em uma microplaca de 96 orifícios com fundo V, foram adicionados 50 µl soro anti-Ea-CFA previamente inativado por 30 minutos a 56 °C e pré-incubado com CFA de IMT/Hc 128 (4,11 mg/ml), v/v por 1 h a 37 °C, puro e em diluições seriadas até 1/2048. Como controle positivo utilizou-se 50 µl CFA de IMT/Hc 128 diluído 1/2 e em diluições seriadas em PBS até 1/2048, e como controle negativo PBS. Adicionalmente foi realizada a análise utilizando soro pré-imune que foi pré-incubado com CFA de IMT/Hc 128 v/v, por 1 h a 37 °C. Como controle adicional foi incubada amostra de soro anti-Ea-CFA e eritrócitos. Após adição de 50 µl de hemácia de camundongo a 1% e incubação a 37 °C por 1 h foi realizada a leitura.

4.4.7. Cromatografia de CFA de *H. capsulatum* var. *capsulatum* por gel filtração e análise das frações

Dois mililitros de CFA de IMT/Hc 128 a 4,1 mg/ml foram submetidos à cromatografia de gel filtração em coluna de *Sephadex* G-75/120 e G-200 utilizando PBS 0,15 M pH 7,2 para eluição das frações. Foram coletadas 1500 µl/tubo e a absorbância de cada fração determinada por espectrofotometria a 280 nm e submetida à análise por teste de hemaglutinação e por ELISA. A reação de hemaglutinação foi realizada conforme o item 4.4.4. utilizando amostras não diluídas de cada fração. Para ELISA, as placas (96 orifícios, TPP, Switzerland, Europe) foram sensibilizadas com 100 µl/ orifício de CFA IMT/Hc 128 (25 µg proteína/orifício) ou com as frações de *Sephadex* G-75/120, diluídas em tampão carbonato bicarbonato 0,1 M pH 9,6. Após bloqueio e lavagens, a placa foi incubada por 90 minutos a 37 °C com 100 µl/orifício de soro de camundongo anti-Ea-CFA, diluído 1:10. Como controle negativo foi utilizado soro pré-imune diluído 1:10 e após as lavagens incubada com conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (A 8924 - SIGMA®), por 90 minutos a 37 °C. A reação foi revelada com 100 µl/orifício de OPD/H₂O₂, e interrompida após 15 minutos com a adição de 50 µl/ orifício de H₂SO₄ 4 N. A leitura foi realizada em leitor ELISA Multiskan EX (Uniscience – Labsystems) a 492 nm.

4.4.8. Teste de hemofagocitose *in vitro*

Para obtenção de macrófagos da cavidade peritoneal, foram administradas 2,5 ml de solução de hank's gelada no peritônio de um camundongo BALB/c, fêmea, 60 dias, anestesiado com éter etílico. Após massagem leve local, durante 10 minutos, o camundongo foi sacrificado via analgesia inalatória seguida de hipóxia por deslocamento cervical. As células obtidas foram depositadas em uma placa de

Petri e incubadas por 1 h a 37 °C, seguida de três vezes lavagens com solução de hank's pré-aquecida a 37 °C. As células aderentes foram tratadas com solução de EDTA 0,05%, coletadas, lavadas e ajustadas a concentração de 5×10^6 células em solução de hank's. Amostras de suspensão de macrófagos peritoneais (50 µl) foram adicionadas à 50 µl da suspensão de hemácias autólogas a 1% sensibilizadas com CFA (v/v) e incubada a 37 °C (estufa BOD) por 40 minutos, em lâminas de microscopia. Para a sensibilização das hemácias, amostras de CFA de IMT/Hc 128 foram incubadas pura e nas diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 e 1/128 com hemácias a 1%. Como controle negativo amostra de CFA de IMT/Hc 128 foi substituída pelo mesmo volume de PBS. As lâminas foram fixadas com metanol e coradas por hematoxilina eosina (HE) e analisadas por meio de microscopia óptica. Foram analisados 10 campos com objetiva de 100x.

4.4.9. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo Teste de Kruskal-Wallis, Teste não paramétrico, pelo programa GraphPad InStat version 3.05 for Windows 95/NT (GraphPad Software, San Diego Califórnia, USA, www.graphpad.com). Os valores obtidos são descritos pela média \pm desvio padrão, e os resultados considerados significativos quando $p < 0.05$.

