

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PALOMA DA SILVA GOMES LOPES

**Identificação de candidatos vacinais em potencial
para *Trichosporon asahii* por vacinologia reversa**

Alfenas/MG

2018

PALOMA DA SILVA GOMES LOPES

**Identificação de candidatos vacinais em potencial
para *Trichosporon asahii* por vacinologia reversa**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas nível mestrado. Área de concentração: Interação Patógeno - Hospedeiro. Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan. Co-orientador: Prof^o. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Alfenas/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

L864i Lopes, Paloma da Silva Gomes.
Identificação de candidatos vacinais em potencial para *Trichosporon
asahii* por vacinologia reversa. / Paloma da Silva Gomes Lopes. –
Alfenas/MG, 2018.
126 f.: il. --

Orientadora: Ana Carolina B. Padovan.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade
Federal de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. Epitopos. 2. Tricosporonose. 3. Tricosporonose – Prevenção &
controle. I. Padovan, Ana Carolina B. II. Título.

CDD-616.969

FOLHA DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG.
CEP: 37130-001



PALOMA DA SILVA GOMES LOPES

“Identificação de candidatos vacinais em potencial para *Trichosporon asahii* por vacinologia reversa”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Aprovado em: 21 de setembro de 2018.

Profa. Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Patrícia Paiva Corsetti de Almeida
Instituição: UNIFENAS

Assinatura:

Profa. Dra. Livia de Figueiredo Diniz Castro
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Dedico primeiramente a Deus, a minha família e ao meu noivo pelo enorme apoio na execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me iluminado nesses 2 anos de estudo e por ter me dado coragem para enfrentar e continuar seguindo em frente quando a minha jornada estava difícil.

Agradeço à Universidade Federal de Alfenas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas por terem me dado essa oportunidade única na minha vida de acadêmica.

À minha orientadora Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan, por ter me mostrado todo seu conhecimento e fazer com que aprendesse com ele e por ter me concedido a chance de realização dessa pesquisa.

Ao meu co orientador Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, pela enorme contribuição nesta pesquisa.

Ao professor Dr. Nelson José Freitas da Silveira, pela colaboração neste trabalho.

A todos os professores que fazem parte do programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e do Departamento de Microbiologia e Imunologia, por todo conhecimento compartilhado.

Aos meus pais Jair e Roselene, por tudo que eles já fizeram e fazem por mim até hoje, com certeza são meus melhores exemplos de vida e força para continuar até a realização completa de todos os meus objetivos de vida, que com certeza são os deles também.

Ao meu noivo Leandro, pela enorme paciência nesse período e por ter apoiado minhas escolhas.

E a todos meus amigos que tive a oportunidade de conhecer na pós-graduação, principalmente a Vanessa Alexandre Araújo, que era minha amiga antes do início do curso, ao Alexandre Lima e ao Daniel Freitas, que me ajudaram muito durante todo o período da minha formação.

RESUMO

Os membros do gênero *Trichosporon* são leveduras do filo Basidiomycota sendo considerados patógenos oportunistas em pacientes imunocomprometidos. *Trichosporon asahii* já apresenta indícios de resistência à vários antifúngicos e é um dos principais causadores de infecções invasivas em humanos. Apesar de sua importância clínica, ainda não existem vacinas e imunoterapias para prevenir a doença nos principais grupos de risco. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo central identificar potenciais candidatos vacinais para direcionar a produção de imunobiológicos que possam conferir proteção a pacientes, através da tecnologia de vacinologia reversa, na qual não há necessidade de cultivar o microrganismo em laboratório, o que favorece a criação de uma vacina mais rápida. Para isso foram realizadas análises *in silico* utilizando o proteoma predito de *T. asahii* com 8.300 proteínas putativas, depositado no NCBI. Por análises do proteoma nos programas CELLO v.2.5 e PSORT II, 268 proteínas comuns foram preditas como extracelulares. A predição de imunogenicidade das mesmas foi realizada no programa VaxiJen v2.0, no qual foram obtidas 205 proteínas com potencial imunogênico ($score \geq 0.5$). As proteínas selecionadas foram comparadas com o proteoma humano, através do BLASTp-NCBI. Das 205 analisadas, foram selecionadas 137 que não tiveram similaridade com proteínas humanas. Para identificar candidatos vacinais que poderiam induzir proteção cruzada, essas proteínas que não tiveram similaridade com proteínas humanas foram comparadas com as proteínas dos gêneros *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp., através do BLASTp-NCBI. Os resultados indicaram a presença de 82 proteínas com similaridade com as proteínas de *Cryptococcus* spp. e 11 com *Candida* spp. Ao se selecionar aquelas com caracterização funcional e com similaridade e cobertura entre sequências $\geq 50\%$, foi evidenciado que apenas 5 do gênero *Cryptococcus* spp. cumpriram os critérios de seleção. As 44 proteínas restantes que não obtiveram similaridade com nenhum dos gêneros fúngicos similares a *Trichosporon* spp. foram analisadas para identificar candidatos vacinais que poderiam induzir uma proteção somente contra *T. asahii*. O critério de seleção adotado foi analisar apenas proteínas que possuíam caracterização funcional por ontologia gênica com gêneros de fungos que já tiveram seus proteomas anotados, sendo que, das 44 proteínas, apenas 3 possuíam caracterização funcional. A partir disso, as 8 proteínas selecionadas tiveram seus epítomos mapeados através da ferramenta Tepitool para avaliar a capacidade de ligação ao MHC II em células T, sendo que todas as proteínas possuíam epítomos que se ligaram aos alelos HLA do MHC II. Em seguida, todos os epítomos com ligação ao MHC II foram analisados no programa VaxiJen 2.0, para avaliar sua capacidade imunoestimulante, com $score \geq 0.5$. Foram encontrados o mínimo de 20 epítomos imunoestimulatórios para proteção contra *T. asahii* na proteína *Cutinase*, e o máximo de 43 na proteína *Curculin domain protein (mannose-binding) lectin*, e para proteção cruzada, o mínimo de 18 epítomos e um máximo de 54, nas proteínas *Major allergen Asp F2* e *Glioxal oxidase precursor*, respectivamente. Em seguida, foi realizada modelagem molecular das 8 proteínas através do *software* I-TASSER, para facilitar a localização dos epítomos imunogênicos, visualizados em 3D através do *software* VMD. Finalmente, foi realizada a cobertura populacional mundial dos epítomos para avaliar as diferentes especificidades de ligação aos HLA e para selecionar aqueles epítomos com maior cobertura na população humana. Foram selecionados 71 epítomos imunogênicos externos para proteção exclusiva para *T. asahii* e 132, para proteção cruzada de *T. asahii* e *Cryptococcus* spp., com uma taxa de cobertura mundial de 99.98%, indicando que alguns epítomos são ótimos candidatos vacinais para a criação de uma vacina com proteção exclusiva contra *T. asahii* e com proteção cruzada entre o gênero *Cryptococcus* spp. e *T. asahii*, respectivamente.

Palavras-chaves - Vacinologia reversa. *Trichosporon asahii*. Predição de epítomos vacinais, análises de candidatos vacinais *in silico*. Prevenção de infecções invasivas.

ABSTRACT

Members of the *Trichosporon* spp. genus are Basidiomycetous yeasts that have emerged as opportunistic pathogens in immunocompromised patients. *Trichosporon asahii* already displays evidence of resistance against various antifungal agents and is one of the main cause of invasive infections. Despite its clinical importance, there are still no vaccines and immunotherapies to prevent the disease in the main risk groups. Thus, the present study aimed to identify potential vaccine candidates to direct immunobiologicals production that may confer protection in these patients, by using reverse vaccination technology, in which there is no need to cultivate the microorganism in the laboratory, favoring the creation of a vaccine faster. We performed *in silico* analyzes using the predicted proteome of *T. asahii* deposited in NCBI, containing 8.300 putative proteins. The results indicate that 268 proteins were predicted as extracellular by the CELLO v.2.5 and PSORT II programs. By proteome analyzes using the CELLO v.2.5 and PSORT II programs, 268 common proteins were predicted as extracellular. Immunogenicity prediction was performed in the Vaxijen v2.0 program, in which 205 proteins with immunogenic potential (score ≥ 0.5) were obtained. The selected proteins were compared to the human proteome, through BLASTp-NCBI. Of the 205 proteins analyzed, 137 were selected by the criterion of no similarity with human proteins. To identify candidates that could induce cross-protection, these selected proteins were compared with proteins of the *Cryptococcus* spp. and *Candida* spp. genera, by using BLASTp-NCBI. The results indicated the presence of 82 proteins with similarity to the proteins of *Cryptococcus* spp. and 11 with *Candida* spp. Then, we selected proteins that presented functional characterization and similarity and coverage between sequences $\geq 50\%$. It was evidenced that only 5 *Cryptococcus* spp. proteins met the selection criteria. The remaining 4 proteins that did not have any similarity to *Trichosporon* spp. related genera were analyzed to identify vaccine candidates that could induce protection only against *T. asahii*. The selection criterion in this analysis was to select only the proteins that had functional characterization by gene ontology with fungal genera that already had their proteomes annotated, with 48 proteins analyzed, but only 3 with functional characterization. Thus, the 8 selected proteins had their epitopes mapped through the Tepitool software to assess the ability of MHC II binding in T cells, and we detected that all proteins had epitopes that bound to the HLA alleles of MHC II. Next, all MHC II-binding epitopes were analyzed in the VaxiJen 2.0 program to evaluate their immunostimulatory capacity, with cutoff point > 0.5 . We found a minimum of 20 immunostimulatory epitopes for protection against *T. asahii* in cutinase protein, and a maximum of 43 in the Curculin domain (mannose-binding) lectin protein, and for cross-protection, a minimum of 18 epitopes and a maximum of 54, in the Major allergen Asp F2 and Glioxal oxidase precursor proteins, respectively. Then, molecular modeling of the 8 proteins through the I-TASSER software was performed to facilitate the localization of the immunogenic epitopes, visualized in 3D through the VMD software. Finally, the world population coverage of the epitopes was performed to evaluate the different HLA binding specificities and to select those epitopes with greater coverage in the human population. A total of 71 immunogenic epitopes were selected for exclusive protection for *T. asahii* and 132 for cross protection of *T. asahii* and *Cryptococcus* spp., with a global coverage rate of 99.98%, indicating that some epitopes are excellent vaccine candidates for the creation of a vaccine with protection against *T. asahii* and cross-protection between the genus *Cryptococcus* spp. and *T. asahii*, respectively.

Key-words - Reverse vaccinology. *Trichosporon asahii*. Prediction of vaccine epitopes. analyzes *in silico*. Prevention of invasive infections.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fluxograma de realização das etapas do trabalho para obtenção de potenciais epítomos vacinais contra <i>T. asahii</i>	33
Figura 2 -	Diagrama de Venn mostrando as proteínas preditas como extracelulares e/ou secretadas nos programas CELLO v.2.5 e PSORT II.....	39
Figura 3 -	Predição de antigenicidade das proteínas preditas como extracelulares nos programas CELLO e PSORT II. As proteínas que tiveram a mesma predição de localização extracelular nos programas CELLO e PSORT II foram submetidas a uma análise de imunogenicidade no servidor VaxiJen v.2.0. A linha pontilhada evidencia o ponto de corte (<i>cut off</i>) para seleção de proteínas imunogênicas para fungos ($\geq 0,5$).....	40
Figura 4 -	Modelos 3D das estruturas proteicas para proteção cruzada com destaque das porções N-terminal e C-terminal destacadas em verde. A e B. <i>Major allergen Asp F2</i> , C e D. <i>Alpha-1,3-glucanase</i> , E e F. <i>Glyoxal oxidase precursor</i> , G e H. <i>Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98</i> e I e J. <i>Glycoprotein</i> . Em magenta: α -hélices, em amarelo: folhas β -pregueadas, em azul: regiões que não foram modeladas por completo.....	72
Figura 5 -	Modelos 3D das 3 estruturas proteicas para proteção exclusiva contra <i>T. asahii</i> , com destaque das porções N terminal e C terminal destacadas em verde. A e B. <i>Curculin domain protein (mannose-binding) lectin</i> , C e D. <i>Cutinase</i> e E e F. <i>Beta-1,3-mannanase</i> . Em magenta: α -hélices, em amarelo: folhas β -pregueadas, em azul: regiões que não foram modelados por completo.....	73
Figura 6 -	Fluxograma de realização das etapas do trabalho com os resultados obtidos para predição dos potenciais epítomos vacinais.....	86
Quadro 1 -	Quadro 1 - Vacinas fúngicas universais experimentais em desenvolvimento..	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Mapeamento dos epítomos imunogênicos nos modelos proteicos tridimensionais.....	41
Tabela 2 -	Similaridade entre 137 proteínas de <i>T. asahii</i> e proteínas dos expressas por leveduras dos gêneros <i>Cryptococcus</i> spp. e <i>Candida</i> spp.....	47
Tabela 3 -	Proteínas com cobertura e identidade com o gênero <i>Cryptococcus</i> spp. \geq 50%.....	51
Tabela 4 -	As 48 proteínas ausentes de similaridade com as proteínas dos gêneros <i>Cryptococcus</i> spp. e <i>Candida</i> spp. e com proteínas humanas (<i>Homo sapiens</i>).....	52
Tabela 5 -	Predição do número de epítomos das 8 proteínas selecionadas para proteção cruzada entre <i>T. asahii</i> e o gênero <i>Cryptococcus</i> spp. e proteção exclusiva contra <i>T. asahii</i>	54
Tabela 6 -	Predição dos epítomos imunogênicos que se ligaram aos alelos do MHC II.....	56
Tabela 7 -	Resultados da análise no PSI-BLAST para a busca de <i>templates</i> para modelagem por homologia.....	68
Tabela 8 -	Parâmetros dos modelos ranqueados pelo <i>software</i> I-TASSER para as 8 proteínas.....	69
Tabela 9 -	Mapeamento dos epítomos imunogênicos nos modelos proteicos tridimensionais.....	75

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

CAZy -	<i>Carbohydrate-Active enZYmes Datse</i>
CBS -	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CEs -	Células epiteliais
CIMs -	Concentrações inibitórias mínimas
CLRs -	Receptores de lectina
DCs -	Células dendríticas
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
GM-CSF -	Macrófago Granulócito - Fator estimulador de colônia
GXM -	Glucoronoxilomana
HIV -	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA -	Antígeno Leucocitário Humano
IFN- γ -	Interferon gama
IL -	Interleucina
KNN -	<i>k-nearest-neighbor</i>
MANs -	β -mananases de ação final
M-CSF -	Fator de estimulação de colônias de macrófagos
MHC -	Complexo de histocompatibilidade maior
NCBI -	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NETs -	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NK -	Células Natural <i>Killer</i>
PAMPs -	Padrões moleculares associados aos patógenos
PDB -	<i>Protein data bank</i>

PRRs -	Receptores de reconhecimentos padrões
PSORT II -	Programa de predição da localização subcelular
ROS -	Espécies reativas de oxigênio
SVM -	Máquina de vetores de suporte
TGF -	Fator transformador de crescimento
TLRs -	Receptores tipo <i>TOOL</i>
TNF- α -	Fator de necrose tumoral
VMD -	<i>Visual molecular dynamics</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	GENERALIDADES DE <i>TRICHOSPORON</i> SPP.....	16
2.2	INFECÇÕES CAUSADAS PELO GÊNERO <i>TRICHOSPORON</i> SPP....	17
2.3	FATORES ASSOCIADOS A VIRULÊNCIA.....	18
2.4	SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS E TERAPÊUTICA.....	19
2.5	IMUNIDADE CONTRA FUNGOS.....	21
2.6	IMUNIDADE CONTRA <i>TRICHOSPORON</i> SPP.....	25
2.7	UTILIZAÇÃO DE VACINAS NA PREVENÇÃO DE INFECÇÕES FÚNGICAS.....	26
2.8	VACINOLOGIA REVERSA CONTRA FUNGOS COMO PREVENÇÃO.....	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	OBTENÇÃO DO PROTEOMA PREDITO DE <i>TRICHOSPORON ASAHII</i> A PARTIR DE GENOMA TOTAL DEPOSITADO EM BANCO DE DADOS.....	34
4.2	PREDIÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS..	34
4.3	IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM POTENCIAL ANTIGÊNICO.....	35
4.4	COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS COM O PROTEOMA HUMANO.....	35
4.5	COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS COM PROTEÍNAS DAS ESPÉCIES: <i>CRYPTOCOCCUS</i> SPP. E <i>CANDIDA</i> SPP.....	36
4.6	MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS DE LIGAÇÃO AO MHC II.....	36
4.7	MODELAGEM MOLECULAR DAS PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA E PELO MÉTODO <i>THREADING</i>	37
4.8	VISUALIZAÇÃO DOS MODELOS EM 3D E LOCALIZAÇÃO DOS EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS.....	38
4.9	COBERTURA POPULACIONAL DOS ALELOS	38

5	RESULTADOS	39
5.1	BUSCAS POR PROTEÍNAS EXTRACELULARES E/OU SECRETADAS NO PROTEOMA PREDITO DE <i>T. ASAHII</i>	39
5.2	PREDIÇÃO DE PROTEÍNAS COM POTENCIAL IMUNOGÊNICO....	40
5.3	PREDIÇÃO DE PROTEÍNAS QUE NÃO POSSUÍAM SIMILARIDADE COM PROTEÍNAS HUMANAS.....	41
5.4	BUSCA POR PROTEÍNAS COM SIMILARIDADE COM PROTEÍNAS DOS GÊNEROS DE LEVEDURAS <i>CRYPTOCOCCUS</i> SPP. E <i>CANDIDA</i> SPP.....	46
5.5	SELEÇÕES DAS PROTEÍNAS COM SIMILARIDADE COM GÊNEROS <i>CRYPTOCOCCUS</i> SPP. E <i>CANDIDA</i> SPP.....	50
5.6	SELEÇÃO DAS PROTEÍNAS QUE NÃO OBTIVERAM SIMILARIDADE COM PROTEÍNAS DOS GÊNEROS <i>CRYPTOCOCCUS</i> SPP. E <i>CANDIDA</i> SPP.....	52
5.7	MAPEAMENTO DOS EPÍTOPOS DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS.....	53
5.8	ANÁLISE DOS EPÍTOPOS COM LIGAÇÃO AO MHC II NO VAXIJEN V2.0.....	54
5.9	MODELAGEM MOLECULAR PROTEICA.....	68
5.10	VISUALIZAÇÃO E MAPEAMENTO DOS EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS DOS MODELOS PROTEICOS.....	70
5.11	ANÁLISE DA COBERTURA POPULACIONAL DOS ALELOS QUE TIVERAM LIGAÇÃO COM OS EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS.....	84
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÕES	98
	REFERÊNCIAS	99
	APÊNDICES	116

1 INTRODUÇÃO

Os membros do gênero *Trichosporon* são leveduras do filo Basidiomycota, que encontram-se amplamente distribuídos na natureza e, em humanos, fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal e pele (COLOMBO et al., 2011; WALSH et al., 2004).

Nas últimas décadas, o gênero vem emergindo como patógeno oportunista, causando infecções invasivas em pacientes imunocomprometidos, sendo que o tratamento antifúngico de amplo espectro e a quebra das barreiras anatômicas são fatores que aumentam a colonização da mucosa e infecção invasiva subsequente, nas quais a taxa de mortalidade pode alcançar 80%. Nesse tipo de infecção, *Trichosporon asahii* é a principal espécie isolada (COLOMBO et al., 2011; DI BONAVENTURA et al., 2006; RICHARDSON; LASSFLÖRL, 2008).

Dentre 11.240 isolados clínicos coletados ao longo de 10,5 anos, *Trichosporon* spp. foi o terceiro agente não-*Candida* mais frequentemente isolado em amostras, representando 10,6% dos isolados (Pfaller et al., 2009).

A maioria das infecções disseminadas causadas pelas espécies do gênero *Trichosporon* spp. são relatadas em pacientes imunocomprometidos com neutropenia grave, geralmente com doença hematológica maligna, representando cerca de 10% de todos os casos confirmados de micoses disseminadas, nos quais a infecção progride rapidamente, podendo ocorrer falência múltipla de órgãos, como pulmões, rins e baço, com lesões cutâneas sendo os sinais de infecção disseminada (KONTOYIANNIS et al., 2004; ROJAS; MAGDALENA, 2004).

Trichosporon asahii vem exibindo sensibilidade diferencial aos antifúngicos, sendo reportadas elevadas concentrações inibitórias mínimas para fluconazol e anfotericina B. Dentre os tratamentos disponíveis para infecções invasivas, voriconazol é o fármaco de escolha. Contudo, isto torna o custo do tratamento muito elevado e muitas vezes, o paciente permanece recebendo fármacos menos eficientes contra *Trichosporon* spp. (ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014).

Como alternativa na prevenção de infecções invasivas causadas por fungos emergentes, é possível propor a utilização de vacinas desenvolvidas através da tecnologia de vacinologia reversa. Para tal, são realizados estudos *in silico*, geralmente de proteínas que estejam presentes na superfície celular, já que estas estão envolvidas com vários tipos de interações com o meio, como por exemplo: célula-célula e/ou célula-hospedeiro. Estas proteínas podem possuir

epítomos que poderão ativar a resposta imune do hospedeiro (RAHMAN ANSARI; RAGHAVA, 2010).

Com o objetivo de realizar a predição de potenciais candidatos vacinais para *Trichosporon asahii*, este trabalho utilizou a tecnologia de vacinologia reversa a qual utiliza a genômica e proteômica *in silico* para identificação de potenciais candidatos vacinais que possam ser utilizados no desenvolvimento de alternativas aplicadas na prevenção das tricosporonoses invasivas (FLOWER et al., 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura deste estudo está fundamentada em várias generalidades do gênero *Trichosporon* spp., como: tipos de infecções, fatores associados a virulência, sensibilidade aos antifúngicos e terapêutica, imunidade contra fungos, utilização de vacinas na prevenção de infecções fúngicas e vacinologia reversa contra fungos como prevenção.

2.1. GENERALIDADES DE *TRICHOSPORON* SPP.

Trichosporon spp. podem ser isolados de diversos ambientes naturais, tanto em áreas de temperaturas tropicais, como também, em áreas temperadas, sendo encontrados em solo, madeira em decomposição, rios, mares, lagos, aves e mamíferos. Em humanos, fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal e oral, podendo transitoriamente colonizar o trato respiratório e a pele (CAFARCHIA et al., 2008; MARINÉ et al., 2015; SILVA-BEDOYA et al., 2014; WHITMAN et al., 2014).

Os fungos pertencentes ao gênero *Trichosporon* são considerados pleomórficos pela capacidade de formar blastoconídios, micélios e artroconídios, que são resultado da desarticulação das hifas que são formas que causam infecções invasivas, quando isso ocorre, essas estruturas se disseminam pelo ambiente, podendo causar infecções (CHAGAS-NETO et al., 2008; COLOMBO et al., 2011).

Os microrganismos do gênero *Trichosporon* crescem em ágar Sabouraud, na temperatura entre 30 e 35 °C, no qual formam colônias que variam do branco ao bege, estas possuem superfícies de aspectos cerebriformes e radiais. Os membros deste gênero não são capazes de fermentar carboidratos, mas conseguem degradar uréia (CHAGAS-NETO et al., 2008; DE HOOGS et al., 2000).

Após recente classificação taxonômica, o gênero está composto por 12 espécies, sendo 9 consideradas patogênicas. Dentre as infecções, *T. asahii* é considerada a espécie mais virulenta por ser a principal responsável por causar tricosporonoses invasivas em indivíduos imunocomprometidos causando alta mortalidade (BONAVENTURA et al., 2006; LIU et al., 2015).

Chagas-Neto e colaboradores (2009) avaliaram 22 casos de fungemia por espécies de *Trichosporon* spp., dos quais 44% ocorreram em pacientes pediátricos que apresentaram taxa

de mortalidade de 30%. Os isolados foram identificados como *T. asahii* (15), *T. asteroides* (5), *T. coremiiforme* (1) e *T. dermatis* (1) (CHAGAS-NETO et al., 2009).

Já Ruan e colaboradores (2009) também realizaram estudo retrospectivo com 43 casos de tricosporonose, sendo as espécies isoladas, de sangue, urina, ferida cirúrgica e escarro e foram identificadas como: *T. asahii* em 32 casos, *T. dermatis* em 5, *T. montevidense* em 2 e *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. faecale* e *T. ovoides* em um cada (RUAN et al., 2009).

2.2 INFECÇÕES CAUSADAS PELO GÊNERO *TRICHOSPORON* SPP.

As infecções por esse gênero podem apresentar várias manifestações clínicas, desde acometimento cutâneo superficial até quadros sépticos graves em pacientes imunocomprometidos. Desde o primeiro caso de infecção disseminada em paciente com leucemia no ano de 1970, vários casos são relatados anualmente (AGIRBASLI et al., 2008; CHAGAS-NETO; CHAVES; COLOMBO, 2008; FAGUNDES-JÚNIOR et al., 2008).

Trichosporon spp. eram mais conhecidos como agentes de infecções superficiais em unhas (onicomicoses), pêlos e cabelos (*Piedra Branca*), que é caracterizada pela presença de nódulos irregulares nos fios do cabelo afetado, sendo uma doença que afeta principalmente crianças e mulheres adultas de áreas de climas tropicais e temperados (GROL; WALSH, 2001; SUGITA et al., 1995).

Um outro tipo de manifestação clínica causada por *T. asahii* está ligada ao acometimento do sistema respiratório por uma grande sensibilização do sistema imunológico, sendo esta infecção sazonal e relatada principalmente no verão do Japão, cujo clima é quente e úmido no oeste e sul do país, favorecendo o desenvolvimento e disseminação do fungo no ambiente (ANDO et al., 1995; SUGITA et al., 2004).

O primeiro contato com os antígenos de *Trichosporon* spp. com o sistema respiratório estimula uma resposta imune do tipo celular (células T) e humoral (formação de imunocomplexos), com predominância de elevados títulos de imunoglobulinas IgA e IgG. Estes anticorpos podem favorecer o desenvolvimento de uma hipersensibilidade do tipo III ou IV, causando diretamente uma pneumonia mediada por hipersensibilidade. Este processo inicia-se com a inalação dos artroconídios do fungo pelo hospedeiro, e as exposições recorrentes ao fungo, mantém o mecanismo de defesa do hospedeiro sempre ativado, o que colabora para o

desenvolvimento da hipersensibilidade que atua de forma deletéria no tecido pulmonar (ANDO et al., 1995; COLOMBO et al., 2011; SUGITA et al., 2004).

Nas últimas décadas, diversos fatores que podem desfavorecer o sistema imunológico dos pacientes acometidos, como o aumento de doenças degenerativas, transplantes de órgãos, uso de imunossupressores, quimioterapia, e uso indiscriminado de antibióticos favorece a relação entre o gênero *Trichosporon* vem e a sua classificação como patógeno oportunista emergente, *T. asahii* é conhecido como o principal causador de infecções invasivas nesses pacientes imunocomprometidos (ARNALDO et al., 2003; GROL; WALSH, 2001; TUON et al., 2007; WALSH et al., 2004).

Dentre as infecções causadas pelo gênero *Trichosporon*, a invasiva que é causada principalmente por *T. asahii* é a mais grave e foi relatada como a segunda infecção fúngica mais comum nos seres humanos, sendo que *T. asahii* é o segundo agente não *Candida* spp., presente neste tipo de infecção (KREMERY et al., 1999; WALSH et al., 2004).

As tricosporonoses assemelham-se às candidíases tanto no aspecto histopatológico que incluem: máculas, pápulas, pústulas, nódulos e celulite, que podem estar localizados nos membros ou em toda a superfície do corpo, quanto nas manifestações clínico-sintomatológicas, como: endoftalmite, endocardite, abscessos cerebrais, meningite, artrite, esofagite, linfadenopatia, abscessos, infecções hepáticas, esplênicas e uterinas (CAWLEY et al., 2000; JIAN et al., 2008).

2.3 FATORES ASSOCIADOS A VIRULÊNCIA

Os fungos possuem vários fatores de virulência que permitem a penetração e o estabelecimento destes no organismo do hospedeiro, como: transição morfológica, aderência em superfícies por meio de adesinas, componentes da parede celular, produção e secreção de enzimas líticas e formação de biofilmes (COLOMBO et al., 2011).

Para *Trichosporon* spp. são observados alguns destes fatores de virulência. De acordo com um estudo realizado por Fonseca e colaboradores (2009), *T. asahii* produz glicoronoxilomana (GXM), um polissacarídeo que é expresso na parede celular do fungo, que possui semelhança antigênica e bioquímica com a GXM produzida para formar cápsulas de *Cryptococcus neoformans*. Neste estudo foram analisados os aspectos estruturais e funcionais

da GXM produzida por *T. asahii* comparando-a com as propriedades da GXM de *C. neoformans*. Os autores incorporaram GXM de *T. asahii* em mutantes acapsulares de *C. neoformans*, fazendo com que estes se tornassem mais resistentes à fagocitose por macrófagos murinos, o que evidencia que a GXM da parede celular de *T. asahii* age de forma semelhante a GXM da cápsula de *C. neoformans* (FONSECA et al., 2009).

A produção de enzimas líticas como proteinases, fosfolipases, lipases, hemolisinas e DNAses, atuam permitindo aos fungos retirada de vários componentes nutricionais do ambiente, além de clivar proteínas e destruírem as membranas da parede celular dos hospedeiros humanos, contribuindo para a patogenicidade de *Trichosporon* spp.. No trabalho de Sun e colaboradores (2012), foi verificado que 23 isolados de *T. asahii* não produziam proteinases e lipases mas eram capazes de secretar hemolisinas. Este achado é importante, pois mostra que *Trichosporon* spp., enquanto gênero emergente, possui mecanismos de patogenicidade adaptados ao hospedeiro humano (BENTUBO; GOMPERTZ, 2014; COLOMBO et al., 2011; GHANNOUM, 2000; SUN et al., 2012).

A formação de biofilmes fúngicos em cateteres venosos chama a atenção, pois estes contribuem para o estabelecimento de infecções invasivas, promovendo o escape do sistema imunológico, pois impede a fagocitose, conferindo maior resistência aos antifúngicos utilizados (COLOMBO et al., 2011).

Segundo estudo realizado por Iturrieta-Gonzalez e seus colaboradores (2014), com 54 isolados clínicos pertencentes ao gênero *Trichosporon*, foi observada alta produção de biofilmes por diferentes espécies, com quantificações semelhantes ou superiores aquelas do gênero *Candida* spp.. Além disso, foi relatado que *Trichosporon* spp. produziram biofilmes mais robustos do que outros basidiomicetos, como *Rhodotorula* spp. e *Cryptococcus* spp. Foi verificado ainda que esses biofilmes possuíam CIMs dos fármacos testados até 1000 vezes maiores do que as células nas formas planctônicas (ITURRIETA-GONZALEZ et al., 2014; MARTINEZ; CASADEVALL, 2007; MELO et al., 2011; NUNES et al., 2013).

2.4 SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS E TERAPÊUTICA

Os medicamentos disponíveis para o controle e eliminação de leveduras tanto nas infecções superficiais, como nas infecções invasivas, são limitados, pois existem poucas classes terapêuticas disponíveis, sendo representadas por: polienos (anfotericina B), azólicos

(fluconazol, itaconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol e ravuconazol) e equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulanfungina) (FERA et al., 2009).

O prognóstico das infecções fúngicas causadas pelas espécies de *Trichosporon* spp. é péssimo, visto que mais de três quartos dos pacientes acometidos morrem. Sendo que os isolados de *T. asahii* muitas vezes são resistentes *in vitro* à anfotericina B, sendo o tratamento com antifúngicos azóis e triazóis indicado (BAYRAMOGLU et al., 2008).

Dentre estas classes, os azólicos são aqueles que apresentam melhor atividade e menor toxicidade, contra infecções causadas por *Trichosporon* spp. no qual, o mecanismo de ação é a inibição da biossíntese do ergosterol, componente indispensável na formação e manutenção da permeabilidade da membrana plasmática. Esses medicamentos ligam-se as enzimas do citocromo P450 dos fungos, inibindo a desmetilação do lanosterol, molécula precursora do ergosterol (FOSTER et al., 2017; HAZIROLAN et al., 2013; SIM et al., 2016).

Visto isso, os fármacos da classe dos azólicos estão sendo muito utilizados para estudo de avaliação antifúngica contra *Trichosporon* spp. *in vitro*. Em estudo realizado por Rodriguez-Tudela e colaboradores (2005), no qual foi avaliada a sensibilidade *in vitro* de 49 isolados de *Trichosporon* spp., foi visto que a maior parte dos isolados como os de *T. asahii*, *T. faecale* e *T. coremiiforme* apresentaram resistência a anfotericina B. Os agentes azólicos foram eficientes contra a maioria das cepas, apresentando menores concentração inibitória mínima (CIMs), sendo que deste grupo, o composto mais ativo foi voriconazol (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005).

Um outro estudo que também avaliou a sensibilidade de *T. asahii* aos antifúngicos, foi realizado por Iturrieta-Gonzalez e colaboradores (2014), no qual verificou-se que os isolados de *T. asahii* exibiram CIMs mais elevadas para fluconazol, itaconazol e anfotericina B, do que os isolados não-*T. asahii*. E ainda, menores CIMs foram observadas para o voriconazol, sendo este fármaco proposto como o de escolha para tratar infecções causadas por *Trichosporon* spp. (ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014).

Na clínica, também é observada baixa resposta de tratamentos com anfotericina e melhores desfechos clínicos com uso de fluconazol. Hoy e colaboradores (1986) observaram que somente 26% dos 19 pacientes neutropênicos com tricosporonoses invasivas tratados com anfotericina B sobreviveram (HOY et al., 1986).

Da mesma forma, Girmenia e colaboradores (2005) relataram que dos 55 pacientes portadores de doenças hematológicas com tricosporonoses que foram tratados com Anfotericina B, apenas 24% tiveram recuperação clínica (GIRMENIA et al., 2005). Quando fluconazol foi utilizado no tratamento de 16 pacientes com tricosporonose invasiva, foi observada uma taxa de mortalidade de 42% (RUAN; CHIEN; HSUEH, 2009).

Já Suzuki e colaboradores (2010) observaram que a sobrevida dos pacientes com doenças hematológicas malignas que desenvolveram tricosporonemia, quando tratados com fluconazol, foi maior do que aqueles tratados com outros fármacos (SUZUKI et al., 2010).

As terapêuticas utilizadas podem ser eficazes quando a infecção é detectada na fase inicial, sendo assim o diagnóstico precoce é um fator de grande importância para o sucesso na cura de pacientes com tricosporonose. Mas infelizmente, as dificuldades na identificação desses microrganismos fazem com que os tratamentos sejam tardios, sendo que muitas vezes o diagnóstico é realizado pós-morte (MORETTI-BRANCHINI et al., 2001).

2.5 IMUNIDADE CONTRA FUNGOS

Pouco se sabe sobre a imunidade inata e adquirida contra *Trichosporon* spp. Devido a escassez de conhecimento da resposta imune para este patógeno, será abordado neste tópico a resposta imune contra fungos, principalmente os mecanismos que foram descritos para fungos que compartilham dos nichos de infecção com *Trichosporon* spp.

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra microrganismos causadores de infecções. Os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) estão presentes nas células que fazem parte da resposta imune inata, as quais por meio dos PRRs realizam o reconhecimento dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). A sinalização de um dos PRRs ativa respostas celulares e mecanismos de morte, auxiliando também a resposta adaptativa (WÜTHRICH et al., 2012).

O início de uma resposta imunológica, ocorre a partir do reconhecimento de partes do patógeno pelos PRRs do hospedeiro, que irão conduzir os mecanismos de proteção para a defesa. Existem várias famílias de PRRs que são classificadas com base na sua filogenia, estrutura e função. Os receptores do tipo *toll* (TLRs) e os receptores de lectina tipo C (CLRs) são as famílias mais importantes que estão envolvidas na imunidade contra fungos. As respostas celulares que dependem de TLRs que promovem a imunidade antifúngica incluem a produção

de interferons do tipo I (IFNs) (e citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12 (GLOCKER et al., 2009; BOURGEOIS et al., 2011; RAMIREZ-ORTIZ et al., 2008).

A Dectina 1 é a uma CLR antifúngica que reconhece os β -glucanos expostos (Brown e Gordon 2001) nas paredes de fungos patogênicos, tais como *C. albicans*, *A. fumigatus* e *Pneumocystis carinii* (Drummond e Brown 2011). Esta sinalização leva a fagocitose, produção de citocinas, explosão respiratória e ativação de inflamassomas (DRUMMOND et al., 2011; HARDISON; BROWN, 2012).

O reconhecimento inato e as funções da dectina 1 têm consequências funcionais significativas para a imunidade antifúngica *in vivo*. Camundongos com deficiência neste receptor apresentam maior mortalidade quando foram infectados com *C. albicans* e *A. fumigatus*. Os membros da família dectina 2 têm um domínio de reconhecimento de carboidratos, que demonstraram se ligar a uma série de espécies de fungos incluindo *C. albicans*, *P. brasiliensis*, *A. fumigatus* e *Malassezia* (TAYLOR et al., 2007; WERNER et al., 2009; KERSCHER et al., 2013; ISHIKAWA et al., 2013).

A grande predominância de fungos no ambiente resulta em exposição humana contínua. Estima-se que ocorre a inalação de centenas de esporos de *Aspergillus fumigatus* por dia. Além disso, os seres humanos também possuem colonizações de fungos comensais, em suas microbiotas como por exemplo, *Candida albicans* e *Trichosporon* spp.. Por esta razão, o sistema imune inato é equipado para reconhecer as partículas de fungos e manter relacionamentos de caráter benéfico, mas também podem destruir os fungos oportunistas que se tornam patogênicos, devido ao estado dos hospedeiros, quando ocorre exposição aos mesmos (RIVERA et al., 2011; ILIEV et al., 2012; CHO; MATSUKURA; SUGITA, 2015).

As células predominantes na defesa imune inata contra fungos são: neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs) e células naturais *killer* (NK). Os neutrófilos são células polimorfonucleares granulocíticas fagocíticas. O mecanismo clássico utilizado pelos neutrófilos é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que matam organismos fagocitados quando os grânulos se fundem com o fagossoma. Os mecanismos não-oxidativos incluem a liberação de enzimas de degradação específicas de neutrófilos, elastase e catepsina G, que demonstraram ser não efetivas na imunidade contra *A. fumigatus* (Tkalcevic et al., 2000). Outros métodos utilizados incluem a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), que são redes constituídas por DNA, histonas e proteínas antimicrobianas (BYRD et al., 2013).

Porém os neutrófilos podem desempenhar papéis prejudiciais durante a infecção por fungos. No trabalho de Mednick e seus colaboradores, foi demonstrado que os animais com um baixo número de neutrófilos sobreviveram mais tempo e tiveram menores infecções pulmonares por *C. neoformans*. Entretanto, em seres humanos, sabe-se que os neutrófilos são extremamente importantes para a defesa do mesmo. Estudos evidenciam que a redução no número de neutrófilos circulantes é um fator de alto risco para o desenvolvimento de uma candidíase invasiva, por exemplo (MEDNICK et al., 2003; BYRD et al., 2013).

Os monócitos são células do sangue que se diferenciam em macrófagos nos tecidos. Uma vez nos tecidos, os macrófagos são ativados pelas citocinas pró-inflamatórias, particularmente o interferon gama (IFN- γ). Esta citocina induz a diferenciação do macrófago no clássico fenótipo ativado (M1), enquanto as citocinas anti-inflamatórias como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) direcionam os macrófagos para o fenótipo alternativo (M2) (MOSSER, EDWARDS, 2008).

Tanto o fenótipo M1 ou M2 possuem efeito importante na imunidade antifúngica. No estudo de criptococose pulmonar experimental (causada por *C. neoformans*), a susceptibilidade está associada a fenótipos M2, sendo que as cepas protetoras de vacina induzem células M1 que se correlacionaram com as taxas de sobrevivência aumentadas para desafios letais subsequentes (Hardison et al., 2012). Também foi descrito que os macrófagos são capazes de realizar alternância entre os fenótipos M1 / M2, o que foi importante na proteção contra infecção *Paracoccidioides brasiliensis* (FERIOTTI et al., 2013).

As DCs são importantes na geração de imunidade adaptativa através de apresentação de antígenos. Estudos mostraram que o uso de leveduras não patogênicas e complexos que visam os receptores antifúngicos inatos expressos por DCs podem induzir imunidade antifúngica efetiva. No entanto, é necessário entender quais subtipos de DCs são necessários para a proteção antifúngica e os mecanismos envolvidos. Foi sugerido que as células dendríticas plasmocitóides (pDCs), consideradas inicialmente como células antivirais, podem ter um papel protetor diante dos fungos pulmonares. Já em um estudo *in vitro* que correlacionou a toxicidade e as respostas protetoras de citocinas contra fungos por pDCs foi visto que os animais com deficiência de pDCs foram sensíveis à aspergilose invasiva (KIFLMARIAM et al., 2013; RAMIREZ-ORTIZ et al., 2011; CARTER et al., 2006; LIPINSKI et al., 2013).

As células NK são conhecidas por suas propriedades antivirais e tumorais, para as quais foram identificadas pela primeira vez. Tanto em modelo animal quanto nos seres humanos já

foram descritas que as células NK, podem exercer atividade antifúngica contra uma gama de fungos incluindo: *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans*, *Pneumocystis* spp. e *P. brasiliensis*. Estas células NK exercem efeito através da morte direta do microorganismo usando perforina, matando células hospedeiras infectadas e secretando citocinas pró-inflamatórias (SCHMIDT et al., 2013b; ISLAM et al., 2013; KELLY et al., 2013; LONGHI et al., 2012).

Apesar da grande importância da imunidade inata, a imunidade às infecções fúngicas é tradicionalmente considerada no âmbito das respostas imunes adaptativas, particularmente devido à incidência de doenças fúngicas em pacientes com HIV, pneumocistites, candidíase oral e meningite criptocócica (Glocker e Grimbacher 2010). Este conceito foi reforçado pela descoberta de que a citocina IL-17 é crítica para imunidade a infecções fúngicas, particularmente a candidíase mucosa (HUPPLER et al., 2012).

A imunidade adaptativa mediada por anticorpos contra patógenos fúngicos tem sido relatada na literatura com frequência. Em um estudo foi visto que anticorpos anti-IgM contra polissacarídeos fúngicos aumentaram o reconhecimento dos antígenos fúngicos mediado por DCs, o desenvolvimento das respostas Th2 e Th17 (CASADEVALL et al., 2012; RAPAKA et al., 2010).

A opsonização dependente de anticorpos e a ativação do complemento maximizam a cura das doenças fúngicas em modelos animais. Geralmente os seres humanos que possuem defeitos na imunidade humoral não são mais suscetíveis a doenças fúngicas. Porém, os anticorpos que atuam como protetores específicos contra fungos estão sendo muito pesquisados para atuarem na prevenção de infecções fúngicas (CASADEVALL et al., 2012).

No estudo de Hung e colaboradores (2011) foi evidenciado que a imunidade relacionada a vacina contra fungos dimórficos depende essencialmente das células Th17 que irão facilitar a eliminação dos patógenos pelos fagócitos mononucleares e neutrófilos. Além disso, outros autores, desenvolveram vacinas que protegem contra infecções experimentais com fungos patogênicos tais como *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (WÜTHRICH et al., 2000; XUE et al., 2009; WÜTHRICH et al., 2003).

Foi visto que camundongos *knockout* para receptor A da IL-17 (Il17ra - / -) são suscetíveis a infecção por *Candida albicans* devido à infiltração reduzida de neutrófilos nos órgãos infectados. Da mesma forma, com uma deficiência de células Th17 em camundongos IL23p19 - / - e Il17ra - / - os mesmos exibem candidíase orofaríngea grave, enquanto os

camundongos IL-12 - / - deficientes em células Th1 apresentam carga e nenhuma doença evidente. A IL-17 também promove a defesa do hospedeiro contra infecção pulmonar primária por *Pneumocystis carinii*, *H. capsulatum* e *Aspergillus fumigatus* (HUANG; FIDEL, 2004; WERNER et al., 2009; CONTI et al., 2009; DEEP; GIBBONS, 2009; RUDNER et al., 2007).