4.5. RESULTADOS

4.5.1. Teste de hemaglutinação com CFA de *H. capsulatum* var. *capsulatum*

O teste de hemaglutinação resultou em aglutinação de hemácias, com lise parcial das hemácias, quando previamente sensibilizadas com CFA (E-CFA) puro e 1/2, não ocorrendo aglutinação ou lise com hemácias não sensibilizadas com CFA (E-PBS) ou nas sensibilizadas com CFA (E-CFA) diluídas (de 1/4 a 1/1024). A reação de hemaglutinação também foi negativa com CFA previamente aquecida (E-CFAa). (Tabela 1).

4.5.2. Teste de inibição da atividade hemaglutinante pelos anticorpos anti-Ea-CFA

Os resultados obtidos demonstraram reação de hemaglutinação negativa quando CFA foi previamente incubada com soro imune anti-Ea-CFA, desde a diluição inicial de CFA 1/2 (soro/CFA v/v) e demais diluições analisadas. O controle positivo com CFA resultou na reação positiva na diluição inicial de 1/2 e negativa nas diluições de 1/4 a 1/1024, ocorrendo também reação negativa com hemácias tratadas com PBS (Figura 1). Testes adicionais com soro imune anti-Ea-CFA incubadas com hemácias controles (E-PBS) resultaram em reação de hemaglutinação negativa e análise de soro pré-imune com E-CFA resultou na reação de hemaglutinação positiva na diluição inicial de CFA a 1/2 e negativa nos demais diluições (Tabela 1), demonstrando a especificidade dos anticorpos presentes no soro imune.

4.5.3. Fracionamento de antígeno solúvel de *H. capsulatum* var. *capsulatum* por cromatografia de gel filtração

O processo de fracionamento de antígenos solúveis de *H. capsulatum* var. *capsulatum* por cromatografia de gel filtração através de coluna *Sephadex* G-75/120 (Figura 2) e G-200 (Figura 3) resultou em perfil espectrofotométrico com 2 picos de absorvância a 280 nm tanto com G-75/120 como G-200.

4.5.4. Análise das frações cromatográficas de CFA por hemaglutinação e ELISA

Os resultados de análise de todas as frações obtidas em coluna *Sephadex* G 75/120 e G-200 por teste de hemaglutinação resultaram em reação negativa com as hemácias de camundongo. Os controles com CFA foram positivos e com PBS negativo (dados não demonstrados). Os resultados de análise das frações obtidas em coluna *Sephadex* G 75/120 por ELISA utilizando soro imune anti-Ea-CFA demonstrou alta reatividade (alta leitura a 492 nm) com as frações correspondentes ao primeiro pico (frações 8 a 13), sendo essa reatividade estatisticamente significativa quando comparada aos valores de D.O. obtidos com CFA e soro pré-imune ($p < 0,05$). Foi observado também valor de D.O. maiores em outras frações (22, 23 e outros) em relação às amostras iniciais sem proteína, todavia não significativo quando comparado com os valores de D.O. obtidos com CFA e soro pré-imune (Figura 2). A reatividade mais intensa também foi observada com as frações de primeiro pico de cromatografia de CFA em coluna de *Sephadex* G-200 (Figura 3).

4.5.5. Hemofagocitose *in vitro*

Os resultados de teste de hemofagocitose *in vitro* demonstraram fagocitose de hemácias autólogas sensibilizadas com CFA nas diluições entre 1/8 a 1/64 (Figura 4B – 4D). O resultado em % de células com hemofagocitose em relação às células fagocíticas livres foram: 1/8 = 45% das células com hemofagocitose; 1/32 = 50% das células com hemofagocitose e diluição 1/64 = 40% das células com hemofagocitose. Não foi possível evidenciar hemofagocitose com a amostra de CFA nas diluições 1/1 a 1/4 devido à lise de hemácias. Como esperado, a hemofagocitose foi ausente em eritrócitos controles, sem a presença do CFA de IMT/ Hc 128, por se tratar de eritrócitos e células fagocíticas do mesmo hospedeiro (Figura 4).

4.6. DISCUSSÃO

Taylor *et al.* (2004) descreveram pela primeira vez a habilidade de leveduras do *H. capsulatum* var. *capsulatum* em aglutinar eritrócitos humanos, independentes do grupo sanguíneo. Todavia além do próprio fungo os seus componentes solúveis que podem difundir mais facilmente, poderiam também apresentar atividades importantes.