2.6 IMUNIDADE CONTRA *TRICHOSPORON* SPP.

Do gênero *Trichosporon* a espécie *T. asahii* é a principal causa de infecções invasivas em pacientes imunocomprometidos, mas pouco se sabe sobre a resposta imune do hospedeiro contra esse patógeno. Sabe-se que os macrófagos alveolares presentes nos pulmões fagocitam e destroem os conídios inalados, impedindo a germinação das hifas, enquanto leucócitos e monócitos, que são fagócitos circulantes vão para o sítio da infecção, onde eles participam dos mecanismos de defesa do hospedeiro (SASAKI et al., 2000).

O trabalho de Cong e colaboradores (2015) foi o primeiro a investigar o perfil transcricional de monócitos humanos em resposta à infecção por *T. asahii*. Neste trabalho foram identificados 1315 genes expressos precocemente por células THP-1 utilizando microarray de cDNA. Os genes mais expressos nas células THP-1 em resposta à *T. asahii* foram aqueles que codificam citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1b, IL-18 e IL-23 a. Sendo TNF- α uma das principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas na resposta imune inata e na regulação da respsta imune adaptativa e considerando o papel desta citocina no recrutamento de células inflamatórias para locais de infecção, a expressão gênica induzida de TNF- α em células THP-1 podem ser benéfica para o recrutamento precoce de células inflamatórias nas infecções causadas por *T. asahii* (CONG et al., 2015).

O sistema imunológico inato é capaz de reconhecer os PAMPs dos microorganismos pelos PRRs, tais como TLRs 2, 4 e dectina 1 que são os principais PRRs envolvidos no reconhecimento dos fungos. No estudo de Cong e colaboradores (2015), não houve expressão diferencial significativa de genes que codificam TLRs e dectina 1. No entanto, a expressão de genes de outros tipos de PRRs foram encontrados regulados positivamente tais como molécula de adesão intercelular específica de célula dendrítica 3 - nonintegrin-grabing (DC-SIGN), CD36 e pentraxina 3 (PTX3). Porém o papel destes PRRs na interação entre *T. asahii* e os fagócitos não foi investigado, embora tenha sido demonstrado que estes receptores estão

envolvidos no reconhecimento e resistência contra outras infecções por fungos (SERRANO-GOMEZ et al., 2004; GARLANDA et al., 2002).

Vários microrganismos patogênicos podem induzir a apoptose de fagócitos. A expressão de genes que estão relacionados à apoptose refletem um equilíbrio entre os mecanismos apoptóticos e anti-apoptóticos nas interações entre os fagócitos e os fungos. Porém, durante a infecção por *T. asahii* foi identificado a maioria dos genes que tiveram a sua expressão reduzida não possuíam envolvimento na resposta imune do hospedeiro e sim estavam associados ao ciclo celular, mitose, divisão celular e reparo do DNA (ROTSTEIN et al., 2000; CONG et al., 2015).

Em um outro estudo foi demonstrado por Sasaki e seus colaboradores (2000) que os monócitos periféricos humanos e macrófagos peritoneais de modelo animal não possuem atividade fungicida contra *T. asahii*. Porém foi visto que a atividade de eliminação dessas células pode ser estimulada pelo fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF) em camundongos com tricosporonose disseminada. O M-CSF agiu causando um aumento na produção de superóxidos e citocinas, favorecendo desta forma a eliminação dos microrganismos pelos macrófagos maduros e monócitos. Sendo assim o M-CSF pode ser útil como complemento da terapia antimicrobiana convencional e profilaxia de infecções disseminadas causadas por *T. asahii* (SASAKI et al., 2000).

O TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 são as principais citocinas da imunidade inata que são produzidas por fagócitos mononucleares ativados por fungos. Essas citocinas estimulam as propriedades de morte celular contra os microrganismos patogênicos (WARREN, 1986; MOTOYOSHI, 1998).

O TNF- α aumenta a quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos, e também aumenta a respiração oxidativa de neutrófilos aumentando assim sua atividade fungicida. Além disso, pode também estimular células NK que podem exibir alguns efeitos antifúngicos diretos e produzir TNF- α , IFN- γ e GM-CSF, maximizando os efeitos antifúngicos dos neutrófilos e macrófagos (FERRANTE et al., 1988).

2.7 UTILIZAÇÃO DE VACINAS NA PREVENÇÃO DE INFECÇÕES FÚNGICAS

As vacinas que podem ser utilizadas na prevenção de doenças de caráter infeccioso foram uma conquista muito importante na área de saúde pública nos últimos tempos. Sabe-se

que a prevalência de infecções fúngicas sistêmicas no mundo vem estimulando cada dia mais o possível desenvolvimento de vacinas antifúngicas (CUTLER et al., 2007; FELDMESSER, 2005; PULENDRAN; SEDER, 2005).

Além da maioria dos indivíduos com infecções fúngicas disseminadas serem imunocomprometidos, portanto, incapazes de montar respostas completas a uma vacina, existem vários outros obstáculos que dificultam o desenvolvimento de uma vacina antifúngica. Contudo, a vacina contra fungos pode ser considerada para os indivíduos imunocompetentes, mas que possuam a possibilidade de uma imunossupressão grave no futuro, como por exemplo: pessoas que aguardam transplante de órgãos e aqueles com infecção aguda pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LEVITZ; GOLENBOCK, 2012).

Para que uma vacina antifúngica seja eficiente, essa deve ter como objetivo gerar respostas imunes que levem à memória imunológica, proteção contra uma exposição recorrente aos fungos, seus conídios e esporos e não gere doença. Nos últimos anos, vários candidatos vacinais foram testados contra alguns patógenos fúngicos, tais como *C. albicans*, *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., *Blastomyces* spp., *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix* spp. (NANJAPPA; KLEIN, 2014; IANNITTI et al., 2012).

Uma estratégia ótima para vacinas fúngicas contra múltiplos fungos é o uso de antígenos compartilhados por gêneros de vários fungos importantes. Pode-se citar por exemplo, o componente principal da parede celular de fungos: o β -1,3-D-glucano. Apesar desta glicana ter baixo potencial imunogênico foi visto no estudo de Torosantucci e colaboradores (2005) que camundongos imunizados com laminarina de β -1,3-D-glucano conjugada com toxina de difteria foram capazes de induzir uma elevada produção de anticorpos, os quais conferiram proteção contra candidíase, aspergilose e criptococose (TOROSANTUCCI et al., 2005).

Outros estudos neste campo incluíram a utilização de um antígeno antifagocítico da cápsula de *C. neoformans*, o glucuronoxilomannana (GXM) como candidato vacinal. Como o GXM mostrou baixa imunogenicidade e natureza independente de células T, o que não é apropriado para a vacinação de pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV), a vacina foi conjugada com a toxina de tétano gerando níveis de anticorpos anti-GXM específicos em camundongos. Embora o problema da imunogenicidade foi resolvido, quando administrado em camundongos, com a vacina não houve a produção de anticorpos protetores (CASADEVALL; PIROFSKI, 2005; DATTA; PIROFSKI, 2006; DEVI et al., 1991; DEVI, 1996).

Uma estratégia que utilizou cepa atenuada de *Cryptococcus neoformans* protegeu com sucesso os camundongos deficientes em células T CD4⁺. Essas descobertas são muito importantes no desenvolvimento de vacinas que protejam indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e outras deficiências de células T CD4⁺. Um cuidado a ser tomado quanto ao uso de vacinas vivas é que os fungos devem ser suficientemente atenuados para não causar doenças, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (WOZNIAK et al., 2011).

Visto isso, as vacinas desenvolvidas contra *Cryptococcus* spp., precisam ser eficientes principalmente em pacientes com deficiência grave de células T, como pacientes com HIV. Com base no fato de que alguns *Cryptococcus* spp. podem causar doenças tanto em pacientes imunocomprometidos quanto em hospedeiros imunocompetentes, uma vacina que possa prevenir a doença recorrente e a forma aguda é a solução ideal (DATTA, PIROFSKI, 2006; SPELLBERG, 2011).

As estratégias abordadas para *C. albicans* incluem o uso de uma vacina utilizando uma cepa viva atenuada e o uso de componentes da parede celular em modelos murinos. Essas vacinas mostraram-se eficientes, mas não foram testados em seres humanos (SAVILLE et al., 2009; EDWARDS JR., 2012; CASSONE, 2014).

As doenças causadas por fungos ameaçam a vida principalmente de pessoas com imunodeficiências primárias e adquiridas. Está ocorrendo um rápido progresso na área de pesquisa em imunoterapia para explorar esta abordagem no tratamento de doenças fúngicas. Porém, há um grande desafio para os próximos anos, que será de testar o uso de imunoterapia para doenças fúngicas em testes clínicos (ARMSTRONG-JAMES et al., 2017).

Apesar desses fatores, diversas pesquisas para o desenvolvimento de vacinas contra fungos estão sendo realizadas. O Quadro 1 resume os principais alvos investigados para produção de vacinas contra fungos, discriminando a fonte, o patógeno alvo e o tipo de resposta imunológica identificada:

Quadro 1 - Vacinas fúngicas universais experimentais em desenvolvimento.

Vacina/Antígeno	Fonte	Patógeno alvo	Resposta protetora	Referências
Laminarina	Conjugado B-glucano de algas marrons (Laminaria), com toxina da difteria CRM197	<i>Candida</i> e <i>Aspergillus</i> spp.	Anticorpos inibidores de crescimento fúngico	(Torosantucci <i>et al.</i> , 2005). (Bromuro <i>et al.</i> , 2010).
P10-FliC proteína de fusão	P10 de <i>P. brasiliensis</i> e FliC flagelina De <i>Salmonella enterica</i> .	<i>P. brasiliensis</i>	Proteção Th1-dependente	(Braga <i>et al.</i> , 2009).
HSP65 DNA	Derivado de <i>Mycobacterium leprae</i>	<i>P. brasiliensis</i>	Proteção Th1-dependente	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2010).
rAls3p-N*	N-terminal de <i>C. albicans</i> adesina Als3p	<i>Candida albicans</i> e múltiplos isolados de <i>S. aureus</i>	Atividade de neutrófilos mediados por IFN- γ / IL-17A	(Baquir <i>et al.</i> , 2010). (Lin <i>et al.</i> , 2009). (Spellberg 2011).
Crfl	Glucanase de parede celular de <i>A. fumigatus</i>	<i>Candida</i> e <i>Aspergillus</i> spp.	Proteção Th1 dependente	(Stuehler <i>et al.</i> 2011).
Fba Frutose-bifosfato aldolase	Proteína de parede de <i>C. albicans</i>	Múltiplas cepas de <i>C. albicans</i>	Anticorpos específicos anti-Fba	(Xin e Cutler 2011).
rHyr1p-N	Proteína de superfície celular Hyr1 de <i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i> e não <i>albicans</i>	Anticorpos neutralizantes anti-Hyr1p	(Luo <i>et al.</i> , 2011).
Extrato de proteínas associadas a parede celular e citoplasmático	<i>Cryptococcus gattii</i>	<i>C. gattii</i>	Respostas próinflamatórias e citocinas perfil Th1	(Chaturvedi <i>et al.</i> , 2014).
Peptídeo P10	<i>P. brasiliensis</i>	<i>P. brasiliensis</i>	Aumento na produção de óxido nítrico por macrófagos e níveis elevados de IFN- γ , IL-1b e IL-12	(Muoz <i>et al.</i> , 2014).
Glicuronoxilomanana	Antígeno de GXM	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Resposta Th1 IL-2, IL-12, TNF e IFN- γ	(Wager e Wormley 2015).
Beta-1-3-Glucana	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	Th1 e Th 17	(Specht <i>et al.</i> , 2015).
Sap 2 recombinante	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Anticorpos protetores contra infecções sistêmicas e nas mucosas	(Vecchiarelli <i>et al.</i> ., 2012 e Shahid, 2016).
Glicosilceramida Glicosíngolipídica (GlcCer)	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	Impedimento da disseminação dos fungos	(Mor <i>et al.</i> ., 2016).

*Concluída a primeira fase do ensaio clínico e entrada em ensaio clínico de segunda fase.

Fonte: Da autora.

2.8 VACINOLOGIA REVERSA CONTRA FUNGOS COMO PREVENÇÃO

As infecções fúngicas oportunistas apresentam sérios riscos para a saúde humana, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Os antifúngicos convencionais que são o tratamento principal dessas infecções estão cada vez mais limitados pelo crescente isolamento de cepas resistentes (HAMAD, 2008; CUENCA-ESTRELLA et al., 2008).

Tradicionalmente, várias vacinas têm sido desenvolvidas através do isolamento de um ou mais componentes antigênicos de um determinado patógeno e verificando se estes componentes são capazes de induzir resposta imune protetora. Apesar desta abordagem ter apresentado uma série de sucessos no decorrer da história da vacinologia, o conhecimento gerado com as novas tecnologias genômicas, transcriptômicas e proteômicas tem contribuído para o avanço da vacinologia e produção de vacinas mais efetivas e seguras. A revolução no desenvolvimento de vacinas a partir de técnicas genômicas começou em meados da década de 90 no século passado, com avanços na tecnologia de sequenciamento e análises de bioinformática (FLEISCHMANN et al., 1995).

Uma das abordagens mais promissoras é o uso de ferramentas computacionais que permitem a identificação de genes que codificam proteínas com potencial antigênico no genoma de diferentes patógenos. Esta abordagem, denominada de vacinologia reversa é consequência direta das novas tecnologias “ômicas” e é atualmente reconhecida como uma técnica promissora para a determinação teórica de proteínas ou peptídeos que possuem potencial para indução de uma resposta imune, reduzindo desta forma o tempo e o custo do desenvolvimento de novas vacinas (BRUNO et al., 2015; HEINSON; WOELK; NEWELL, 2015; LILJEROOS et al., 2015).

Com o uso da tecnologia de vacinologia reversa não há necessidade de cultivar os microrganismos em laboratório, realizando predições de potenciais candidatos vacinais específicos do patógeno, evitando identificar nas buscas epítomos que possam gerar autoimunidade para então, testá-los em animais (FLOWER et al., 2010).

Para fungos é importante considerar que vários fatores complicam o desenvolvimento de vacinas, pois estes possuem uma composição genética complexa, sendo capazes de alterar o morfotipo e o perfil antigênico que atuam como fatores de virulência, promovendo o escape da resposta imunológica e contribuindo para o aparecimento de cepas mutantes. Outro fator importante é que os fungos exibem uma grande semelhança molecular com as células humanas.

Isso pode restringir o número de antígenos fúngicos que poderiam ser possíveis candidatos vacinais, o que gera um agravante, já que muitos fungos comensais podem se tornar oportunistas, com a administração de uma vacina. Por exemplo, uma vacina contra *C. albicans* poderia alterar a relação assintomática e muitas vezes benéfica na microbiota vaginal e intestinal e com o hospedeiro (HAMAD, 2012).

Apesar da terapia convencional não cair em desuso, em breve, o uso de vacinas poderia fazer com que menores doses de antifúngicos fossem administradas em curtos períodos de tempo, sendo assim, mais eficaz e menos prejudicial para os pacientes (RINALDI, 1997).

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo estão demonstrados nos itens 3.1 e 3.2.

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar potenciais candidatos vacinais para *Trichosporon asahii*, por vacinologia reversa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para identificação e seleção de candidatos vacinais em potencial para *T. asahii*, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Identificar potenciais proteínas extracelulares e ou secretadas pela célula fúngica com capacidade imunoestimulante, a partir da análise do proteoma predito de *Trichosporon asahii*;
- b) Selecionar proteínas que não apresentem similaridade com proteínas de outros fungos e com proteínas humanas para identificar epítomos lineares de células T com proteção exclusiva para *T. asahii*;
- c) Selecionar proteínas que apresentem similaridade com proteínas conhecidas de *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. para identificar epítomos lineares de células T que possam conferir imunidade cruzada para esses dois gêneros além de *T. asahii*;
- d) Realizar modelagem molecular das proteínas selecionadas e localizar os epítomos identificados nos modelos tridimensionais gerados;
- e) Realizar a análise de cobertura populacional mundial para HLA (Antígeno Leucocitário Humano) para selecionar proteínas/epítomos com maior potencial vacinal e com maior cobertura populacional para proposição de candidatos vacinais contra *T. asahii* e proteção cruzada para levedura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os métodos utilizados neste trabalho foram baseados em programas para manipulação e análise de sequências proteicas. As predições seguiram as etapas apresentadas no fluxograma abaixo:

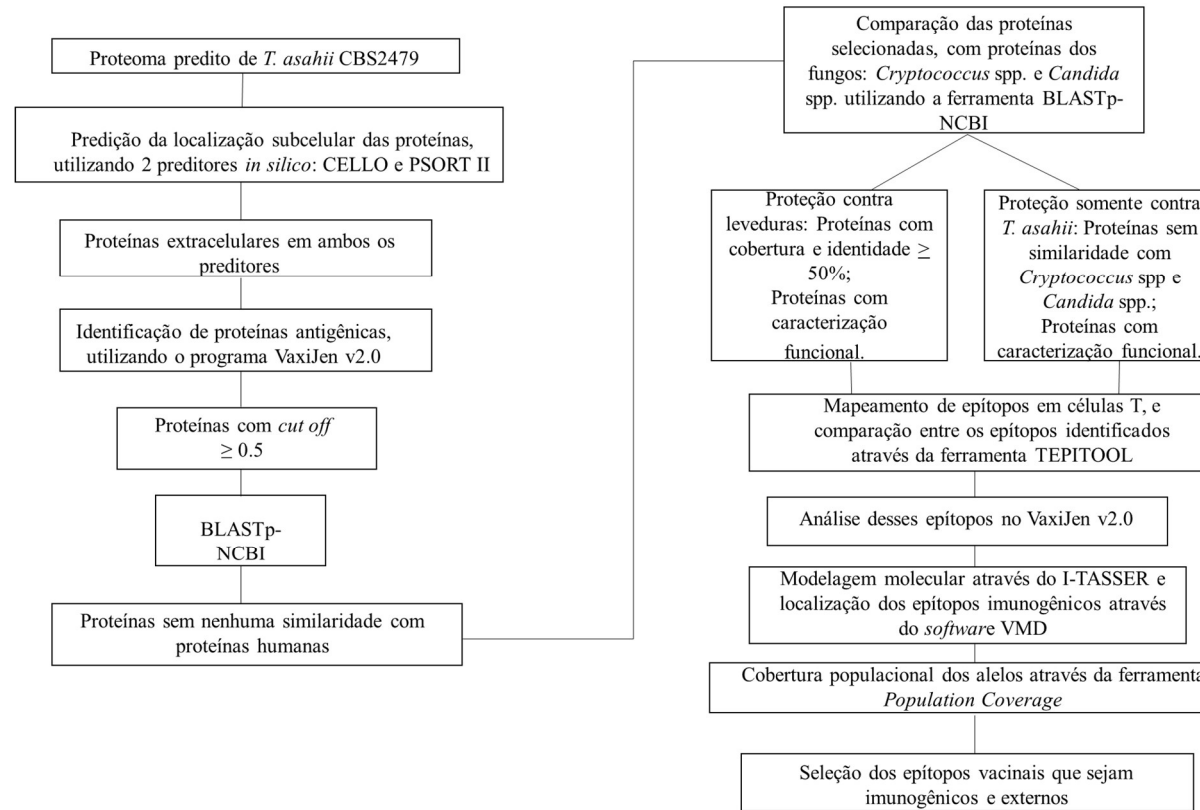


Figura 1 - Fluxograma de realização das etapas do trabalho para obtenção de potenciais epítomos vacinais contra *T. asahii*.

Fonte: Da autora.

4.1 OBTENÇÃO DO PROTEOMA PREDITO DE *TRICHOSPORON ASAHII* A PARTIR DE GENOMA TOTAL DEPOSITADO EM BANCO DE DADOS

A partir de um isolado de um paciente com lesão de psoríase progressiva identificado por Guého em 1997, o genoma total da cepa clínica de *T. asahii* (CBS2479) foi sequenciado e depositado no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Trichosporon+asahii+CBS2479>). Para a obtenção do proteoma predito de *T. asahii* CBS2479, foi realizado um *download* deste arquivo em formato FASTA (formato padrão usado na Bioinformática que representa sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos para serem usadas em softwares), o qual contém sequências proteicas preditas a partir do genoma total de *T. asahii* (YANG et al., 2012).

4.2 PREDIÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS

A função das proteínas está intimamente relacionada com a sua localização subcelular, portanto, a capacidade de se predizer esta localização é útil para inferir determinadas funções quando estudadas proteínas desconhecidas. Para isso, afim de se selecionar apenas proteínas preditas como extracelulares, o proteoma predito de *T. asahii* CBS2479 foi analisado em dois preditores *in silico* de localização subcelular, sendo estes: CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) e PSORT II (<http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/psort2.pl>) (SU et al., 2006; NAKAI; KANEHISA, 1991).

A escolha de dois preditores para esta análise foi estabelecida para se ter uma maior confiabilidade dos resultados, já que os programas utilizam algoritmos e parâmetros de análises diferentes. O preditor CELLO V.2.5 utiliza um algoritmo chamado de máquina de vetores de suporte (SVM) em 2 níveis, com cálculos de vetores e conjuntos de probabilidades de localização subcelular baseada em características da sequência particular da proteína, enquanto que o PSORT II utiliza o algoritmo denominado *k-nearest-neighbor* (knn), o qual compara estatisticamente as características de um conjunto de proteínas de treinamento (sequências proteicas com localização conhecidas), e a proteína de interesse (SU et al., 2006; NAKAI; KANEHISA, 1991).

Desta forma, a partir de duas predições coincidentes da proteína como extracelular/superfície celular, as proteínas foram selecionadas e submetidas às próximas análises.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM POTENCIAL ANTIGÊNICO

Para uma proteína ser considerada um candidato vacinal, ela precisa possuir potencial imunogênico, ou seja, gerar algum tipo de resposta imunológica. Assim, para a predição de proteínas que possam ser caracterizadas como antígenos, empregou-se o programa VaxiJen v2.0 (www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html). Esse preditor avalia a capacidade imunoestimulante de proteínas independente da realização de alinhamento da sequência alvo com antígenos protetores. O preditor foi desenvolvido para permitir a classificação do antígeno exclusivamente com base nas propriedades físico-químicas das proteínas sem recorrer ao alinhamento da sequência. O limiar determinado para identificação de proteínas com potencial imunoestimulante nos organismos fúngicos é 0.5, pois de acordo com os autores do programa, este valor indicou uma maior precisão, sensibilidade e especificidade, quanto as análises realizadas para validação (DOYTCHINOVA; FLOWER, 2008). Portanto, as proteínas que obtiveram um limiar ≥ 0.5 foram selecionadas para as análises posteriores.

4.4 COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS COM O PROTEOMA HUMANO

As proteínas selecionadas na predição anterior foram comparadas como proteoma humano, *Homo sapiens* (tax id 9606), para descartar os antígenos preditos que poderiam induzir reações de auto-imunidade. Para esta comparação foi empregada a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTp-NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul *et al* , 1990). Nesta análise, foram selecionadas para a próxima etapa somente as proteínas que não possuíam qualquer similaridade com proteínas humanas.

4.5 COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS COM PROTEÍNAS DAS ESPÉCIES: *CRYPTOCOCCUS* SPP. E *CANDIDA* SPP.

As proteínas selecionadas que não possuíam qualquer similaridade com as proteínas humanas foram comparadas com as proteínas de *Cryptococcus* spp. (tax id 5206) e *Candida* spp. (tax id 5475) utilizando a ferramenta BLASTp-NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para a produção de uma vacina com potencial proteção somente contra *T. asahii*, foram estabelecidos dois critérios de seleção descritos a seguir: (i) as proteínas não deveriam possuir qualquer similaridade com proteínas de *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp; (ii) possuir caracterização funcional predita.

Para a produção de uma vacina com potencial proteção cruzada para os três gêneros, *Trichosporon* spp., *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp., foram também estabelecidos dois critérios de seleção descritos a seguir: (i) as proteínas deveriam possuir cobertura e identidade $\geq 50\%$ com as proteínas de *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp., (ii) e possuir caracterização funcional.

4.6 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS DE LIGAÇÃO AO MHC II

As proteínas selecionadas até aqui passaram pela predição de ligação dos seus respectivos epítopos aos alelos do MHC II, sendo os peptídeos fixados em 15 resíduos para as previsões de ligação ao MHC de classe II. Para isso foi utilizada a ferramenta TepiTool, disponível no site *Immune Epitope Database* (IEDB; <http://tools.iedb.org/tepitool/>) (PAUL et al., 2016). A ferramenta TepiTool implementou algoritmos de previsão disponíveis para centenas de alelos de diferentes espécies, incluindo humanos, chimpanzés, bovinos, gorilas, macacos, camundongos e porcos. A partir dessa predição, os peptídeos que tiveram ligação com os alelos do MHC II, foram analisados no programa VaxiJen v2.0, para confirmar se estes eram realmente imunogênicos.

4.7 MODELAGEM MOLECULAR DAS PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA E PELO MÉTODO *THREADING*

Tanto as proteínas com proteção exclusiva para *T. asahii*, quanto as proteínas de proteção cruzada com *Cryptococcus* spp., passaram pela etapa de modelagem molecular, pois sabe-se que a modelagem molecular das proteínas é útil para visualizar-se a possível estrutura atômica tridimensional (3D), facilitando sua caracterização funcional e a predição de suas interações com ligantes ou com outras moléculas de proteínas (ZHANG, 2008).

Para a realização da modelagem molecular por homologia foi realizada a busca por *templates* (sequências proteicas similares ou homólogas com predição de estrutura conhecida) para as proteínas fúngicas selecionadas através da ferramenta PSI-BLAST do NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&RUN_PSIBLAST=on) (ALTSCHUL et al., 1990). Para serem utilizadas como *templates* na modelagem comparativa, as sequências deveriam atender ao critério de possuir uma cobertura $\geq 40\%$. Estas proteínas foram então, obtidas da biblioteca do *Protein data bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), através do número de acesso fornecido pelo PSI-BLAST, para serem os *templates* na modelagem comparativa pelo programa MODELLER (WEBB; SALI, 2016). Esta análise foi realizada nos computadores do Laboratório de Modelagem Molecular, sob coordenação e colaboração do Prof. Dr. Nelson José Freitas da Silveira.

Para as proteínas que não possuíam *templates*, ou seja, proteínas que não possuíam nenhuma proteína homóloga ou com identidade/similaridade muito baixas, foi utilizado o *software* I-TASSER na modelagem molecular. Este programa calcula modelos tridimensionais das proteínas pelo método *threading* (método intermediário entre o comparativo e o *ab initio*). Para gerar os modelos proteicos em 3D, o programa realiza a recuperação de segmentos moldes e geração *ab initio* das regiões faltantes das proteínas, gerando 5 modelos ordenados pelos valores *C-score* e *TM-score*. A confiança de cada modelo gerado pelo I-TASSER é medida pelo *C-score* que está na faixa de -5 a 2, de modo que um *C-score* de maior valor significa um modelo com maior confiança e vice-versa. Já a acurácia do modelo é vista através do *TM-score*, no qual os valores variam de 0,0 a 0,17 mostrando que a similaridade estrutural é ao acaso, enquanto os valores que variam de 0,5 a 1,0 são indicativos de uma correta topologia do modelo em relação a proteína alvo, o *software* está disponível em (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010).

4.8 VISUALIZAÇÃO DOS MODELOS EM 3D E LOCALIZAÇÃO DOS EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS

A visualização dos modelos proteicos em formato 3D foi realizada pelo *software* gráfico *Visual molecular dynamics* VMD versão 1.9.3, através dos arquivos no formato PDF fornecidos pelo *software* I-TASSER na etapa anterior.

Através deste mesmo *software* foi realizada a localização dos epítopos preditos como imunogênicos no programa VaxiJen v.2.0 nos modelos de proteínas 3D, para avaliar se estes estavam externos ou internos em relação a estrutura do modelo proteico.

Para a execução deste *software* foi realizado um *download* no link: (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) em computador de uso doméstico.

4.9 COBERTURA POPULACIONAL DOS ALELOS

Sabe-se que as moléculas de HLA são extremamente polimórficas, tendo sido mais de mil variantes alélicas diferentes já descritas. Os alelos HLA específicos são expressos com diferentes frequências em diferentes etnias.

Para avaliar a cobertura populacional dos epítopos imunogênicos, foi realizada uma análise dos alelos que tiveram ligação aos epítopos, através da ferramenta *Population Coverage*, que está disponível em IEBD (<http://tools.iedb.org/population/>). Esta ferramenta calcula a fração de indivíduos previstos para responder a um dado epítipo ou epítipo definido com base nas frequências genótípicas de HLA e com base na ligação de MHC (BUI et al., 2006).

5 RESULTADOS

5.1 BUSCAS POR PROTEÍNAS EXTRACELULARES E/OU SECRETADAS NO PROTEOMA PREDITO DE *T. ASAHII*

Foram utilizados os preditores *in silico* CELLO e PSORT II (Su *et al.* , 2006 e Nakai e Kanehisa, 1991) para a detecção de proteínas extracelulares e ou secretadas por *T. asahii*. Foi evidenciado que das 8.300 proteínas putativas, 610 (7,35 % do proteoma total) poderiam ser extracelulares e/ou secretadas pelo preditor CELLO e 462 (5,57% do proteoma total) poderiam ser localizadas nos mesmos compartimentos celulares conforme os resultados obtidos no predito PSORT II. Das proteínas preditas como extracelulares e/ou secretadas, 268 (3,22 % do proteoma total) obtiveram o mesmo resultado de predição em ambos preditores (Figura 2, e apêndice A), sendo estas selecionadas para as análises posteriores. As proteínas restantes, 342 (43%) do CELLO e as 194 (24,7%) do PSORT II, foram preditas em outros compartimentos celulares, como: núcleo, mitocôndria, vacúolo, citoplasma, aparelho de Golgi, entre outros.

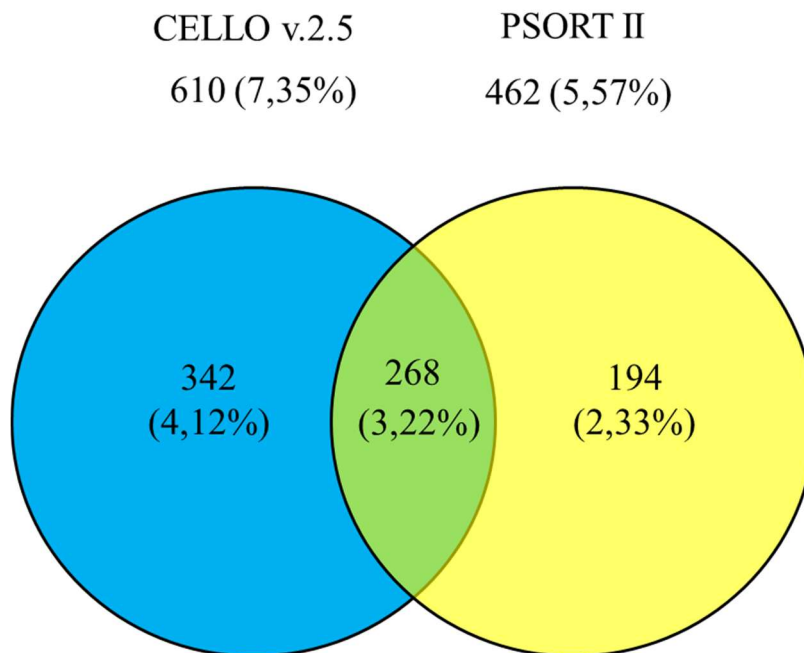


Figura 2 - Diagrama de Venn mostrando as proteínas preditas como extracelulares e/ou secretadas nos programas CELLO v.2.5 e PSORT II.

Fonte: Da autora.

5.2 PREDIÇÃO DE PROTEÍNAS COM POTENCIAL IMUNOGÊNICO

As 268 proteínas selecionadas na etapa anterior foram analisadas, em seguida, no programa VaxiJen v2.0 (Doytchinova e Flower, 2008). Aquelas com *cut off* $\geq 0,5$ foram consideradas imunogênicas e foram selecionadas e para a próxima análise. Nossos resultados mostram que das 268 proteínas preditas como extracelulares, 205 delas (78,25%) foram preditas com potencial imunogênico (Figura 3, e apêndice B).

Os resultados obtidos nesta etapa mostram uma grande variação no valor determinado pelo servidor VaxiJen v.2.0. O valor mínimo encontrado no VaxiJen v.2.0, foi da proteína (XP_014177757.1) que apresentou um valor de -0.42 e o valor máximo foi da proteína (XP_014176505.1) com o valor de 1.398 para potencial imunogêncio.

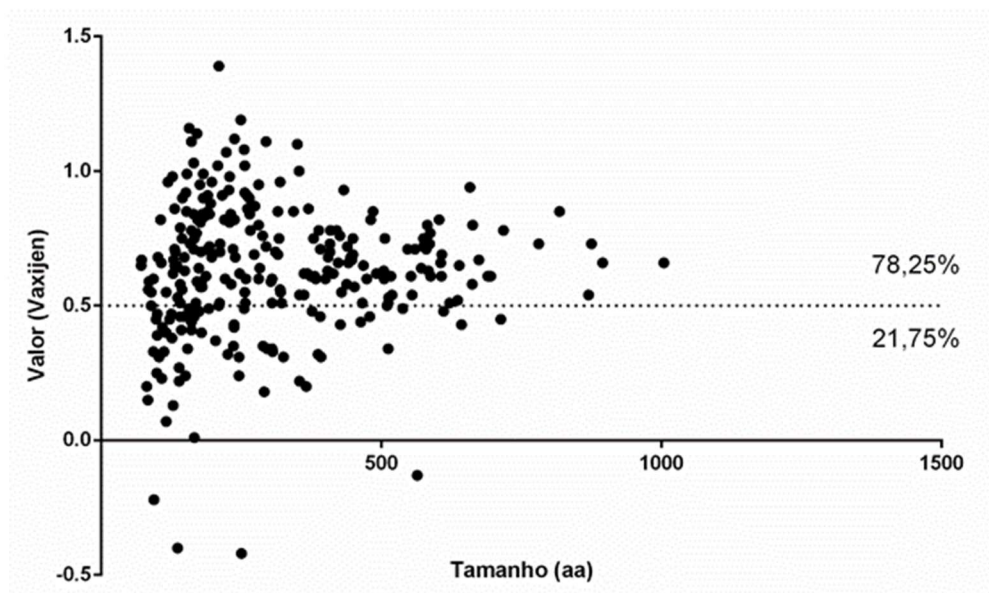


Figura 3 - Predição de antigenicidade das proteínas preditas como extracelulares nos programas CELLO e PSORT II. As proteínas que tiveram a mesma predição de localização extracelular nos programas CELLO e PSORT II foram submetidas a uma análise de imunogenicidade no servidor VaxiJen v.2.0. A linha pontilhada evidencia o ponto de corte (*cut off*) para seleção de proteínas imunogências para fungos ($\geq 0,5$).

Fonte: Da autora.

5.3 PREDIÇÃO DE PROTEÍNAS QUE NÃO POSSUÍAM SIMILARIDADE COM PROTEÍNAS HUMANAS

Para predição de ausência de similaridade entre as 205 proteínas de *T. asahii* e proteínas humanas, foi realizada análise de BLASTp-NCBI das proteínas fúngicas contra o genoma humano. Foi evidenciado que das 205 proteínas, 137 delas (66,82% das proteínas com potencial imunogênico) não obtiveram qualquer similaridade com proteínas humanas (Tabela 1), sendo estas, portanto, selecionadas para as demais etapas. Das proteínas selecionadas nesta etapa, o tamanho mínimo encontrado foi de 71 aminoácidos (XP_014180802.1) e a maior proteína (XP_014181046.1) continha 1004 aminoácidos.

Tabela 1 - Similaridade entre as proteínas imunogênicas identificadas e proteínas humanas determinadas pela ferramenta BLASTp-NCBI.

(continua)

ID das proteínas	Número de Aminoácidos	BLASTp-NCBI*
XP_014176263.1	281	Nenhuma similaridade
XP_014176270.1	85	COB: 84%; ID: 29%; AC: BAG63169
XP_014176272.1	381	Nenhuma similaridade
XP_014176291.1	512	COB:82%; ID: 25%; AC: XP_011521323.1
XP_014176328.1	174	Nenhuma similaridade
XP_014176348.1	141	Nenhuma similaridade
XP_014176352.1	288	COB: 15%; ID: 34%; AC: AAP97312.1
XP_014176353.1	274	Nenhuma similaridade
XP_014176411.1	281	COB: 27%; ID:27%; AC: NP_071376.1
XP_014176426.1	571	COB: 55%; ID: 35%; AC: 6EMI_A
XP_014176478.1	575	Nenhuma similaridade
XP_014176505.1	210	Nenhuma similaridade
XP_014176506.1	177	Nenhuma similaridade
XP_014176566.1	190	COB: 72%; ID: 30%; AC: NP_006806.1
XP_014176635.1	441	Nenhuma similaridade
XP_014176674.1	294	Nenhuma similaridade
XP_014176675.1	197	COB: 25%; ID: 35%; AC: AHX01233.1
XP_014176693.1	247	Nenhuma similaridade
XP_014176700.1	256	COB: 11%; ID: 55%; AC: NP_001309398.1
XP_014176734.1	157	COB: 27%; ID: 42%; AC: XP_005250316.1
XP_014176735.1	159	Nenhuma similaridade
XP_014176757.1	256	COB: 26%; ID: 28%; AC: XP_005260032.1
XP_014176779.1	193	Nenhuma similaridade
XP_014176811.1	220	Nenhuma similaridade
XP_014176823.1	257	Nenhuma similaridade

Tabela 1 - Similaridade entre as proteínas imunogênicas identificadas e proteínas humanas determinadas pela ferramenta BLASTp-NCBI. (continuação)

ID das proteínas	Número de Aminoácidos	BLASTp-NCBI*
XP_014176825.1	129	Nenhuma similaridade
XP_014176909.1	93	Nenhuma similaridade
XP_014176950.1	238	Nenhuma similaridade
XP_014176974.1	223	Nenhuma similaridade
XP_014177024.1	388	COB: 34%;ID: 28%; AC: BAF84688.1
XP_014177071.1	368	Nenhuma similaridade
XP_014177134.1	182	Nenhuma similaridade
XP_014177212.1	212	Nenhuma similaridade
XP_014177230.1	311	Nenhuma similaridade
XP_014177266.1	239	Nenhuma similaridade
XP_014177292.1	588	Nenhuma similaridade
XP_014177385.1	362	Nenhuma similaridade
XP_014177639.1	555	Nenhuma similaridade
XP_014177675.1	165	Nenhuma similaridade
XP_014177718.1	408	Nenhuma similaridade
XP_014177727.1	165	Nenhuma similaridade
XP_014177744.1	195	Nenhuma similaridade
XP_014177746.1	190	Nenhuma similaridade
XP_014177748.1	229	Nenhuma similaridade
XP_014177861.1	439	Nenhuma similaridade
XP_014178037.1	560	Nenhuma similaridade
XP_014178049.1	607	COB: 94%; ID:31%; AC: AAH34502.1
XP_014178053.1	212	Nenhuma similaridade
XP_014178171.1	260	Nenhuma similaridade
XP_014178234.1	179	Nenhuma similaridade
XP_014178245.1	144	Nenhuma similaridade
XP_014178356.1	438	COB:14%; ID: 31%; AC: NP_872368.2
XP_014178363.1	354	Nenhuma similaridade
XP_014178375.1	674	COB: 64%; ID:25%; AC: NP_005856.1
XP_014178376.1	141	Nenhuma similaridade
XP_014178377.1	144	COB: 77%; ID: 48%; AC: XP_005270301.1
XP_014178392.1	180	Nenhuma similaridade
XP_014178418.1	161	Nenhuma similaridade
XP_014178437.1	305	Nenhuma similaridade
XP_014178440.1	151	COB: 74%; ID: 29%; AAH35303.1
XP_014178443.1	379	Nenhuma similaridade
XP_014178513.1	141	Nenhuma similaridade
XP_014178517.1	172	Nenhuma similaridade
XP_014178537.1	553	Nenhuma similaridade
XP_014178544.1	315	COB: 14%; ID: 44%; AC: EAW88041.1
XP_014178554.1	171	Nenhuma similaridade
XP_014178594.1	317	COB: 20%; ID:32%; AC: XP_011522061.1

Tabela 1 - Similaridade entre as proteínas imunogênicas identificadas e proteínas humanas determinadas pela ferramenta BLASTp-NCBI. (continuação)

ID das proteínas	Número de Aminoácidos	BLASTp-NCBI*
XP_014178646.1	370	Nenhuma similaridade
XP_014178657.1	584	COB: 70%; ID:25%; AC: EAW56857.1
XP_014178841.1	513	COB: 69%; ID:30%; AC: NP_001900.1
XP_014178843.1	603	COB: 69%; ID:26%; AC: NP_005856.1
XP_014178884.1	177	COB: 11%; ID: 52%; AC: AAD02338.1
XP_014178912.1	587	COB: 9%; ID:34%; AC: CAB66513.3
XP_014178918.1	426	Nenhuma similaridade
XP_014178920.1	400	Nenhuma similaridade
XP_014178967.1	506	Nenhuma similaridade
XP_014179054.1	152	COB: 30%; ID: 30%; AC: XP_016868660.1
XP_014179055.1	166	Nenhuma similaridade
XP_014179061.1	182	Nenhuma similaridade
XP_014179066.1	231	Nenhuma similaridade
XP_014179069.1	232	Nenhuma similaridade
XP_014179124.1	362	Nenhuma similaridade
XP_014179129.1	107	Nenhuma similaridade
XP_014179250.1	258	Nenhuma similaridade
XP_014179252.1	116	COB: 60%; ID: 30%; AC: BAD96568.1
XP_014179266.1	190	Nenhuma similaridade
XP_014179299.1	466	COB: 17%; ID: 29%; AC: NP_061738.1
XP_014179308.1	208	Nenhuma similaridade
XP_014179371.1	322	Nenhuma similaridade
XP_014179404.1	449	Nenhuma similaridade
XP_014179418.1	350	Nenhuma similaridade
XP_014179486.1	662	COB: 34%; ID:27%; AC: XP_014180099.1
XP_014179627.1	870	Nenhuma similaridade
XP_014179635.1	283	Nenhuma similaridade
XP_014179837.1	187	Nenhuma similaridade
XP_014179997.1	255	Nenhuma similaridade
XP_014180075.1	315	Nenhuma similaridade
XP_014180099.1	235	COB: 30%; ID: 28%; AC: CAB59367.1
XP_014180166.1	374	Nenhuma similaridade
XP_014180223.1	149	Nenhuma similaridade
XP_014180224.1	305	Nenhuma similaridade
XP_014180225.1	127	Nenhuma similaridade
XP_014180250.1	420	COB: 83%; ID:28%; AC: NP_001900.1
XP_014180252.1	101	Nenhuma similaridade
XP_014180263.1	72	Nenhuma similaridade
XP_014180282.1	136	Nenhuma similaridade
XP_014180283.1	303	Nenhuma similaridade
XP_014180326.1	265	Nenhuma similaridade
XP_014180354.1	261	Nenhuma similaridade

Tabela 1 - Similaridade entre as proteínas imunogênicas identificadas e proteínas humanas determinadas pela ferramenta BLASTp-NCBI. (continuação)

ID das proteínas	Número de aminoácidos	BLASTp-NCBI*
XP_014180398.1	447	Nenhuma similaridade
XP_014180455.1	429	Nenhuma similaridade
XP_014180521.1	119	Nenhuma similaridade
XP_014180524.1	229	Nenhuma similaridade
XP_014180526.1	193	Nenhuma similaridade
XP_014180564.1	658	Nenhuma similaridade
XP_014180571.1	176	Nenhuma similaridade
XP_014180616.1	445	Nenhuma similaridade
XP_014180666.1	690	Nenhuma similaridade
XP_014180763.1	264	COB: 70%; ID: 30%; AC: AAI50634.1
XP_014180802.1	71	COB: 47%; ID:38%; AC: AAH54006.1
XP_014180838.1	266	Nenhuma similaridade
XP_014180841.1	353	Nenhuma similaridade
XP_014180844.1	718	COB: 50%; ID:26%; AC: BAG54041.1
XP_014180849.1	106	COB: 26%; ID: 39%; AC: CAA27765.1
XP_014180861.1	197	Nenhuma similaridade
XP_014180862.1	165	COB: 18%; ID: 42%; AC: EAW63777.1
XP_014180863.1	622	COB: 48%; ID:26% ; AC: XP_005245324.2
XP_014180898.1	519	Nenhuma similaridade
XP_014180925.1	273	Nenhuma similaridade
XP_014180955.1	781	COB: 86%; ID: 32%; AC: 4XWH_A
XP_014180970.1	89	Nenhuma similaridade
XP_014180972.1	84	Nenhuma similaridade
XP_014180978.1	170	Nenhuma similaridade
XP_014181003.1	404	Nenhuma similaridade
XP_014181018.1	582	Nenhuma similaridade
XP_014181029.1	148	COB: 46%; ID:28%; AC: BAC86392.1
XP_014181030.1	210	Nenhuma similaridade
XP_014181046.1	1004	Nenhuma similaridade
XP_014181060.1	145	Nenhuma similaridade
XP_014181235.1	171	Nenhuma similaridade
XP_014181300.1	132	COB: 27%; ID: 44%; AC: AAB59532.1
XP_014181306.1	238	Nenhuma similaridade
XP_014181413.1	212	Nenhuma similaridade
XP_014181423.1	161	Nenhuma similaridade
XP_014181426.1	135	Nenhuma similaridade
XP_014181502.1	408	Nenhuma similaridade
XP_014181674.1	695	COB: 96%; ID: 37%; AC: 4WGK_A
XP_014181713.1	517	Nenhuma similaridade
XP_014181855.1	608	COB: 52%; ID: 24%; AC: BAD18425.1
XP_014181856.1	168	Nenhuma similaridade
XP_014181858.1	449	Nenhuma similaridade

Tabela 1 - Similaridade entre as proteínas imunogênicas identificadas e proteínas humanas determinadas pela ferramenta BLASTp-NCBI.