A presença de antígenos solúveis circulantes tem sido observada na histoplasmose, principalmente em formas mais graves e disseminadas (DURKIN *et al.*, 1997; WHEAT *et al.*, 2002) e Tristão (2006), utilizando modelo murino demonstrou tanto a presença de antígenos solúveis no decorrer da infecção bem como aumento no nível de IgG aos componentes de CFA de *H. capsulatum* var. *capsulatum*. Mais recentemente, Leonello (2007), utilizando CFA de IMT/Hc 128 evidenciou que o mesmo apresenta capacidade de aglutinar hemácias de carneiro. O presente trabalho utilizou hemácias de camundongos, resultando também na hemaglutinação, sugerindo a inespecificidade entre as espécies. Adicionalmente foi analisado o efeito de pré-aquecimento de CFA (56 °C, 30 min.), resultando na perda da atividade hemaglutinante, indicando que os antígenos responsáveis pela hemaglutinação são termolábeis.

Para melhor caracterização desses componentes, no presente trabalho, as hemácias autólogas sensibilizadas com preparados de CFA foram utilizadas para obtenção de anticorpos policlonais a antígeno solúvel de *H. capsulatum* var. *capsulatum* com capacidade hemaglutinante. Os anticorpos obtidos demonstraram inibição da hemaglutinação pela pré-incubação com CFA de IMT/Hc 128, não ocorrendo o mesmo efeito com o soro pré-imune, evidenciando a presença de anticorpos específicos para o(s) antígeno(s) com atividade hemaglutinante.

Para melhor caracterizar esse(s) antígeno(s) reconhecido(s) por anticorpos, foi realizada a análise das frações obtidas por cromatografia de CFA IMT/Hc 128 em coluna de *Sephadex* G-75/120, evidenciando a positividade nas frações correspondente ao primeiro pico (de absorção a 280nm), coincidente com o volume de exclusão de proteínas de massa molecular (MM) acima de 80 kDa. E assim foi realizada a seguir a cromatografia em coluna de *Sephadex* G-200. Da mesma forma a positividade foi observada nas frações correspondentes ao primeiro pico e correspondente a volume de exclusão de MM acima de 200 kDa, portanto sugerindo se tratar de antígenos de alta massa molecular (MM). Esses anticorpos também interagiram com outra fração de MM baixa, em menor proporção. A análise funcional dessas frações sorologicamente positivas não demonstraram a capacidade hemaglutinante com as hemácias de camundongos, concordando com os dados de Leonello (2007) que utilizaram hemácias de carneiro. Todavia, Leonello (2007) demonstrou que embora isoladamente a fração de alta MM e de baixa MM não apresente atividade, a mistura das duas frações passa a apresentar a capacidade hemaglutinante, sugerindo a necessidade de componentes de MM distintos para que ocorra a aglutinação das hemácias.

Em histoplasmose disseminada tem sido observada a ocorrência da RHS, uma hemoautofagocitose, e de acordo com Fujiwara *et al.* (1993) e Ohga *et al.* (1993); comumente associada a hiperativação de linfócitos T, resultando em excessiva secreção de citocinas e ativação de macrófagos.

A existência de antígenos solúveis de *H. capsulatum* var. *capsulatum* com capacidade hemaglutinante, como observado por Leonello (2007) e também neste trabalho nos alertou para a possibilidade dessa hemofagocitose ocorrer pelo reconhecimento de Ags de *H. capsulatum* var. *capsulatum* ligada à hemácia autóloga

pelas células fagocíticas. Assim, utilizando hemácias sensibilizadas com CFA na concentração sub-aglutinante e incubadas com as células fagocíticas oriundas de um mesmo camundongo pode-se observar a ocorrência da hemofagocitose. Como esperado esse fenômeno não foi observado na ausência de CFA de IMT/Hc 128, por se tratar de hemácias e células fagocíticas de um mesmo doador. A análise adicional com as células oriundas de estimulação prévia com peptona não demonstrou diferença com os não estimulados (dados não demonstrados). Este trabalho de hemofagocitose com componente solúvel de *H. capsulatum* var. *capsulatum* é pioneiro e apenas qualitativo.

Essa hemofagocitose observada *in vitro*, possivelmente ocorra também *in vivo* como RHS, pela participação dos componentes hemaglutinantes solúveis, pois de acordo com Tristão (2006), os componentes solúveis de CFA estão presentes na histoplasmose experimental.

Em sistema *in vivo*, além do componente solúvel do fungo ligado à hemácia, existe a possibilidade de ocorrer também à interação com as imunoglobulinas formando complexo hemácia-Ag-Ig, podendo levar a ativação do sistema complemento e a hemofagocitose ocorrer também via receptor para Fc de Ig ou via receptor de complemento 1 (CR1), presente nas células fagocíticas. Esse mecanismo também poderá levar a lise de hemácias.

A presença de Ags solúveis e anticorpos específicos e seus complexos imunes circulantes (CIC) são fatores importantes na patogênese de diversas patologias levando a glomerulonefrites e artrites na histoplasmose. Os CIC são removidos principalmente por hemácias via receptor de complemento 1 (CR1) através do fígado e baço (Abbas, 2003). Assim, não podemos descartar a hipótese de que a ligação de componentes solúveis de *H. capsulatum* var. *capsulatum* com as

hemácias e também a interação com outras moléculas do hospedeiro não interferiram no processo de transporte ou mesmo de outras funções da hemácia ou da célula fagocítica, contribuindo para a sintomatologia como a hepatoesplenomegalia observada em RHS.

Concluimos pelos resultados obtidos que *H. capsulatum* var. *capsulatum* libera componente solúvel com capacidade de aglutinar hemácias de camundongos, sendo o mesmo termolábil e apresenta alta MM. Este trabalho evidencia pela primeira vez a associação de componente solúvel de *H. capsulatum* var. *capsulatum* com a hemofagocitose.

4.7. CONCLUSÕES

1. *H. capsulatum var. capsulatum* libera componente solúvel com capacidade de aglutinar hemácias de camundongos;
2. Antígeno solúvel com capacidade de aglutinar hemácias de camundongos é termolábil;
3. É possível obter anticorpos a antígenos solúveis de *H. capsulatum var. capsulatum* envolvidos na hemaglutinação por meio de hemácias sensibilizadas com Ags solúveis de *H. capsulatum var. capsulatum*, pois os mesmos apresentam a capacidade de inibir a hemaglutinação;
4. Os componentes envolvidos na hemaglutinação possivelmente apresentam alta MM;
5. Antígenos solúveis de *H. capsulatum var. capsulatum* ligados às hemácias autólogas podem induzir a hemofagocitose *in vitro*;
6. A ocorrência da hemofagocitose *in vitro* é dependente de concentração de componentes solúveis presentes em preparado de CFA de IMT/Hc 128.

4.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. 4th ed. Saunders Company, p-544, 2003.

DURKIN, M.M.; CONNOLLY, P.A.; WHEAT, L.J. Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunoassay methods for detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* antigen. **J. Clin. Microbiol.** v.35, n.9, p. 2252-2255, 1997.

EISSENBURG, L.G.; GOLDMAN, W.E. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, n.4, p.411-421, 1991.

FISMAN, D.N. Hemophagocytic syndromes and infection. **Emerg. Inf. Dis.**, v. 6, p. 601-608, 2000.

FUJIWARA, F.; HIBBI, S.; IMASHUKU, S. Hypercytokinemia and hemophagocytic syndrome. **Am. J. Ped. Hematol. Oncol.**, v.15, p. 92-98, 1993

GUIOT, H.M.; BERTRÁN – PASARELL, J.; TORMOS, L.M.; GONZÁLEZ-KEELAN, C.; PROCOP, G.W.; FRADERA, J.; SÁNCHEZ-SERGENTÓN, C.; MÉNDEZ, W. Ileal perforation and reactive hemophagocytic síndrome in a patient with disseminated histoplasmosis: the role of real-time polymerase chain reaction in the diagnosis and successful treatment with amphotericin B lipid complex. **Diag. Microb. Infect. Dis.**, v. 57, p. 429-433, 2007.

JANKA, G.; IMASHUKU, S.; ELINDER, G.; SCHEIDER, M.; HENTER, J.L. Infection and malignancy-associated hemophagocytic syndromes. Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Hematol. Oncol. Clin. Noth Am.**, v.12, p. 435- 444, 1998.

JANKA, G.; STADT, Z.U. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Hematology (Am. Soc. Hematol. Ed. Program.)**, v.5, p. 82-88, 2005.

LEIMANN, B.C.Q.; PIZZINI, C.V.; MUNIZ, M. M. et al. – Histoplasmosis in a Brazilian center clinical forms and laboratory tests. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.22, p.141-146, 2005.

LEONELLO, P.C. **Componente solúvel de *Histoplasma capsulatum* com atividade de hemaglutinina.** Monografia para conclusão de curso. Universidade Estadual de Londrina, 2007.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.