(continuação)

ID das proteínas	Número de aminoácidos	BLASTp-NCBI*
XP_014181867.1	405	Nenhuma similaridade
XP_014181879.1	211	Nenhuma similaridade
XP_014181888.1	178	Nenhuma similaridade
XP_014181940.1	320	COB: 16%; ID: 43%; AC: CAD39174.2
XP_014182274.1	639	Nenhuma similaridade
XP_014182302.1	414	Nenhuma similaridade
XP_014182356.1	128	Nenhuma similaridade
XP_014182376.1	153	COB: 37%; ID:30%; AC: EAW48280.1
XP_014182455.1	216	Nenhuma similaridade
XP_014182480.1	131	Nenhuma similaridade
XP_014182498.1	510	Nenhuma similaridade
XP_014182543.1	547	COB: 73%; ID:28%; AC: NP_004842.1
XP_014182544.1	409	COB: 77%; ID:28% ; AC: 1HTR_B
XP_014182561.1	173	Nenhuma similaridade
XP_014182566.1	433	Nenhuma similaridade
XP_014182748.1	468	Nenhuma similaridade
XP_014182913.1	281	Nenhuma similaridade
XP_014183027.1	391	COB: 30%; ID: 33%; AC: AAD14406.1
XP_014183071.1	131	COB: 19%; ID: 32%; AC: 3VCM_P
XP_014183128.1	228	Nenhuma similaridade
XP_014183141.1	256	Nenhuma similaridade
XP_014183150.1	580	COB: 59%; ID:28%; AC: NP_002621.1
XP_014183178.1	319	Nenhuma similaridade
XP_014183223.1	504	COB: 2%; ID: 25%; AC: AAH30570.1
XP_014183240.1	505	COB: 89%; ID: 33%; AC: AAH39170.1
XP_014183263.1	474	Nenhuma similaridade
XP_014183275.1	606	COB: 20%; ID: 41%; AC: 4MWS_A
XP_014183286.1	343	Nenhuma similaridade
XP_014183299.1	481	COB: 15%; ID: 29%; AC: XP_011525503.1
XP_014183329.1	132	Nenhuma similaridade
XP_014183565.1	586	COB: 24%; ID: 33%; AC: BAG59966.1
XP_014183589.1	875	Nenhuma similaridade
XP_014183605.1	491	Nenhuma similaridade
XP_014183618.1	221	Nenhuma similaridade
XP_014183663.1	663	Nenhuma similaridade
XP_014183730.1	895	COB. 28%; ID: 32%; AC: AAH09975.1
XP_014183737.1	575	Nenhuma similaridade
XP_014183897.1	423	COB: 86%; ID:29%; AC: AAA60061.1
XP_014183969.1	485	COB: 67%; ID: 33%; AC: 5VLA_A
XP_014184000.1	183	COB: 48%; ID: 50%; AC: ANO55431.1
XP_014184002.1	249	COB: 26%; ID: 32%; AC: CCB78982.1
XP_014184003.1	169	Nenhuma similaridade

Tabela 1 - Similaridade entre as proteínas imunogênicas identificadas e proteínas humanas determinadas pela ferramenta BLASTp-NCBI. (conclusão).

ID das proteínas	Número de aminoácidos	BLASTp-NCBI*
XP_014184004.1	131	Nenhuma similaridade
XP_014184010.1	180	Nenhuma similaridade
XP_014184029.1	452	Nenhuma similaridade
XP_014184061.1	636	Nenhuma similaridade
XP_014184175.1	294	COB: 54%; ID: 33%; AC: NP_113649.1
XP_014184219.1	383	Nenhuma similaridade
XP_014184236.1	818	COB: 22%; ID: 58%; AC: XP_016885490.1
XP_014184258.1	319	Nenhuma similaridade
XP_014184274.1	195	COB: 21%; ID: 40%; AC: XP_011510892.1

*Em negrito estão destacadas as proteínas de *T. asahii* que não obtiveram qualquer similaridade com proteínas humanas. COB: cobertura; ID: identidade, AC: acesso.

Fonte: Da autora.

5.4 BUSCA POR PROTEÍNAS COM SIMILARIDADE COM PROTEÍNAS DOS GÊNEROS DE LEVEDURAS *CRYPTOCOCCUS* SPP. E *CANDIDA* SPP.

As 137 proteínas com potencial imunogênico que não possuíam qualquer similaridade com proteínas humanas foram comparadas com proteínas dos gêneros *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. através da ferramenta BLASTp-NCBI. Esta etapa foi necessária para selecionar aquelas proteínas que possuíam similaridade com as proteínas dos gêneros *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. e, portanto, potencial de indução de proteção cruzada entre as leveduras. Sabe-se que as proteínas fúngicas podem exibir funções semelhantes por ontologia gênica, e também por que os genomas dos gêneros *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. são, em sua maioria, anotados e a função dos genes, verificada, enquanto o de *T. asahii*, ainda é hipotético. Através desta comparação foi possível evidenciar se as proteínas analisadas possuíam alguma função compartilhada com outros fungos e se provavelmente, elas existem de fato no proteoma de *T. asahii*.

Na análise foi visto que das 137 proteínas, 82 (59,85%) possuíam alguma similaridade com proteínas descritas no gênero *Cryptococcus* spp. e apenas 11 (8,02%) delas com o gênero *Candida* spp. (Tabela 2). Destas, 4 foram comuns para ambos os gêneros. Portanto restaram 44 proteínas para proteção exclusiva contra *T. asahii*.

Foram encontrados valores de cobertura entre as proteínas dos gêneros analisados que variaram de 2% a 31% de cobertura e 27% a 62% de identidade quando comparadas ao gênero

Candida spp. Foi visto que tanto a cobertura quanto a identidade foram baixas para *Candida* spp. Já para *Cryptococcus* spp., os valores encontrados variaram de 10% a 100% de cobertura e 20% a 60% de identidade. Assim sendo, foi possível selecionar proteínas de *T. asahii* que tiveram similaridade com o gênero *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. para as análises de epítomos vacinais com potencial de proteção cruzada.

Tabela 2 - Similaridade entre 137 proteínas de *T. asahii* e proteínas expressas por leveduras dos gêneros *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp.

(continua)

ID das proteínas	Número de Aminoácidos	<i>Cryptococcus</i> spp.*	<i>Candida</i> spp.#
XP_014176263.1	281	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014176272.1	381	COB: 79%; ID: 36%; AC: <u>ODN98729.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014176328.1	174	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014176348.1	141	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014176353.1	274	COB: 87%; ID: 37%; AC: <u>XP_018995437.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014176478.1	575	COB: 90%; ID: 35%; AC: <u>ODN77362.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014176505.1	210	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014176506.1	177	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014176635.1	441	COB: 76%; ID: 23%; AC: <u>XP_018997736.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014176693.1	247	COB: 39%; ID: 29%; AC: <u>ODN81260.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014176735.1	159	COB 27%; ID: 42%; AC: <u>XP_567661.1</u>	Nenhuma similaridade COB: 7%; ID: 50%; AC: <u>YP_004927430.1</u>
XP_014176779.1	193	COB: 86%; ID: 37%; AC: <u>ODN88215.1</u>	AC: <u>YP_004927430.1</u>
XP_014176811.1	220	COB: 50%; ID: 35%; AC: <u>ODN92570.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014176823.1	257	COB: 89%; ID: 27%; AC: <u>XP_01899404.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014176825.1	129	COB: 25%; ID: 45%; AC: <u>OXH41592.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014176909.1	93	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014176950.1	238	COB: 11%; ID: 52%; AC: <u>OXH31313.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014176974.1	223	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014177134.1	182	COB: 38%; ID: 41%; AC: <u>XP_018995335.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014177212.1	212	COB: 71%; ID: 60%; AC: <u>KIR48896.1</u>	Nenhuma similaridade COB: 31%; ID: 24%; AC: <u>YP_004927950.1</u>
XP_014177230.1	311	Nenhuma similaridade	AC: <u>YP_004927950.1</u>
XP_014177266.1	239	COB: 15%; ID: 39%; AC: <u>KIR85659.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014177292.1	588	COB: 15%; ID: 25%; AC: <u>KIS00984.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014177385.1	362	COB: 70%; ID: 34%; AC: <u>ODO02257.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014177639.1	555	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014177675.1	165	COB: 96%; ID: 50%; AC: <u>OXB33482.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014177718.1	408	COB: 95%; ID: 46%; AC: <u>KIR58118.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014177727.1	165	COB: 69%; ID: 30%; AC: <u>OXG13434.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014177744.1	195	COB: 90%; ID: 23%; AC: <u>OWZ59871.1</u>	Nenhuma similaridade

Tabela 2 - Similaridade entre 137 proteínas de *T. asahii* e proteínas expressas por leveduras dos gêneros *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. (continuação)

ID das proteínas	Número de aminoácidos	<i>Cryptococcus</i> spp.*	<i>Candida</i> spp.#
XP_014177746.1	190	COB: 41%;ID: 37%;AC: <u>XP_018995335.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014177748.1	229	COB: 65%; ID: 29%; AC: <u>OWZ79279.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014177861.1	439	COB: 92%;ID: 59%; AC: <u>OWZ71116.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014178037.1	560	COB: 79%; ID: 39%; AC: <u>XP_774591.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014178053.1	212	COB 55%;ID: 29%;AC: <u>XP_018991293.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014178171.1	260	COB: 26%;ID: 32%;AC: <u>OXC83273.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014178363.1	354	COB: 98%; ID: 48%;AC: <u>XP_777863.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014178376.1	141	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014178392.1	180	COB: 56%;ID: 32%; AC: <u>OWZ80766.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014178418.1	161	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014178437.1	305	COB: 39%;ID: 27%;AC: <u>KGB75096.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014178443.1	379	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014178513.1	141	COB: 96%;ID: 46%;AC: <u>ODO04119.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014178517.1	172	COB: 35%;ID: 33%;AC: <u>KIR83673.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014178537.1	553	COB: 83%;ID: 57%; AC: <u>ODO11215.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014178554.1	171	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014178646.1	370	COB: 97%;ID: 40%;AC: <u>OWZ36045.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014178918.1	426	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014178920.1	400	COB: 90%;ID:24%; AC: <u>XP_003196324.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014178967.1	506	Nenhuma similaridade	COB: 5%;ID: 34%; AC: <u>ABN13679.1</u> COB: 7%; ID: 62%; AC: <u>ANB45531.1</u>
XP_014179055.1	166	COB: 80%;ID: 31%;AC: <u>KIR86642.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014179061.1	182	COB: 45%;ID: 27%;AC: <u>OWZ61522.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014179066.1	231	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014179069.1	232	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014179124.1	362	COB: 98%;ID: 49%; AC: <u>ODO02121.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014179129.1	107	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014179250.1	258	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014179266.1	190	COB: 32%; ID: 29%;AC: <u>OXG20388.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014179308.1	208	Nenhuma similaridade	COB: 5%;ID: 58%; AC: <u>YP_008474897.1</u>
XP_014179371.1	322	COB 99%;ID: 26%;AC: <u>ODN89306.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014179404.1	449	COB: 55%;ID: 37%;AC: <u>OWT40365.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014179418.1	350	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014179627.1	870	COB: 56%;ID: 20%;AC: <u>XP_018995948.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014179635.1	283	COB: 85%;ID: 33%;AC: <u>ODN97136.1</u>	COB: 12%;ID: 28%;AC: <u>AGH15915.1</u>
XP_014179837.1	187	COB: 62%;ID: 44%; AC: <u>ODN89407.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014179997.1	255	COB: 47%;ID: 53%;AC: <u>OXB33819.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180075.1	315	COB:91%;ID: 34%; AC: <u>ODO08083.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180166.1	374	COB: 98%;ID: 40% AC: <u>ODN94488.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180223.1	149	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade

Tabela 2 - Similaridade entre 137 proteínas de *T. asahii* e proteínas expressas por leveduras dos gêneros *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp.

(continuação)

ID das proteínas	Número de aminoácidos	<i>Cryptococcus</i> spp.*	<i>Candida</i> spp.#
XP_014180225.1	127	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014180252.1	101	COB: 44%;ID: 29%;AC:<u>KIR36140.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180263.1	72	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014180282.1	136	COB: 98%;ID: 35%; AC:<u>XP_570446.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180283.1	303	COB: 87%;ID: 31%;AC:<u>KGB75096.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180326.1	265	COB: 36%;ID: 32%; AC:<u>KIR86040.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180354.1	261	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014180398.1	447	COB: 99%;ID: 52%; AC:<u>ODN85334.1</u>	Nenhuma similaridade COB:4%;ID: 53%; AC: <u>AFO11461.1</u>
XP_014180455.1	429	COB: 83%;ID: 31%;AC:<u>KIY33802.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180521.1	119	COB: 36%; ID: 41%;AC:<u>ODN92312.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180524.1	229	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014180526.1	193	COB 86%;ID: 48%; AC:<u>XP_018992815.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180564.1	658	COB: 90%;ID: 53% AC:<u>OXB34126.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180571.1	176	COB: 93%;ID: 28%; AC:<u>XP_018996804.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180616.1	445	COB: 82%; ID: 57%;AC: <u>KIR89311.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180666.1	690	COB: 98%;ID: 56%; AC: <u>KIR69350.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180838.1	266	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014180841.1	353	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014180861.1	197	COB: 85%;ID: 27%; AC: <u>OXH60571.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180898.1	519	COB: 97%;ID: 29%; AC:<u>XP_018992272.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180925.1	273	COB: 19%;ID: 35%;AC: <u>XP_776218.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014180970.1	89	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014180972.1	84	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014180978.1	170	COB: 100%;ID: 60%;AC:<u>XP_018989879.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014181003.1	404	COB: 98%;ID: 58%;AC:<u>ODO02121.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014181018.1	582	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014181030.1	210	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade COB: 2%;ID: 41%; AC: <u>YP_004927414.1</u>
XP_014181046.1	1004	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014181060.1	145	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014181235.1	171	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014181306.1	238	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014181413.1	212	COB: 10%;ID: 41%;AC: <u>OXH42788.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014181423.1	161	COB: 65%;ID: 24%; AC: <u>XP_018991291.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014181426.1	135	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014181502.1	408	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014181713.1	517	COB: 81%;ID: 37%; AC: <u>KIR35180.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014181856.1	168	COB: 79%;ID: 46%;AC:<u>XP_012048071.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014181858.1	449	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014181867.1	405	COB: 49%;ID: 40%; AC:<u>OWZ35950.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014181879.1	211	COB: 51%;ID: 36%;AC:<u>XP_018996811.1</u>	Nenhuma similaridade

Tabela 2 - Similaridade entre 137 proteínas de *T. asahii* e proteínas expressas por leveduras dos gêneros *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. (conclusão).

ID das proteínas	Número de aminoácidos	<i>Cryptococcus</i> spp.*	<i>Candida</i> spp.#
XP_014182274.1	639	Nenhuma similaridade	COB: 10%;ID: 27%; AC: <u>CDX09892.1</u>
XP_014182302.1	414	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014182356.1	128	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014182455.1	216	COB: 83%;ID: 31%; AC:<u>KIR83794.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014182498.1	510	COB: 98%;ID: 30%;AC: <u>KIR86448.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014182561.1	173	COB: 91%;ID: 31%; AC: <u>OXH60571.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014182566.1	433	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014182748.1	468	COB: 83%;ID: 41%;AC: <u>XP_567580.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014182913.1	281	Nenhuma similaridade	COB: 9%;ID: 35%; AC: <u>BAG16273.1</u>
XP_014183128.1	228	COB: 22%;ID: 33%;AC:<u>XP_018988642.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014183141.1	256	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014183178.1	319	COB: 39%;ID: 37%; AC:<u>OXC63620.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014183263.1	474	COB: 93%;ID: 45%; AC:<u>ODO07950.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014183286.1	343	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014183329.1	132	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014183589.1	875	Nenhuma similaridade	COB:2%;ID: 52%; AC: <u>AFN89654.1</u>
XP_014183605.1	491	COB: 96%;ID: 43%;AC:<u>XP_018998084.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014183618.1	221	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014183663.1	663	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014183737.1	575	COB: 9%; ID: 45%; AC:<u>ODO07963.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014184003.1	169	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014184004.1	131	COB: 98%;ID: 58%;AC:<u>ODN96131.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014184010.1	180	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014184029.1	452	COB: 21%; ID: 36%; AC:<u>ODN91132.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014184061.1	636	COB: 56%;ID: 46%; AC:<u>ODO03829.1</u>	Nenhuma similaridade
XP_014184219.1	383	Nenhuma similaridade	Nenhuma similaridade
XP_014184258.1	319	COB: 14%;ID: 33%;AC: <u>OWZ46746.1</u>	Nenhuma similaridade

*Em negrito estão destacadas as proteínas que obtiveram similaridade com o gênero *Cryptococcus* spp.; # tarjado em cinza estão destacadas as que possuíam similaridade com *Candida* spp. COB: cobertura; ID: identidade; AC: acesso.

Fonte: Da autora.

5.5 SELEÇÕES DAS PROTEÍNAS COM SIMILARIDADE COM GÊNEROS *CRYPTOCOCCUS* SPP. E *CANDIDA* SPP.

Afim de se estabelecer um ponto de corte para as futuras análises, foram propostos 2 critérios de seleção para o estudo das proteínas com proteção cruzada para leveduras: (i) foram selecionadas a partir desse passo apenas as proteínas que possuíam cobertura e identidade \geq

50% entre proteínas de *T.asahii* e *Cryptococcus* spp. e *T. asahii* e *Candida* spp., e (ii) foram selecionadas as proteínas que possuíam caracterização funcional (nome).

Através dos critérios, foi verificado que nenhuma proteína de *T. asahii* possuía similaridade $\geq 50\%$ com as de *Candida* spp., uma vez que o valor máximo encontrado foi 31% de cobertura. Portanto, essas proteínas foram excluídas das análises posteriores. Já para o gênero *Cryptococcus* spp., das 82 proteínas de *T. asahii* que possuíam alguma similaridade com *Cryptococcus* spp., 11 delas obtiveram cobertura e similaridade $\geq 50\%$ (Tabela 3). Destas, apenas 5 possuíam caracterização funcional, sendo estas as selecionadas para as análises de proteção cruzada.

Tabela 3 - Proteínas com cobertura e identidade com o gênero *Cryptococcus* spp. $\geq 50\%$.

ID das proteínas	Número de aminoácidos	Caracterização funcional predita*	BLASTp com proteínas do gênero <i>Cryptococcus</i> spp.
XP_014180978.1	170	<i>Major allergen Asp F2</i>	COB: 100%; ID:60%; AC: XP_018989879.1
XP_014180398.1	447	<i>Alpha-1,3-glucanase</i>	COB: 99%; ID: 52%; AC:ODN85334.1
XP_014180666.1	690	<i>Glyoxal oxidase precursor</i>	COB: 98%; ID: 56%; AC: KIR69350.1
XP_014180616.1	445	<i>Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98</i>	COB: 82%;ID: 57%;AC: KIR89311.1
XP_014181003.1	404	<i>Glycoprotein</i>	COB: 98%; ID: 58%;AC: ODO02121.1
XP_014184004.1	131	hypothetical protein A1Q1_01318	COB: 98%;ID: 58%; AC: ODN96131.1
XP_014177212.1	212	hypothetical protein A1Q1_04930	COB: 71%; ID: 60%; AC: KIR48896.1
XP_014177675.1	165	hypothetical protein A1Q1_05523	COB: 96%; ID: 50%; AC: OXB33482.1
XP_014177861.1	439	hypothetical protein A1Q1_04009	COB: 92%; ID: 59%; AC:OWZ71116.1
XP_014178537.1	553	hypothetical protein A1Q1_04824	COB: 83%; ID: 52%; AC:ODO11215.1
XP_014180564.1	658	hypothetical protein A1Q1_02144	COB: 90%; ID: 53%; AC: OXB34126.1

*Em negrito estão destacadas as proteínas que obtiveram similaridade $\geq 50\%$ e caracterização funcional. COB: cobertura; ID: identidade, AC: acesso.

Fonte: Da autora.

5.6 SELEÇÃO DAS PROTEÍNAS QUE NÃO OBTIVERAM SIMILARIDADE COM PROTEÍNAS DOS GÊNEROS *CRYPTOCOCCUS* SPP. E *CANDIDA* SPP.

Na etapa anterior, na qual 137 proteínas foram selecionadas, 93 obtiveram alguma similaridade com os gêneros analisados (82 de *Cryptococcus* spp. e 11 de *Candida* spp., sendo 4 comuns em ambos os gêneros), restando para esta etapa 44 proteínas, que foram analisadas separadamente a fim de se determinar possíveis candidatos vacinais apenas para *T. asahii*.

A Tabela 4 resume as 44 proteínas que não obtiveram similaridade com aquelas do gênero *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. e nem com proteínas humanas (*Homo sapiens*). Para selecionar proteínas que poderiam conferir proteção apenas contra *T. asahii*, foram consideradas apenas as proteínas que possuíam caracterização funcional por ontologia gênica com alguma proteína conhecida, anotada no proteoma de *T. asahii*. Desta forma, das 48 proteínas, apenas 3 possuíam caracterização funcional, sendo estas selecionadas para as próximas análises.

Tabela 4 - As 44 proteínas ausentes de similaridade com as proteínas dos gêneros *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. e com proteínas humanas (*Homo sapiens*).

(continua)

ID das proteínas	Caracterização funcional das proteínas
XP_014176263.1	hypothetical protein A1Q1_05579
XP_014176328.1	hypothetical protein A1Q1_05644
XP_014176348.1	hypothetical protein A1Q1_05664
XP_014176505.1	hypothetical protein A1Q1_05821
XP_014176506.1	hypothetical protein A1Q1_05822
XP_014176909.1	hypothetical protein A1Q1_06225
XP_014176974.1	hypothetical protein A1Q1_06385
XP_014177639.1	hypothetical protein A1Q1_05432
XP_014178376.1	hypothetical protein A1Q1_04663
XP_014178418.1	hypothetical protein A1Q1_04705
XP_014178443.1	hypothetical protein A1Q1_04730
XP_014178554.1	hypothetical protein A1Q1_04841
XP_014178918.1	hypothetical protein A1Q1_03693
XP_014179066.1	hypothetical protein A1Q1_03311
XP_014179069.1	hypothetical protein A1Q1_03314
XP_014179129.1	hypothetical protein A1Q1_03201
XP_014179250.1	hypothetical protein A1Q1_02513
XP_014179418.1	<i>Curculin domain protein (mannose-binding) lectin*</i>
XP_014180223.1	hypothetical protein A1Q1_01709

Tabela 4 - As 44 proteínas ausentes de similaridade com as proteínas dos gêneros *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. e com proteínas humanas (*Homo sapiens*). (conclusão).

ID das proteínas	Caracterização funcional das proteínas
XP_014180224.1	hypothetical protein A1Q1_01710
XP_014180225.1	hypothetical protein A1Q1_01711
XP_014180263.1	hypothetical protein A1Q1_01749
XP_014180354.1	hypothetical protein A1Q1_01871
XP_014180524.1	hypothetical protein A1Q1_02041
XP_014180838.1	hypothetical protein A1Q1_01082
XP_014180841.1	hypothetical protein A1Q1_01085
XP_014180970.1	hypothetical protein A1Q1_01050
XP_014180972.1	hypothetical protein A1Q1_01052
XP_014181018.1	hypothetical protein A1Q1_00920
XP_014181030.1	hypothetical protein A1Q1_00932
XP_014181060.1	hypothetical protein A1Q1_00962
XP_014181235.1	hypothetical protein A1Q1_00860
XP_014181306.1	hypothetical protein A1Q1_00516
XP_014181426.1	hypothetical protein A1Q1_00636
XP_014181502.1	hypothetical protein A1Q1_00378
XP_014181858.1	hypothetical protein A1Q1_08236
XP_014181888.1	hypothetical protein A1Q1_08266
XP_014182302.1	hypothetical protein A1Q1_07815
XP_014182356.1	hypothetical protein A1Q1_07897
XP_014182566.1	hypothetical protein A1Q1_06842
XP_014183141.1	hypothetical protein A1Q1_07430
XP_014183286.1	hypothetical protein A1Q1_06762
XP_014183329.1	hypothetical protein A1Q1_06250
XP_014183618.1	<i>Cutinase*</i>
XP_014183663.1	hypothetical protein A1Q1_03098
XP_014184003.1	hypothetical protein A1Q1_01317
XP_014184010.1	hypothetical protein A1Q1_01324
XP_014184219.1	<i>Beta-1,3-mannanase*</i>

*Em negrito estão destacadas as proteínas que possuíam caracterização funcional anotadas no proteoma predito de *T. asahii*.

Fonte: Da autora.

5.7 MAPEAMENTO DOS EPÍTOPOS DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS

Nas etapas anteriores foram selecionadas ao todo 8 proteínas, que podem ser candidatos a vacinas fúngicas indutoras de proteção cruzada entre *T. asahii* e o gênero *Cryptococcus* spp. (5 proteínas), ou que podem ser candidatos vacinais exclusivos contra *T. asahii* (3 proteínas).

Foi possível observar que as proteínas selecionadas possuem epítomos com potencial de ligação ao MHC II. A Tabela 5 apresenta o número de epítomos preditos com potencial de ligação ao MHC II e a quantidade de alelos, nos quais os epítomos das proteínas analisadas podem se ligar.

Tabela 5 - Predição de epítomos com potencial de ligação ao MHC II presentes nas 8 proteínas selecionadas para proteção cruzada entre *T. asahii* e o gênero *Cryptococcus* spp. e proteção exclusiva contra *T. asahii*.

ID das proteínas	Número de aminoácidos	Caracterização Funcional	Número de epítomos de MHC II	Varição do número de alelos do MHC II
XP_014180978.1	170	<i>Major allergen Asp F2</i>	26	1 a 20
XP_014180398.1	447	<i>Alpha-1,3-glucanase</i>	68	1 a 22
XP_014180666.1	690	<i>Glyoxal oxidase precursor</i>	103	1 a 20
XP_014180616.1	445	<i>Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98</i>	63	1 a 22
XP_014181003.1	404	<i>Glycoprotein</i>	57	1 a 20
XP_014179418.1	350	<i>Curculin domain protein (mannose-binding) lectin</i>	54	1 a 21
XP_014183618.1	221	<i>Cutinase</i>	33	1 a 22
XP_014184219.1	383	<i>Beta-1,3-mannanase</i>	57	1 a 18

Fonte: Da autora.

5.8 ANÁLISE DOS EPÍTOMOS COM LIGAÇÃO AO MHC II NO VAXIJEN V2.0

Após a predição de ligação dos epítomos das 8 proteínas aos alelos do MHC II, foram feitas novas predições no programa VaxiJen v2.0 para avaliar quais destes epítomos pode ser considerados imunogênicos. Os epítomos com valor igual ou maior ao ponto de corte estabelecido ($\geq 0,5$) foram selecionados para a próxima etapa. A Tabela 6 resume a quantidade

de epítomos que se ligaram aos alelos do MHC e foram preditos como imunogênicos no VaxiJen v2.0.

Tabela 6 - Predição dos epítomos imunogênicos que se ligaram aos alelos do MHC II.

(continua)

Caracterização funcional	Epítomos imunogênicos/ número de epítomos ligados ao MHC II (% de imunogênicos)	Número de sequência	Início do peptídeo	Fim do peptídeo	Sequência	VaxiJen v2.0
<i>Major allergen Asp F2</i>	18/26 (69,2%)	1	6	20	LLTLGAAASASAGPI	1.081
		2	11	25	AAASASAGPILIPRE	0.787
		3	24	38	RELKEYSADVELHSS	2.211
		4	32	46	DVELHSSCNATQORM	1.078
		5	37	51	SSCNATQQRMLKQAL	0.559
		6	43	57	QQRMLKQALGEMNEV	1.324
		7	49	64	QALGEMNEVTSFAIE	1.648
		8	54	68	MNEVTSFAIEYLEHN	0.674
		9	65	79	LEHNGAQDQVFTTYF	1.092
		10	70	84	AQDQVFTTYFGTEPE	2.239
		11	75	89	FTTYFGTEPEAYPTV	1.822
		12	80	94	GTEPEAYPTVIGAYK	0.841
		13	85	99	AYPTVIGAYKALLSA	1.167
		14	90	104	IGAYKALLSANKKGV	0.7802
		15	118	132	DGWRGHYRGENATTE	1.228
		16	123	137	HYRGENATTETVICD	0.604
		17	148	162	AFCMFGFQLAKDKPS	1.274
		18	156	170	LAKDKPSTYWSIDLM	1.192
<i>Alpha-1,3-glucanase</i>	38/68 (55,8%)	1	12	26	LAAATVVSAAPHIDP	1.351
		2	17	31	VVSAAPHIDPRHKLH	0.832
		3	33	47	RATIDSKTREVFAHF	0.791
		4	53	67	PAYTQDDWVIDMELA	2.192
		5	58	72	DDWVIDMELAQHYGI	3.152

Tabela 6 - Predição dos epítomos imunogênicos que se ligaram aos alelos do MHC II.

(continuação)

Caracterização funcional	Epítomos imunogênicos/ número de epítomos ligados ao MHC II (% de imunogênicos)	Número de sequência	Início do peptídeo	Fim do peptídeo	Sequência	VaxiJen v2.0
		6	65	79	ELAQHYGIDGFALNV	2.850
		7	70	84	YGIDGFALNVGADSW	2.319
		8	94	108	AAAQRVGNFNSFLSF	1.481
		9	99	113	VGNFNSFLSFDFNWY	3.297
		10	104	118	NFLSDFDNWYNESST	1.544
		11	109	123	DFNWYNESSTKEIAE	1.091
		12	115	129	ESSTKEIAELVKKYA	1.227
		13	123	137	ELVKKYADHPNQLRV	1.770
		14	132	146	PNQLRVDDKPFVSTF	1.251
		15	147	161	VGDGFNWTHVEELVG	0.877
		16	153	167	WTHVEELVGHQIYAV	1.938
		17	160	174	VGHQIYAVPCWRETK	0.823
		18	171	185	RETKENAANPNVEGL	0.507
		19	176	190	NAANPNVEGLMSWAA	0.841
		20	181	195	NVEGLMSWAAWPGQA	0.853
		21	186	200	MSWAAWPGQANNNTNTP	0.589
		22	204	218	PLSGDLDIQYMQDLQ	2.694
		23	209	223	LDIQYMQDLQAKPYM	1.495

Tabela 6 - Predição dos epítomos imunogênicos que se ligaram aos alelos do MHC II.

(continuação)

Caracterização funcional	Epítomos imunogênicos/ número de epítomos ligados ao MHC II (% de imunogênicos)	Número de sequência	Início do peptídeo	Fim do peptídeo	Sequência	VaxiJen v2.0
		24	214	228	MQDLQAKPYMAPVSP	1.087
		25	221	235	PYMAPVSPWFSTHFG	1.787
		26	226	240	VSPWFSTHFGKDVAW	1.307
		27	233	247	HFGKDVAWSKNWIFK	2.012
		28	243	257	NWIFKSEDLWTYRWY	1.157
		29	248	262	SEDLWTYRWYQMLQL	1.028
		30	274	288	DYGESHYVGPYNQPH	1.209
		31	322	336	DPVVEEDKLVYWFRP	0.559
		33	371	385	NGAKIVVQSGKDTPF	0.894
		34	394	408	HTFKHKMAPGVQQFL	0.896
		35	399	413	KMAPGVQQFLIETDA	1.720
		52	652	666	KPQVAVADPNKAAVK	1.039
		53	659	673	DPNKA AVKSGAGNLS	0.838
		54	664	678	AVKSGAGNLSSPILF	0.709
<i>Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98</i>	39/63 (61%)	1	11	25	ILGAVSAHTGCGGHE	1.175
		2	18	32	HTGCGGHEIGARNLG	2.227
		3	23	37	GHEIGARNLGGRVIS	1.832

Tabela 6 - Predição dos epítomos imunogênicos que se ligaram aos alelos do MHC II.

(continuação)

Caracterização funcional	Epítomos imunogênicos/ número de epítomos ligados ao MHC II (% de imunogênicos)	Número de sequência	Início do peptídeo	Fim do peptídeo	Sequência	VaxiJen v.2.0
		4	28	42	ARNLGGRVISKRQVA	1.762
		5	34	48	RVISKRQVADNVEDV	0.596
		6	58	72	EPAAKITKEYPVAWQ	1.9217
		7	89	103	QINKTLGEKFANIPV	0.511
		8	94	108	LGEKFANIPVRPAEG	0.705
		9	99	113	ANIPVRPAEGTEGND	1.727
		10	158	172	CSHNALYNFLGKENQ	0.640
		11	164	178	YNFLGKENQRATMFF	0.622
		12	179	193	IGSNVIDWPVQAIRA	0.676
		13	184	198	IDWPVQAIRAKTDGH	1.039
		14	194	208	KTDGHEICHTWSHA	2.348
		15	199	213	EICHTWSHAKMTSV	0.989
		16	205	219	WSHAKMTSVSSEQAF	1.109
		17	210	224	MTSVSSEQAFELY	0.686
		18	240	254	WRPPYGDVDNRIRAI	0.784
		19	245	259	GDVDNRIRAIQHMN	1.087
		20	250	264	RIRAIQHMNLTNIV	1.162
		21	270	284	FDWQIGTNGVTQETV	1.494

Tabela 6 - Predição dos epítomos imunogênicos que se ligaram aos alelos do MHC II.

(continuação)

Caracterização Funcional	Epítomos imunogênicos/ número de epítomos ligados ao MHC II (% de imunogênicos)	Número de sequência	Início do peptídeo	Fim do peptídeo	Sequência	VaxiJen v.2.0
		22	279	293	VTQETVAGNYQKVID	2.093
		23	284	298	VAGNYQKVIDKAKNG	0.679
		24	310	324	HEINNNTMSELIAQY	0.623
		25	315	329	NTMSELIAQYPKIKE	0.696
		26	338	352	NVGYNITHPYAEEDY	0.895
		27	348	362	AEEDYFYPNFEQYVA	0.783
		28	353	367	FYPNFEQYVAGTRNY	1.938
		29	358	372	EQYVAGTRNYSSTPI	0.956
		30	363	377	GTRNYSSTPIDGVQP	0.512
		31	368	382	SSTPIDGVQPSSAS	0.768
		32	374	388	GVQPSSASGSAGAS	2.086
		33	381	395	ASGSAGASGSAGATG	3.255
		34	389	403	GSAGATGGAGAASGS	2.660
		35	397	411	AGAASGSGSASAGGA	2.008
		36	403	417	SGSASAGGATKSGAS	1.743
		37	420	434	QKNSGAVQNAVAGSL	0.561
		38	425	439	AVQNAVAGSLAAVGA	1.474
		39	431	445	AGSLAAVGAALALLA	1.525

Tabela 6 - Predição dos epítomos imunogênicos que se ligaram aos alelos do MHC II.

(continuação)

Caracterização funcional	Epítomos imunogênicos/ número de epítomos ligados ao MHC II (% de imunogênicos)	Número de sequência	Início do peptídeo	Fim do peptídeo	Sequência	VaxiJen v.2.0
<i>Glycoprotein</i>	28/57 (49,1%)	1	6	20	AAALLASSGVSAQVT	0.570
		2	11	25	ASSGVSAQVTAAFPN	1.055
		3	40	54	AQVNQTSLRLLSLN	1.928
		4	136	150	HGAKNLGNPIGGNVT	2.712
		5	142	156	GNPIGGNVTTNLATG	2.703
		6	147	161	GNVTTNLATGEDVIFY	1.441
		7	152	166	NLATGEDVFYEEWMS	1.205
		8	157	171	EDVFYEEWMSFISFD	0.925
		9	163	177	EWMSFISFDQFCLRI	1.127
		10	168	182	ISFDQFCLRICTAEV	2.025
		11	173	187	FCLRICTAEVNGTTT	2.415
		12	179	193	TAEVNGTTTALQCEH	1.671
		13	184	198	GTTTALQCEHELDIM	0.836
		14	193	207	HELDIMGCRWVMAIT	2.211
		15	200	214	CRWVMAITDFEASRT	1.610
		16	205	219	AITDFEASRTTGfTE	1.426
		17	213	227	RTTGfTECDGEIAMA	1.083
		18	277	291	SNCKTYSTISNGVDM	1.007

Tabela 6 - Predição dos epítomos imunogênicos que se ligaram aos alelos do MHC II.

(continuação)

Caracterização funcional	Epítomos imunogênicos/ número de epítomos ligados ao MHC II (% de imunogênicos)	Número de sequência	Início do peptídeo	Fim do peptídeo	Sequência	VaxiJen v.2.0
		19	285	299	ISNGVDMKDLMVKAA	0.529
		20	311	325	VTGLPSTTPATVTTP	0.647
		21	328	342	VPPSVTPTSAGAGSS	0.782
		22	348	362	DGGKDGASSDSAAAAG	1.494
		23	353	367	GASSDSAAAGAETTK	1.750
		24	364	378	ETTKNGDSAAAGKPA	1.766
		25	370	384	DSAAAGKPAGGAGAL	1.284
		26	375	389	GKPAGGAGALSAPAL	2.044
		27	385	399	SAPALLASVCGVALG	1.514
		28	390	404	LASVCGVALGALALL	1.261
<i>Curculin domain protein (mannose-binding) lectin</i>	43/54 (79,6%)					0.599
		1	8	22	TLIAPLAALSALAAP	
		2	30	44	ATRDEADVIVGRALA	1.669
		3	35	49	ADVIVGRALASVDPS	1.341
		4	40	54	GRALASVDPSTTSVT	0.981
		5	46	60	VDPSTTSVTDIEREI	1.146
		6	56	70	IEREISRVEVGAHAL	0.940
		7	61	75	SRVEVGAHALAARDV	1.422

Tabela 6 - Predição dos epítomos imunogênicos que se ligaram aos alelos do MHC II.

(continuação)

Caracterização funcional	Epítomos imunogênicos/ número de epítomos ligados ao MHC II (% de imunogênicos)	Número de sequência	Início do peptídeo	Fim do peptídeo	Sequência	VaxiJen v.2.0
		8	66	80	GAHALAARDVVGKDAF	0.824
		9	72	86	ARDVVGKDAFVTANS	1.589
		10	77	91	KDAFVTANSGIHSIQ	0.568
		11	85	99	SGIHSIQCLQYLLTA	0.867
		12	90	104	IQCLQYLLTARGFRT	0.800
		13	95	109	YLLTARGFRTDRDGI	0.910
		14	109	123	ILGADTIAQIKAFQK	0.986
		15	114	128	TIAQIKAFQKSKGLT	0.722
		16	119	133	KAFQKSKGLTVDGSA	1.794
		17	127	141	LTVDGSAGPATLSAL	1.191
		18	132	146	SAGPATLSALIALVE	0.567
		19	137	151	TLSALIALVESGDTG	0.626
		20	145	159	VESGDTGVFAKAAQK	0.518
		21	156	170	AAQKGLNKFQAKLEI	1.527
		22	165	179	GAKLEIDGIFGASSV	0.516
		23	175	189	GASSVAATKKLQTAN	1.777
		24	182	196	TKKLQTANGLTASGK	1.926
		25	190	204	GLTASGKVGSTWSL	2.314

Tabela 6 - Predição dos epítomos imunogênicos que se ligaram aos alelos do MHC II.

(continuação)

Caracterização funcional	Epítomos imunogênicos/ número de epítomos ligados ao MHC II (% de imunogênicos)	Número de sequência	Início do peptídeo	Fim do peptídeo	Sequência	VaxiJen v.2.0
		26	195	209	GKVGGSTWSLFFGGA	0.888
		27	207	221	GGAGKVAADCNDVKA	1.544
		28	212	226	VAADCNDVKASVAKS	1.365
		29	217	231	DNVKASVAKSATTLV	1.232
		30	222	236	SVAKSATTLVGDFRV	2.184
		31	227	241	ATTLVGDFRVHKCLA	2.124
		32	235	249	RVHKCLASNLKAMLA	1.771
		33	240	254	LASNLKAMLAAKAD	1.344
		34	245	259	KAMLAAKADGVTLS	1.245
		35	261	275	RSSYRSTEEQIAIRK	0.890
		36	269	283	EQIAIRKQYCGTTHY	2.275
		37	274	288	RKQYCGTTHYDIYEK	1.098
		38	301	315	GTTRHERGLAIDFLN	2.071
		39	310	324	AIDFLNCRDTTACFK	1.833
		40	316	330	CRDTTACFKWLSAHA	0.566
		41	321	335	ACFKWLSAHAACYHF	1.237
		42	326	340	LSAHAACYHFKNYPP	1.170
		43	331	345	ACYHFKNYPPENWHW	1.241

Tabela 6 - Predição dos epítomos imunogênicos que se ligaram aos alelos do MHC II.

Caracterização funcional	Epítomos imunogênicos/ número de epítomos ligados ao MHC II (% de imunogênicos)	Número de sequência	Início do peptídeo	Fim do peptídeo	Sequência	VaxiJen v.2.0
<i>Cutinase</i>	19/33 (60,6%)	1	24	38	DERQLLSSTRNDLEN	1.002
		2	54	68	ASTEIGNMGASAGPS	1.373
		3	59	73	GNMGASAGPSVASGL	1.568
		4	64	78	SAGPSVASGLDSRFG	2.373
		5	69	83	VASGLDSRFGDVWVQ	0.855
		6	84	98	GVGGPYTAGLAENFL	0.798
		7	105	119	AAIDEAKRLFTMANT	0.951
		8	110	124	AKRLFTMANTKCPNT	1.437
		9	116	130	MANTKCPNTPIVAGG	1.123
		10	126	140	IVAGGYSQGTAVMSN	1.121
		11	131	145	YSQGTAVMSNAVSEL	0.663
		12	136	150	AVMSNAVSELSATIK	0.541
		13	153	167	VKGVVLFGYTKNLQN	0.794
		14	172	186	PNFPSSKTKVYCAAT	1.583
		15	177	191	SKTKVYCAATDAVCF	0.859
		16	186	200	TDAVCFGTLFILPAH	0.924
		17	197	211	LPAHFLYTTDASISA	1.446
		18	202	216	LYTTDASISAPIWLA	1.398

Tabela 6 - Predição dos epítomos imunogênicos que se ligaram aos alelos do MHC II.