Mc MAHON, J.P.; WHEAT, J.; SOBEL, M.E.; PASULA, R.; DOWNING, J.F.; MARTIN II, W.J. Murine laminina binds to *Histoplasma capsulatum*: a possible mechanism of dissemination. **J. Clin. Inv.**, v.96, p. 1010-1017, 1995.

OHGA, S.; MAATSUZAKI, A.; NISHIZAKI, M. Inflammatory cytokines in vírus – associated hemophagocytic syndrome: interferon gamma as a sensitive indicator of disease activity. **Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v.15, p. 291-298, 1993.

RACHID, A.; REZENDE, L.S.; MOURA, S.F.; LOFFY, P.C.; MAGALHÃES, F.L.G.M. A case study of disseminated histoplasmosis linked to common variable immunodeficiency. **Braz. J. Inf. Dis.**, v. 7, n. 4, p. 268-272, 2003.

REYES-MONTES, M.D.R.; TAYLOR, M.L.; CURIEL-QUESADA, E.; ARANGO, A.C.M. Current knowledge on the strain typing of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: a review of the findings. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, pp. 121-126, 2000.

SÁ-NUNES, A.; MEDEIROS, A.I.; NICOLETE, R.; FRANTZ, F.G.; PANUNTO-CASTELO, A.; SILVA, C.L.; FACCIOLI, L.H. Efficacy of cell-free antigens in evaluating cell immunity and inducing protection in a murine model of histoplasmosis. **Microb. Inf.**, v. 7, p. 584-592, 2005.

TAYLOR, M.L.; DUARTE-ESCALANTE, E.; PÉREZ, A.; ZENTENO, E.; TORIELLO, C. *Histoplasma capsulatum* yeast cells attach and agglutinate human erythrocytes. **Med. Mycol.** V. 42, p.287-292, 2004.

TRISTÃO, F. S. M. **Caracterização parcial de componentes imunogênicos de *Histoplasma capsulatum***. 2005. 124s. Dissertação apresentada no curso de pós – graduação Mestrado em Patologia experimental da Universidade Estadual de Londrina, 2005.

TSUDA, H. Hemophagocytic syndrome (HPS) in children and adults. **Int. J. Hematol.**, v.65, p. 215-226, 1997.

UNIS, G.; SILVA, V.B. da; SEVERO, L.C. Disseminated histoplasmosis and AIDS. The role of culture médium for the bronchoscopic clinical specimens. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, n.3, p.234-237, 2004a.

UNIS, G.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C. Disseminated histoplasmosis in Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** , v.37, n. 6, p. 463-468, 2004b.

WANG, Z.; DUARTE, A.G.; SCNADIG, J. Fatal reactive hemophagocytosis related to disseminates histoplasmosis with endocarditis: an unusual case diagnosed at autopsy. **South. Med. Assoc.** , v.100, n. 2, p. 208-211, 2006.

WHEAT, L.J.; SAROSI, G. McKINSEY, D. HAMILL, R., BRADSHER, R., JOHNSON, P., LOYD, J. KAUFFMAN, C. Practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis. Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.** , v.30, p. 688-695, 2000.

WHEAT, L.J.; CLOUD, G.; JOHNSON, P.C.; CONNOLLY, P.; GOLDMAN, M.; LE MONTE, A.; FULLER, D.E.; DAVIS, T.E.; HAFNER, R. Clearance of fungal burden during treatment of disseminated histoplasmoses with liposomal amphotericin B versus itraconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, n.8, p.2354-2357, 2001.

WHEAT, L.J.; GARRINGER, T.; BRIZENDINE, E.; CONNOLLY, P. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. **Diagn. Microbiol. Inf. Dis.**, v.43, p. 29-37, 2002.

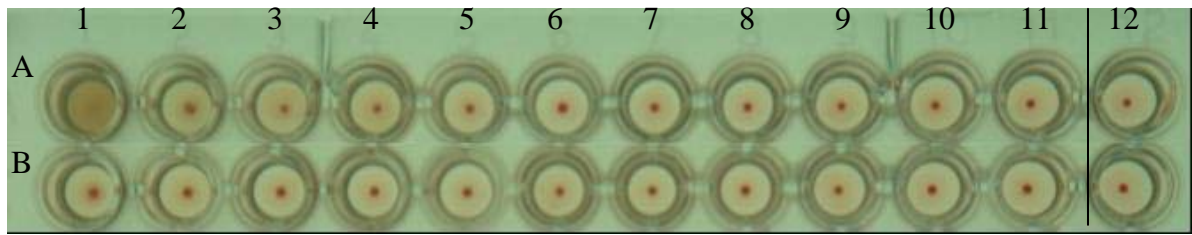


Figura 1 – Resultado de reação de aglutinação com hemácias de camundongos sensibilizadas com CFA de IMT/Hc 128

Em uma microplaca de 96 orifícios (fundo V) foram adicionados 50 μ l /orifício de CFA de IMT/Hc 128 a 4,1 mg/ml, em diluições seriadas (1/2 a 1/1024) (primeira linha de 1 a 11: 1A, 2A, 3A, 4A, 5A,...) e como controle negativo PBS (12A e 12B). Na segunda linha foi utilizado 50 μ l /orifício CFA de IMT/HC 128 previamente incubado com anticorpos anti-Ea-CFA por 1 h a 37 °C (segunda linha de 1 a 11: 1B, 2B, 3B, 4B, 5B,...). A seguir foi adicionada suspensão de hemácias de camundongo BALB/c 1% (50 μ l /orifício). A placa foi incubada a 37 °C por 1 hora.

Tabela 1 – Resultado de análise da atividade hemaglutinante de CFA de IMT/Hc 128 e efeito de aquecimento de CFA de IMT/Hc 128 e de soro imune por reação de hemaglutinação

Amostras analisadas	Atividade hemaglutinante
E-CFA	+
E-PBS	-
E-CFAa	-
CFA/soro imune-E	-
CFA/soro pré-imune-E	+
Soro imune-E	-

E-CFA = incubação de CFA (1/2) com eritrócitos de camundongo (E-CFA); **E-PBS** = incubação de eritrócitos de camundongo com PBS; **E-CFAa** = incubação de CFA (1/2) (préviamente inativado) com eritrócitos de camundongo; **CFA/soro imune-E** = CFA puro pré-incubado com soro imune e a seguir incubado com eritrócitos de camundongo; **CFA/soro pré-imune-E** = CFA puro pré-incubado com soro pré-imune e a seguir incubado com eritrócitos de camundongo. **Soro imune-E** = incubação de soro imune com eritrócitos. Eritrócitos utilizados foram de camundongos BALBc a 1%, CFA de IMT/Hc128 e soro imune = soro anti-Ea-CFA (1/2). **(+)** Resultado positivo de hemaglutinação.
(-) Resultado negativo de hemaglutinação.