Caracterização funcional	Epítomos imunogênicos/ número de epítomos ligados ao MHC II (% de imunogênicos)	Número de sequência	Início do peptídeo	Fim do peptídeo	Sequência	VaxiJen v.2.0
		19	207	221	ASISAPIWLRQINA	1.096
<i>Beta-1,3-mannanase</i>	30/57 (54,3%)	1	12	26	WAATVSAQSLKSWAG	2.443
		2	21	35	LKSWAGTNSYFLQSL	1.724
		3	27	41	TNSYFLQSLDDGQQV	1.204
		4	36	50	DDGQQVKHIQDLAAL	1.505
		5	50	64	LGVKAIRLWVREQLS	0.784
		6	63	77	LSHCEKGSVRGQTCR	0.710
		7	81	95	NQEFGGVGRYDPVTM	1.285
		8	100	114	KTLLNIQTHGKGMKV	1.893
		9	105	119	IQTHGKGMKVIISPH	3.541
		10	110	124	KGMKVIISPHDSNSV	2.038
		11	115	129	IISPHDSNSVQNSYT	0.546
		12	121	135	SNSVQNSYTLKYPQN	1.229
		13	126	140	NSYTLKYPQNDFYHN	0.556
		14	145	159	ADYDNRLKYIMEYQG	0.827
		15	150	164	RLKYIMEYQGQYMKR	0.758
		16	158	172	QGQYMKRPWKDLHDL	1.333

Tabela 6 - Predição dos epítomos imunogênicos que se ligaram aos alelos do MHC II.

Caracterização funcional	Epítomos imunogênicos/ número de epítomos ligados ao MHC II (% de imunogênicos)	Número de sequência	Início do peptídeo	Fim do peptídeo	Sequência	VaxiJen v.2.0
		17	163	177	KRPWKDLHDLIIAFD	1.616
		18	168	182	DLHDLIIAFDVQNEP	0.728
		19	173	187	IIAFDVQNEPLLAYK	1.166
		20	211	225	NMRKILGADNPIKIA	3.267
		21	216	230	LGADNPIKIASGGIG	1.675
		22	221	235	PIKIASGGIGGDANN	1.744
		23	242	256	DAMKCPDLDVIALHI	1.482
		24	247	261	PDLDVIALHIYPDRN	2.203
		25	256	270	IYPDRNGGGIEKHFA	1.397
		26	267	281	KHFADWSKQGGGGKL	2.407
		27	303	317	DPNVKDWDVPAAFKA	1.433
		28	308	322	DWDVPAAFKASAEKL	0.822
		29	357	371	ITQKKVDFAGPMKAA	1.167
		30	362	376	VDFAGPMKAAADANL	1.8674

Fonte: Da autora.

5.9 MODELAGEM MOLECULAR PROTEICA

Na análise de seleção dos *templates* pelo PSI-BLAST, para serem utilizados na modelagem por homologia, apenas 3 das 8 proteínas tiveram uma taxa de identidade > 40%. Estas são a *Alpha-1,3-glucanase*, com similaridade de 42%, a *Glycoprotein*, com 42% e a *Cutinase*, com 72%. As demais proteínas não possuíam *templates* confiáveis para geração de modelos homólogos em formatos tridimensionais, que seriam construídos de forma incompleta como mostra a Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados da análise no PSI-BLAST para a busca de *templates* para modelagem por homologia.

Proteínas	Identidade máxima
<i>Major allergen Asp F2</i>	37%
<i>Alpha-1,3-glucanase</i>	42%
<i>Glyoxal oxidase precursor</i>	25%
<i>Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98</i>	36%
<i>Glycoprotein</i>	42%
<i>Curculin domain protein (mannose-binding) lectin</i>	38%
<i>Cutinase</i>	72%
<i>Beta-1,3-mannanase</i>	39%

*A tarja cinza indica as proteínas que tiveram uma identidade > 40%.

Fonte: Da autora.

Desta forma, optou-se por utilizar somente o método de modelagem *Threading*, utilizando o *software* I-TASSER, para a modelagem das 8 proteínas. De acordo com o método foram gerados 5 modelos de cada uma das proteínas ordenados pelos seus valores de *C-score* e *TM-score*. Para todas as proteínas analisadas, os modelos mais confiáveis foram os de número 1, pois estes possuíam *C-score* mais alto e um *TM-Score* calculado apenas para estes primeiros modelos, o que está relacionado a acurácia do modelo gerado. Sendo assim os primeiros modelos para cada uma das 8 proteínas foram selecionados como os modelos hipotéticos mais confiáveis para remontagem da possível estrutura tridimensional das proteínas em estudo. A Tabela 8 resume os valores de *C-score* e *TM-Score* encontrados em cada proteína analisada.

Tabela 8 - Parâmetros dos modelos ranqueados pelo *software* I-TASSER para as 8 proteínas.
(continua)

Caracterização funcional	Modelo	<i>C-score</i>	<i>TM-Score</i>
<i>Major allergen Asp F2</i>	1	-1.37	0.55 ± 0.15
	2	-2.38	-
	3	-2.64	-
	4	-3.37	-
	5	-2.97	-
<i>Alpha-1,3-glucanase</i>	1	-1.60	0.52 ± 0.15
	2	-1.70	-
	3	-2.34	-
	4	-2.58	-
	5	-2.18	-
<i>Glyoxal oxidase precursor</i>	1	-2.09	0.57 ± 0.15
	2	-2.36	-
	3	-2.97	-
	4	-3.33	-
	5	-2.11	-
<i>Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98</i>	1	-2.54	0.42 ± 0.14
	2	-3.52	-
	3	-3.67	-
	4	-3.54	-
	5	-2.92	-
<i>Glycoprotein</i>	1	-2.20	0.45 ± 0.15
	2	-2.34	-
	3	-2.32	-

Tabela 8 - Parâmetros dos modelos ranqueados pelo *software* I-TASSER para as 8 proteínas.

(conclusão).

Caracterização Funcional	Modelo	<i>C-Score</i>	<i>TM-Score</i>
	4	-3.08	-
	5	-4.12	-
<i>Curculin domain protein (mannose-binding) lectin</i>	1	-3.03	0.37 ± 0.13
	2	-3.33	-
	3	-4.45	-
	4	-4.90	-
	5	-4.95	-
<i>Cutinase</i>	1	0.53	0.78 ± 0.09
	2	-2.81	-
	3	-3.70	-
	4	-4.15	-
	5	-4.44	-
<i>Beta-1,3-mannanase</i>	1	-0.69	0.63 ± 0.14
	2	-1.07	-
	3	-0.74	-
	4	-1.30	-
	5	-0.99	-

*Os modelos destacados em negrito foram os selecionados para a próxima etapa.

Fonte: Da autora.

5.10 VISUALIZAÇÃO E MAPEAMENTO DOS EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS DOS MODELOS PROTEICOS

Para visualização dos modelos gerados pelo *software* I-TASSER, os arquivos no formato PDF da modelagem molecular das 8 proteínas de *T. asahii* foram visualizados em

formato tridimensional no *software* VMD 1.9.3. Foi verificado que todas as proteínas modeladas, independentemente de seu tamanho, apresentaram regiões de α -hélice, folhas β -pregueada e presença de *coils* que foram regiões que não tiveram estruturas secundárias definidas.

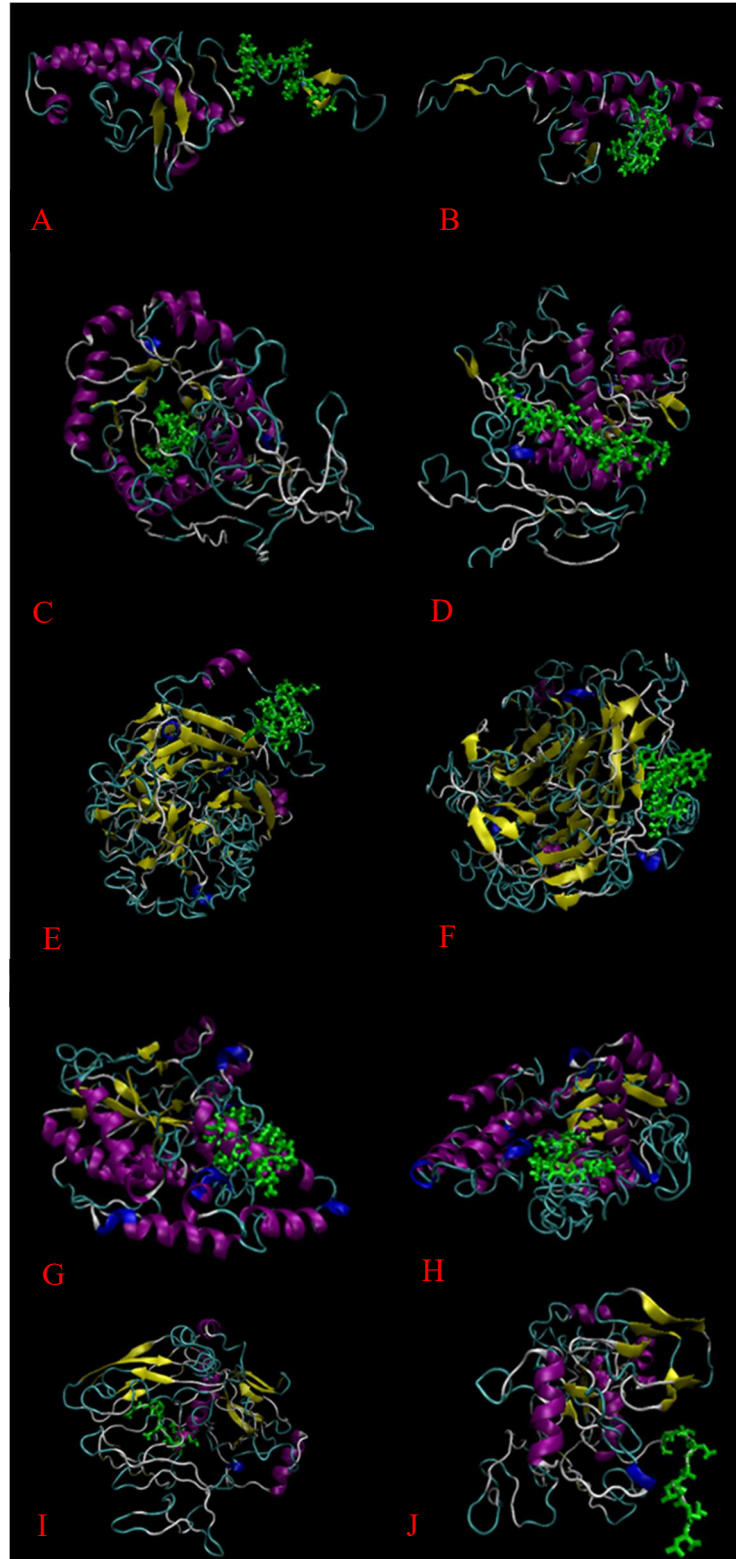


Figura 4 - Modelos 3D das estruturas proteicas para proteção cruzada com destaque das porções N-terminal e C-terminal destacadas em verde. A e B. *Major allergen Asp F2*, C e D. *Alpha-1,3-glucanase*, E e F. *Glyoxal oxidase precursor*, G e H. *Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98* e I e J. *Glycoprotein*. Em magenta: α -hélices, em amarelo: folhas β -pregueadas, em azul: regiões que não foram modeladas por completo.

Fonte: Da autora.

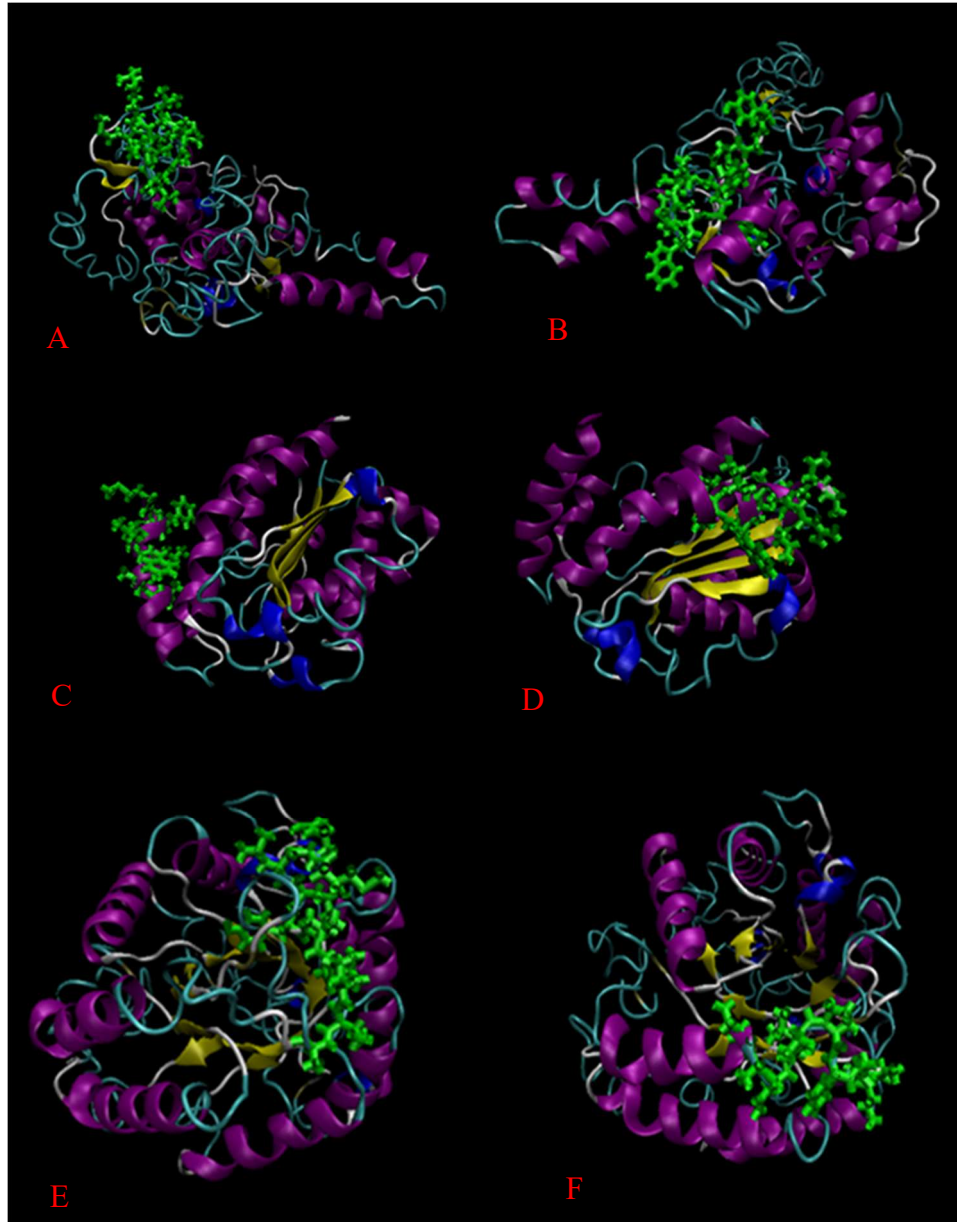


Figura 5 - Modelos 3D das 3 estruturas proteicas para proteção exclusiva contra *T. asahii*, com destaque das porções N terminal e C terminal destacadas em verde. A e B. *Curculin domain protein (mannose-binding) lectin*, C e D. *Cutinase* e E e F. *Beta-1,3-mannanase*. Em magenta: α -hélices, em amarelo: folhas β -pregueadas, em azul: regiões que não foram modelados por completo.

Fonte: Da autora.

Com a modelagem molecular foi possível observar as estruturas secundárias de cada uma das 8 proteínas selecionadas. Foi possível perceber que a proteínas *Major allergen Asp F2* possui mais α -hélices (magenta) do que as folhas β -pregueadas (amarela), não possuindo nenhuma região que teve alinhamento incompleto, é evidente a presença de *coils* (branco) principalmente nas regiões N e C terminal (verde) como mostra a Figura 4 A e B

Já para a proteína *Alpha-1,3-glucanase*, foi visto que esta também possui maior quantidade de α -hélices (mangenta) do que as folhas β -pregueadas (amarela), porém existem regiões que tiveram o alinhamento incompleto (azul), foram identificados também vários *coils*(branco), inclusive nas porções N e c terminal (verde), como mostra a Figura 4 C e D.

Na proteína *Glyoxal oxidase precursor*,foi possível perceber que ao contrário das descritas acima, esta possui uma maior quantidade de folhas β -pregueadas (amarela) em relação as α -hélices (mangenta) , possui também regiões que tiveram o alinhamento incompleto (azul), e presença de *coils* na esturtuta tridimensional inteira assim como nas porções N e C terminal (verde) como mostrado na Figura 4 E e F.

Para *Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98*, foram encontradas mais α -hélices (mangenta) do que folhas β -pregueadas (amarela), porém nas α -hélices foi visto maior quantidade de regiões com alinhamentos incompletos na região N terminal (verde) não foi vista a presença de *coils*(branco) e sim de regiões com α -hélices, ao contrário da região C terminal (verde), que teve presença de *coils* assim como na estrutura inteira, como mostrado na Figura 4 G e H.

Na *Glycoprotein*, foi evidenciado uma menor quantidade regiões secundárias em relação aos *coils*(branco), porém foi possível perceber uma maior quantidade de α -hélices (mangenta) com presença de alinhamentos incompletos (azul), foi visto também que as porções N e C terminal (verde) não tiveram suas estruturas secundárias modelada Figura 4 I e J.

Nas modelagens das 3 proteínas com proteção exclusiva para *T. asahii*, foi possível evidenciar aque, a proteína *Curculin domain protein (mannose-binding) lectin*, teve maior quantidade de α -hélices (mangenta) do que de folhas β -pregueadas (amarela), poucas regiões de alinhamento incompleto (azul) e presença de *coils* em toda estrutura assim como nas porções N e C terminal (verde), como demonstrado na Figura 5 A1 e A2.

Já para a *Cutinase* foi observado que maior quantidade de α -hélices (mangenta) do que de folhas β -pregueadas (amarela), menor presença de *coils* (branco) em toda a estrutura proteica em relação as regiões secundárias e diferentemente das outras proteínas foi a única que teve as estruturas secundárias das porções e C terminal com estruturas secundárias α -hélices modeladas, como mostrado na Figura 5 C e D.

E para a proteína *Beta-1,3-mannanase*, foi evidenciado maior quantidade de α -hélices do de folhas β -pregueadas (amarelo), presença de regiões incompletas (azul) e presença de coils (branco) em ambas as porções, como demonstrado na Figura 5 E e F.

A partir dos modelos tridimensionais das proteínas de interesse, foi realizado o mapeamento dos epítomos preditos como imunogênicos, buscando-se selecionar os potenciais candidatos vacinais.

Foi evidenciado que na proteína *Major allergen Asp F2*, todos 18 epítomos preditos como imunogênicos foram localizados do lado externo do modelo proteico, uma vez que a proteína possui tamanho reduzido, apenas 170 aminoácidos, enquanto que as demais proteínas, houve uma variação no número de epítomos nas regiões externas (Tabela 9). Na proteína *Alpha-1,3-glucanase*, teve 38 epítomos imunogênicos, 23 foram preditos como externos. Já na proteína *Glyoxal oxidase precursor*, de 54 epítomos imunogênicos, 40 são externos. Na proteína *Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98*, foi observado que dos 39 epítomos imunogênicos, 29 foram localizados externamente a estrutura protéica. Para a *Glycoprotein*, foi evidenciado que dos 28 epítomos imunogênicos, 22 foram preditos como externos. Para a proteína *Curculin domain protein (mannose-binding) lectin*, foi visto que dos dos 43 epítomos imunogênicos, 37 foram localizados como externos. Para a *Cutinase* dos 20 epítomos imunogênicos 16 foram preditos como externos e por fim para a proteína *Beta-1,3-mannanase* dos 31 epítomos imunogênicos 18 foram localizados como externos.

Tabela 9 - Mapeamento dos epítomos imunogênicos nos modelos proteicos tridimensionais.

(continua)

Proteínas	Início	Fim	Seqüência	VaxiJen v2.0	Mapeamento dos epítomos	Cobertura populacional % – Alelos MHC II
<i>Major allergen Asp F2</i>	6	20	LLTLGAAASASAGPI	1.081	Externo	93.74%
	11	25	AAASASAGPILIPRE	0.787	Externo	78.86%
	24	38	RELKEYSADVELHSS	2.211	Externo	94.63%
	32	46	DVELHSSCNATQQR	1.078	Externo	80.70%
	37	51	SSCNATQQRMLKQAL	0.559	Externo	82.37%
	43	57	QQRMLKQALGEMNEV	1.324	Externo	96.25%
	49	64	QALGEMNEVTSFAIE	1.648	Externo	94.61%
	54	68	MNEVTSFAIEYLEHN	0.674	Externo	99.95%
	65	79	LEHNGAQDQVFTTYF	1.092	Externo	56.45%
	70	84	AQDQVFTTYFGTEPE	2.239	Externo	93.82%
	75	89	FTTYFGTEPEAYPTV	1.822	Externo	99.12%
	80	94	GTEPEAYPTVIGAYK	0.841	Externo	56.45%
	85	99	AYPTVIGAYKALLSA	1.1673	Externo	99.97%

Tabela 9 - Mapeamento dos epítomos imunogênicos nos modelos proteicos. tridimensionais.