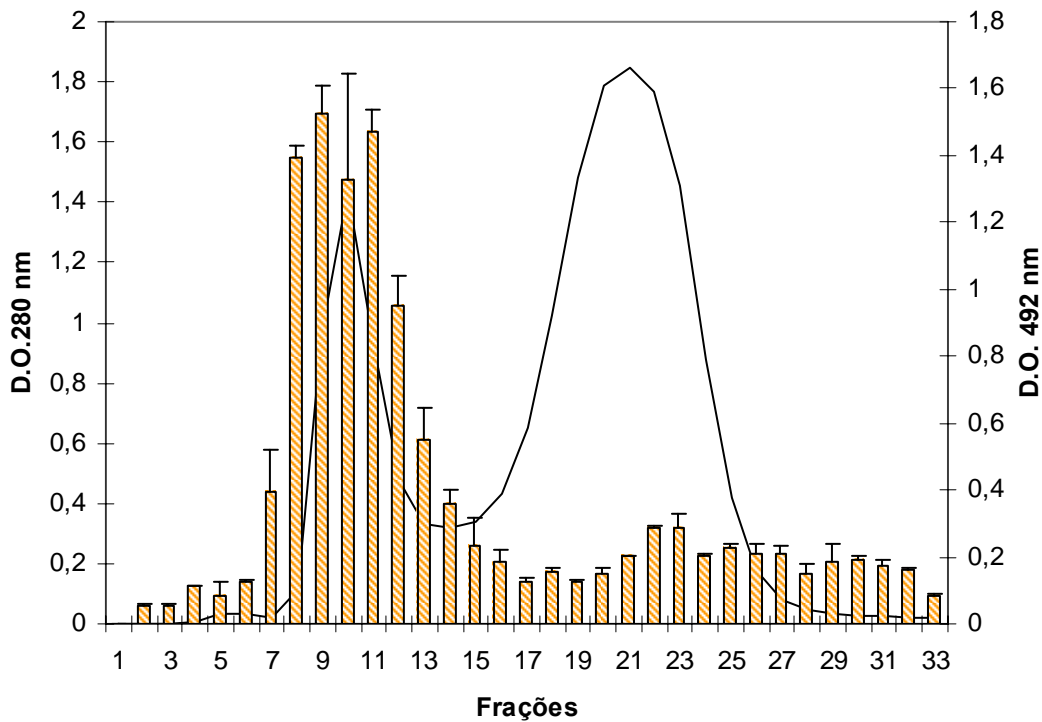


Figura 2 – Fracionamento de CFA de IMT/Hc 128 em coluna *Sephadex G- 75/120* e reatividade das frações cromatográficas de CFA de IMT/Hc 128 com soro anti-Ea-CFA. Amostras de CFA de IMT/Hc 128 foram submetidas à cromatografia de gel filtração em coluna *Sephadex G-75/120*. O perfil espectrofotométrico foi construído com base nos resultados expressos em absorvância a 280nm. O ELISA foi realizado em placas sensibilizadas com as frações de 3 a 33 eluídas em coluna *Sephadex G-75/120*, e incubadas com amostras de soro anti-Ea-CFA. Os resultados foram expressos em absorvância a 492 nm, considerando $p < 0,05$ significativo.

3 a 33 = frações eluídas em coluna *Sephadex G 75/120*.

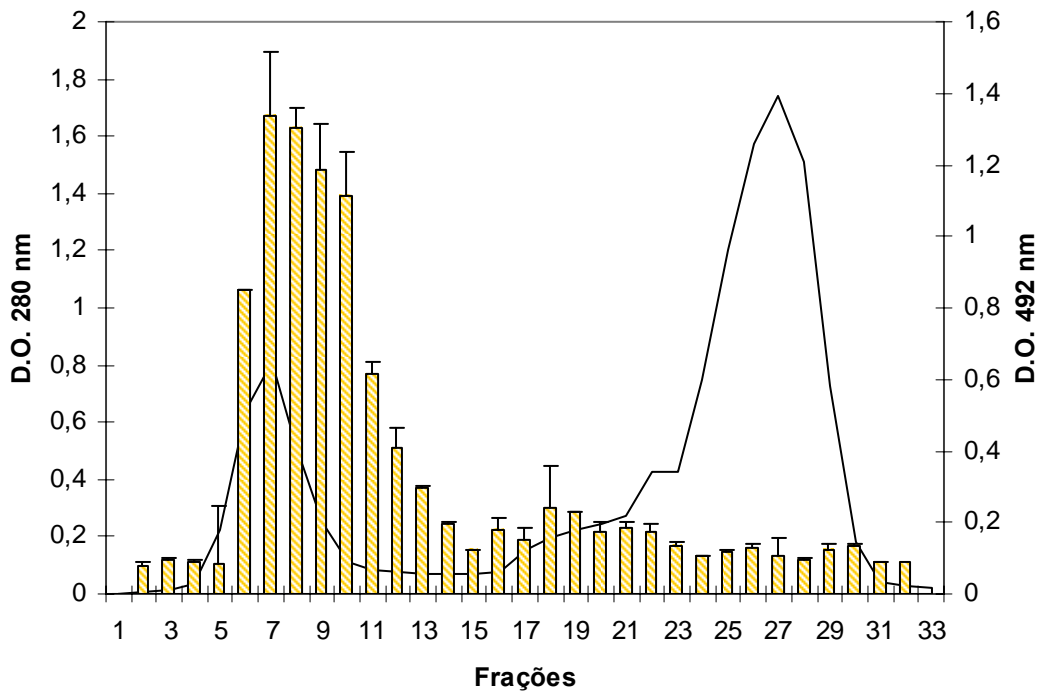


Figura 3 – Fracionamento de CFA de IMT/Hc 128 em coluna *Sephadex* G-200 e reatividade das frações cromatográficas de CFA de IMT/Hc 128 com soro anti-Ea-CFA.

Amostras de CFA de IMT/Hc 128 foram submetidas à cromatografia de gel filtração em coluna *Sephadex* G-200. O perfil espectrofotométrico foi construído com base nos resultados expressos em absorvância a 280nm. O ELISA foi realizado em placas sensibilizadas com as frações de 3 a 33 eluídas em coluna *Sephadex* G-200, e incubadas com amostras de soro anti-Ea-CFA. Os resultados foram expressos em absorvância a 492 nm, considerando $p < 0,05$ significativo.

3 a 33 = frações eluídas em coluna *Sephadex* G-200.

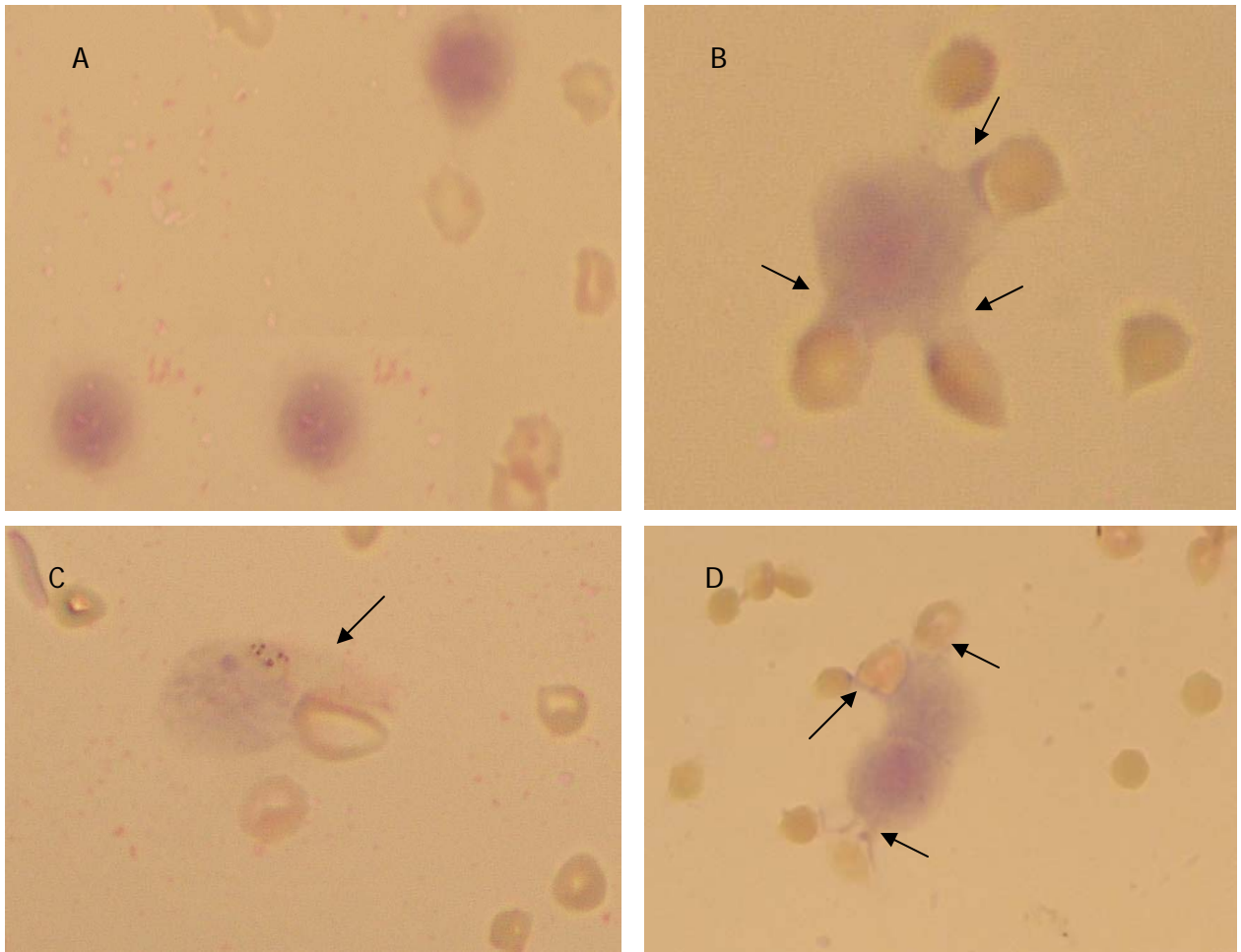


Figura 4 – Hemofagocitose de eritrócitos mediada por CFA de IMT/Hc 128.

A suspensão de hemácia a 1% foi incubada com CFA de IMT/Hc 128 (diluído 1/8 a 1/64) por 1 h a 37 °C, e posteriormente adicionado a lâminas de microscopia contendo 5×10^6 macrófagos. O ensaio foi mantido a 37 °C, em estufa BOD, por 40 minutos. As lâminas foram fixadas com metanol e coradas por hematoxilina eosina (HE) e analisadas por meio de microscopia óptica (1000x). (A) Ausência de hemofagocitose: controle com PBS e (B, C e D) células com hemofagocitose (setas →).