(continuação)

Proteínas	Início	Fim	Sequência	VaxiJen v2.0	Mapeamento dos epítomos	Cobertura populacional % – Alelos MHC II
<i>Alpha-1,3-glucanase</i>	90	104	IGAYKALLSANKKGV	1.167	Externo	95.50%
	118	132	DGWRGHYRGENATTE	1.228	Externo	56.45%
	123	137	HYRGENATTETVICD	0.604	Externo	61.47%
	148	162	AFCMFGFQLAKDKPS	1.274	Externo	99.68%
	156	170	LAKDKPSTYWSIDLM	1.192	Externo	89.03%
	12	26	LAAATVVSAAAPHIDP	1.351	Externo	95.06%
	17	31	VVSAAPHIDPRHKLH	0.832	Externo	65.98%
	33	47	RATIDSKTREVFAHF	0.791	Externo	21.89%
	53	67	PAYTQDDWVIDMELA	2.192	Externo	98.74%
	58	72	DDWVIDMELAQHYGI	3.152	Interno	99.94%
	65	79	ELAQHYGIDGFALNV	2.850	Interno	96.97%
	70	84	YGIDGFALNVGADSW	2.319	Interno	93.99%
	94	108	AAAQRVGNFSNFLSF	1.481	Interno	99.21%
	99	113	VGNFSNFLSFDNFWY	3.297	Interno	99.31%
	104	118	NFLSFDNFWYNESST	1.544	Externo	98.47%
	109	123	DFNWNESSTKEIAE	1.091	Externo	43.06%
	115	129	ESSTKEIAELVKKYA	1.227	Externo	25.39%
	123	137	ELVKKYADHPNQLRV	1.770	Externo	15.74%
	132	146	PNQLRVDDKPFVSTF	1.251	Externo	27.79%
	147	161	VGDGFNWTHVEELVG	0.877	Externo	99.53%
	153	167	WTHVEELVGHQIYAV	1.938	Externo	99.22%
	160	174	VGHQIYAVPCWRETK	0.823	Interno	99.36%
	171	185	RETKENAANPNVEGL	0.507	Externo	56.45%
	176	190	NAANPNVEGLMSWAA	0.841	Interno	77.32%
	181	195	NVEGLMSWAAWPGQA	0.853	Interno	84.05%
	186	200	MSWAAWPGQANNNT	0.589	Externo	56.45%
	204	218	PLSGDLDIQYMQDLQ	2.694	Externo	76.04%
	209	223	LDIQYMQDLQAKPYM	1.495	Externo	98.82%
	214	228	MQDLQAKPYMAPVSP	1.087	Interno	79.90%
	221	235	PYMAPVSPWFSTHFG	1.787	Interno	79.09%
226	240	VSPWFSTHFGKDVAV	1.307	Interno	97.02%	
233	247	HFGKDVAVSKNWIFK	2.012	Externo	98.75%	
243	257	NWIFKSEDLWTYRWY	1.157	Interno	99.58%	

Tabela 9 - Mapeamento dos epítomos imunogênicos nos modelos proteicos tridimensionais.

(continuação)

Proteínas	Início	Fim	Sequência	VaxiJen v2.0	Mapeamento dos epítomos	Cobertura populacional % – Alelos MHC II
	248	262	SEDLWTYRWYQMLQL	1.028	Interno	99.73%
	274	288	DYGESHYVGPYNQPH	1.209	Interno	56.45%
	322	336	DPVVEEDKLVYWFRP	0.559	Externo	95.02%
	332	346	YWFRPHLKTASCDAT	0.986	Interno	85.88%
	371	385	NGAKIVVQSGKDTPF	0.894	Externo	78.40%
	394	408	HTFKHKMAPGVQQFL	0.896	Externo	92.13%
	399	413	KMAPGVQQFLIETDA	1.720	Externo	99.58%
	404	418	VQQFLIETDAGKAAG	2.701	Externo	99.62%
	409	423	IETDAGKAAGASNLT	2.385	Externo	74.36%
	414	428	GKAAGASNLTVSDQC	0.626	Externo	74.36%
<i>Glyoxal oxidase precursor</i>	20	34	TNRHRHLARQASAAA		Externo	92.13%
				0.711		
	25	39	HLARQASAAAGSSAS	1.379	Externo	88.63%
	30	44	ASAAAGSSASDVGQS	1.282	Externo	74.36%
	36	50	SSASDVGQSTTISFL	1.669	Externo	0.00%
	41	55	VGQSTTISFLDGDVAV	1.183	Externo	97.99%
	59	73	FVEKGDGVSQAQMMF	1.377	Interno	92.35%
	64	78	DSGVSAQMMFLGTKN	1.190	Interno	90.21%
	82	96	ILDKAENSLQIGGH	0.974	Interno	17.82%
	91	105	LQIGGHPAWGTYKIDL	3.706	Externo	56.45%
	101	115	TKYDLKSHEATPMAV	1.399	Externo	88.05%
	108	122	HEATPMAVTSNTFCA	0.754	Externo	81.70%
	123	137	GGLHVANGSWAVFGG	1.226	Interno	88.87%
	129	143	NGSWAVFGGNQPVTH	2.289	Externo	64.09%
	134	148	VFGGNQPVTHGGVAV	1.821	Externo	56.45%
	151	165	KVQNPTGVNPNYLNLD	1.603	Externo	56.45%
	159	173	NPYLNTDGGEAVRVI	2.105	Interno	73.48%
	188	202	PDLTMTGKRWYPTVE	0.628	Externo	41.16%
	203	217	GLADGSVIVIGGDFN	1.696	Interno	74.36%
	208	222	SVIVIGGDFNGGYVA	1.425	Interno	61.47%
	214	228	GDFNGGYVAVKEQNN	0.893	Externo	78.86%

Tabela 9 - Mapeamento dos epítomos imunogênicos nos modelos proteicos tridimensionais.
(continuação)

Proteínas	Início	Fim	Sequência	VaxiJen v2.0	Mapeamento dos epítomos	Cobertura populacional % – Alelos MHC II
	272	286	AKKTILYDMDTRQEI	0.940	Externo	98.77%
	277	291	LYDMDTRQEIPLPDM	1.295	Externo	17.84%
	288	302	LPDMPYASRVYPASA	0.527	Externo	82.29%
	301	315	SAAAAMLPLTPANNY	1.049	Interno	87.26%
	309	323	LTPANNYTVELVFCG	1.775	Externo	93.65%
	334	348	DGNPGYNVTAVPADN	0.893	Externo	89.32%
	339	353	YNVTAVPADNTCVRI	0.801	Externo	77.32%
	349	363	TCVRIRPDDPSPQYE	0.966	Externo	17.84%
	368	382	LPEGRSMGSLVYLPD	1.641	Interno	77.32%
	383	397	GTMWLGNGVKMG TG	0.954	Interno	89.66%
	393	407	MGTAGYSDRNYSVGM	0.613	Externo	56.45%
	398	412	YSDRNYSVGMSLGQN	2.813	Externo	85.99%
	405	419	VGMSLGQNPIYTPVV	0.728	Externo	65.97%
	415	429	YTPVVYNPNAPSGRR	1.570	Externo	88.22%
	429	443	RFNRDGLGTSTQERM	0.804	Externo	56.45%
	462	476	NPNPDVTMSLWPTKY	1.660	Externo	25.39%
	467	481	VTMSLWPTKYSVEKW	1.312	Externo	95.73%
	472	486	WPTKYSVEKWYPSWY	1.850	Interno	95.28%
	498	512	ESLSYGGDAWSLTYN	2.172	Externo	61.47%
	503	517	GGDAWSLTYN DASAD	1.188	Externo	61.33%
	532	546	THGMNFGQRYLELAT	0.614	Interno	97.98%
	537	551	FGQRYLELATSTTVD	0.932	Interno	95.29%
	553	567	DKNQIKVHVSQ LPPN	1.009	Externo	59.34%
	558	572	KVHVSQ LPPNPNLFT	0.912	Externo	48.63%
	588	602	EGEMVLIGNGQIGKQ	1.713	Interno	88.87%
	596	610	NGQIGKQPVGPATVL	2.120	Externo	61.47%
	601	615	KQPVGPATVLPQPEV	0.738	Externo	91.35%
	624	638	SPSPSPKATPSAKLI	0.743	Externo	56.45%
	629	643	PKATPSAKLIVEEES	1.143	Externo	94.55%
	634	648	SAKLIVEEESPAVKE	1.320	Externo	93.45%
	644	658	PAVKEAGNKPQVAVA	0.741	Externo	56.45%

Tabela 9 - Mapeamento dos epítomos imunogênicos nos modelos proteicos tridimensionais.
(continuação)

Proteínas	Início	Fim	Sequência	VaxiJen v2.0	Mapeamento dos epítomos	Cobertura populacional % – Alelos MHC II
<i>Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98</i>	652	666	KPQVAVADPNKAAVK	1.039	Externo	64.21%
	659	673	DPNKAAVKSGAGNLS	0.838	Externo	64.09%
	664	678	AVKSGAGNLSSPILF	0.709	Externo	83.08%
	11	25	ILGAVSAHTGCGGHE	1.175	Externo	77.32%
	18	32	HTGCGGHEIGARNLG	2.227	Externo	56.45%
	23	37	GHEIGARNLGGRVIS	1.832	Externo	63.30%
	28	42	ARNLGGRVISKRQVA	1.762	Externo	67.50%
	34	48	RVISKRQVADNVEDV	0.596	Externo	4.47%
	58	72	EPAAKITKEYPVAWQ	1.9217	Interno	42.90%
	89	103	QINKTLGEKFANIPV	0.511	Externo	96.77%
	94	108	LGEKFANIPVRPAEG	0.705	Externo	92.13%
	99	113	ANIPVRPAEGTEGND	1.727	Externo	56.45%
	158	172	CSHNALYNFLGKENQ	0.640	Externo	93.80%
	164	178	YNFLGKENQRATMFF	0.622	Interno	80.88%
	179	193	IGSNVIDWPVQAIRA	0.676	Interno	96.00%
	184	198	IDWPVQAIRAKTDGH	1.039	Externo	80.87%
	194	208	KTDGHEICHTWSHA	2.348	Interno	22.44%
	199	213	EICHTWSHAKMTSV	0.989	Interno	99.70%
	205	219	WSHAKMTSVSSEQAF	1.109	Externo	95.56%
	210	224	MTSVSSEQAFAELYY	0.686	Externo	99.51%
240	254	WRPPYGDVDNRIRAI	0.784	Externo	17.84%	
245	259	GDVDNRIRAIQHMN	1.087	Externo	90.98%	
250	264	RIRAIQHMNLTNIV	1.162	Externo	96.83%	
270	284	FDWQIGTNGVTQETV	1.494	Externo	61.47%	
279	293	VTQETVAGNYQKVID	2.093	Externo	56.45%	
284	298	VAGNYQKVIDKAKNG	0.679	Externo	10.54%	
310	324	HEINNNTMSELIAQY	0.623	Interno	66.80%	
315	329	NTMSELIAQYPKIKE	0.696	Interno	99.68%	
338	352	NVGYNITHPYAEEDY	0.895	Externo	76.67%	

Tabela 9 - Mapeamento dos epítomos imunogênicos nos modelos proteicos tridimensionais.
(continuação)

Proteínas	Início	Fim	Sequência	VaxiJen v2.0	Mapeamento dos epítomos	Cobertura populacional % – Alelos MHC II
	348	362	AEDYFYFPNFEQYVA	0.783	Externo	99.05%
	353	367	FYPNFEQYVAGTRNY	1.938	Externo	98.47%
	358	372	EQYVAGTRNYSSTPI	0.956	Externo	86.63%
	363	377	GTRNYSSTPIDGVQP	0.512	Externo	71.26%
	368	382	SSTPIDGVQPSSAS	0.768	Externo	61.47%
	374	388	GVQPSSASGSAGAS	2.086	Externo	56.45%
	381	395	ASGSAGASGSAGATG	3.255	Externo	56.45%
	389	403	GSAGATGGAGAASGS	2.660	Interno	56.45%
	397	411	AGAASGSGSASAGGA	2.008	Interno	56.45%
	403	417	SGSASAGGATKSGAS	1.743	Externo	56.45%
	420	434	QKNSGAVQNAVAGSL	0.561	Interno	78.86%
	425	439	AVQNAVAGSLAAVGA	1.474	Externo	84.47%
	431	445	AGSLAAVGAALALLA	1.525	Externo	98.79%
Glycoprotein	6	20	AAALLASSGVSAQVT	0.570	Interno	97.66%
	11	25	ASSGVSAQVTAAPFN	1.055	Interno	93.75%
	40	54	AQVNQTSLSRLLSLN	1.928	Externo	99.78%
	136	150	HGAKNLGNPIGGNVT	2.712	Externo	56.45%
	142	156	GNPIGGNVTTNLATG	2.703	Interno	74.36%
	147	161	GNVTTNLATGEDVFY	1.441	Interno	92.99%
	152	166	NLATGEDVFYEEWMS	1.205	Interno	98.74%
	157	171	EDVFYEEWMSFISFD	0.925	Externo	99.89%
	163	177	EWMSFISFDQFCLRI	1.127	Externo	99.95%
	168	182	ISFDQFCLRICTAEV	2.025	Externo	99.22%
	173	187	FCLRICTAEVNGTTT	2.415	Externo	92.75%
	179	193	TAEVNGTTTALQCEH	1.671	Externo	92.32%
	184	198	GTTTALQCEHELDIM	0.836	Externo	49.64%
	193	207	HELDIMGCRWVMAIT	2.211	Externo	98.90%
	200	214	CRWVMAITDFEASRT	1.610	Externo	99.94%
	205	219	AITDFEASRTTGTFE	1.426	Interno	76.19%
	213	227	RTTGFTECDGEIAMA	1.083	Interno	61.47%
	277	291	SNCKTYSTISNGVDM	1.007	Externo	85.99%

Tabela 9 - Mapeamento dos epítomos imunogênicos nos modelos proteicos tridimensionais.
(continuação)

Proteínas	Início	Fim	Sequência	VaxiJen v2.0	Mapeamento dos epítomos	Cobertura populacional % – Alelos MHC II
	285	299	ISNGVDMKDLMVKAA	0.529	Externo	44.85%
	311	325	VTGLPSTTPATVTP	0.647	Externo	61.47%
	328	342	VPPSVTPSAGAGSS	0.782	Externo	56.45%
	348	362	DGGKDGASSDSAAAG	1.494	Externo	56.45%
	353	367	GASSDSAAAGAETTK	1.750	Externo	91.35%
	358	372	SAAAGAETTKNGDSA	1.9314	Externo	56.45%
	364	378	ETTKNGDSAAAGKPA	1.766	Externo	56.45%
	370	384	DSAAAGKPAGGAGAL	1.284	Externo	56.45%
	375	389	GKPAGGAGALSAPAL	2.044	Externo	77.32%
	385	399	SAPALLASVCGVALG	1.514	Externo	82.67%
	390	404	LASVCGVALGALALL	1.261	Externo	91.07%
<i>Curculin domain protein (mannose-binding) lectin</i>	8	22	TLIAPLAALSALAAP	0.599	Externo	99.33%
	30	44	ATRDEADVIVGRALA	1.669	Externo	78.40%
	35	49	ADVIVGRALASVDPS	1.341	Externo	96.96%
	40	54	GRALASVDPSTTSVT	0.981	Externo	68.51%
	46	60	VDPSTTSVTDIEREI	1.146	Externo	52.05%
	56	70	IEREISRVEVGAHAL	0.940	Externo	79.90%
	61	75	SRVEVGAHALAARDV	1.422	Externo	94.61%
	66	80	GAHALAARDVKGDAF	0.824	Externo	77.32%
	72	86	ARDVKGDAFVTANS	1.589	Externo	74.36%
	77	91	KDAFVTANSGIHSIQ	0.568	Externo	93.06%
	85	99	SGIHSIQCLQYLLTA	0.867	Interno	98.81%
	90	104	IQCLQYLLTARGFRT	0.800	Interno	99.78%
	95	109	YLLTARGFRTDRDGI	0.910	Externo	99.57%
	109	123	ILGADTIAQIKAFQK	0.986	Externo	96.97%
	114	128	TIAQIKAFQKSKGLT	0.722	Externo	99.15%
	119	133	KAFQKSKGLTVDGSA	1.794	Externo	92.75%
	127	141	LTVDGSAGPATLSAL	1.191	Externo	77.32%

Tabela 9 - Mapeamento dos epítomos imunogênicos nos modelos proteicos tridimensionais.
(continuação)

Proteínas	Início	Fim	Sequência	VaxiJen v2.0	Mapeamento dos epítomos	Cobertura populacional % – Alelos MHC II
	132	146	SAGPATLSALIALVE	0.567	Externo	98.05%
	137	151	TLSALIALVESGDTG	0.626	Externo	95.56%
	145	159	VESGDTGVFAKAAQK	0.518	Externo	74.36%
	156	170	AAQKGLNKFGAKLEI	1.527	Externo	88.46%
	165	179	GAKLEIDGIFGASSV	0.516	Externo	97.16%
	175	189	GASSVAATKKLQTAN	1.777	Externo	86.13%
	182	196	TKKLQTANGLTASGK	1.926	Externo	92.75%
	190	204	GLTASGKVGSTWSL	2.314	Externo	56.45%
	195	209	GKVGSTWSLFFGGA	0.888	Externo	89.56%
	207	221	GGAGKVAADCNDVKA	1.544	Externo	56.45%
	212	226	VAADCNDVKASVAKS	1.365	Externo	77.32%
	217	231	DNVKASVAKSATTLV	1.232	Externo	89.76%
	222	236	SVAKSATTLVGDFRV	2.184	Externo	85.36%
	227	241	ATTLVGDFRVHKCLA	2.124	Externo	96.34%
	235	249	RVHKCLASNLKAMLA	1.771	Interno	99.78%
	240	254	LASNLKAMLAATAKAD	1.344	Interno	95.50%
	245	259	KAMLAATAKADGVTLS	1.245	Externo	93.06%
	261	275	RSSYRSTEEQIAIRK	0.890	Externo	85.40%
	269	283	EQIAIRKQYCGTTHY	2.275	Externo	25.39%
	274	288	RKQYCGTTHYDIYEK	1.098	Externo	84.19%
	301	315	GTTRHERGLAIDFLN	2.071	Interno	82.05%
	310	324	AIDFLNCRDTTACFK	1.833	Externo	28.60%
	316	330	CRDTTACFKWLSAHA	0.566	Externo	98.72%
	321	335	ACFKWLSAHAAKYHF	1.237	Externo	99.78%
	331	345	AKYHFKNYPENWHW	1.241	Externo	15.74%
<i>Cutinase</i>	24	38	DERQLLSSTRNDLEN	1.002	Externo	76.50%
	54	68	ASTEIGNMGASAGPS	1.373	Interno	77.32%
	59	73	GNMGASAGPSVASGL	1.568	Externo	77.32%
	64	78	SAGPSVASGLDSRFG	2.373	Externo	56.45%
	69	83	VASGLDSRFGDVWVQ	0.855	Externo	56.45%
	84	98	GVGGPYTAGLAENFL	0.798	Externo	96.90%

Tabela 9 - Mapeamento dos epítomos imunogênicos nos modelos proteicos tridimensionais.
(continuação)

Proteínas	Início	Fim	Sequência	VaxiJen v2.0	Mapeamento dos epítomos	Cobertura populacional % – Alelos MHC II
	105	119	AAIDEAKRLFTMANT	0.951	Externo	79.34%
	110	124	AKRLFTMANTKCPNT	1.437	Externo	56.10%
	116	130	MANTKCPNTPIVAGG	1.123	Interno	56.45%
	126	140	IVAGGYSQGTAVMSN	1.121	Interno	85.99%
	131	145	YSQGTAVMSNAVSEL	0.663	Interno	93.75%
	136	150	AVMSNAVSELSATIK	0.541	Externo	87.51%
	153	167	VKGVVLFGYTKNLQN	0.794	Externo	99.30%
	172	186	PNFPSSKTKVYCAAT	1.583	Externo	74.36%
	177	191	SKTKVYCAATDAVCF	0.859	Externo	88.05%
	186	200	TDAVCFGTLFILPAH	0.924	Externo	98.67%
	197	211	LPAHFLYTTDASISA	1.446	Externo	99.83%
	202	216	LYTTDASISAPIWLA	1.398	Externo	97.00%
	207	221	ASISAPIWLARQINA	1.096	Externo	99.39%
<i>Beta-1,3-mannanase</i>	12	26	WAATVSAQSLKSWAG	2.443	Externo	97.08%
	21	35	LKSWAGTNSYFLQSL	1.724	Interno	99.76%
	27	41	TNSYFLQSLDDGQQV	1.204	Interno	99.57%
	36	50	DDGQQVKHIQDLAAL	1.505	Externo	69.49%
	50	64	LGVKAIRLWVREQLS	0.784	Interno	99.80%
	63	77	LSHCEKGSVRGQTCR	0.710	Externo	56.45%
	81	95	NQEFGGVGRYDPVTM	1.285	Externo	56.45%
	105	119	IQTHGKGMKVIISPH	3.541	Interno	80.87%
	110	124	KGMKVIISPHDSNSV	2.038	Interno	72.95%
	115	129	IISPHDSNSVQNSYT	0.546	Interno	56.45%
	121	135	SNSVQNSYTLKYPQN	1.229	Externo	51.76%
	126	140	NSYTLKYPQNDFYHN	0.556	Externo	15.74%
	145	159	ADYDNRLKYIMEYQG	0.827	Externo	97.15%
	150	164	RLKYIMEYQGQYMKR	0.758	Externo	99.71%
	158	172	QGQYMKRPWKDLHDL	1.333	Externo	14.77%
	163	177	KRPWKDLHDLIIAFD	1.616	Interno	99.48%
	168	182	DLHDLIIAFDVQNEP	0.728	Interno	99.88%
	173	187	IIAFDVQNEPLLAYK	1.166	Externo	99.94%

Tabela 9 - Mapeamento dos epítomos imunogênicos nos modelos proteicos tridimensionais. (conclusão).

Proteínas	Início	Fim	Sequência	VaxiJen v2.0	Mapeamento dos epítomos	Cobertura populacional % – Alelos MHC II
	211	225	NMRKILGADNPIKIA	3.267	Externo	92.08%
	216	230	LGADNPIKIASGGIG	1.675	Interno	78.93%
	221	235	PIKIASGGIGGDANN	1.744	Interno	61.47%
	242	256	DAMKCPDLDVIALHI	1.482	Externo	15.74%
	247	261	PDLDVIALHIYPDRN	2.203	Interno	97.90%
	256	270	IYPDRNGGGIEKHFA	1.397	Externo	56.45%
	267	281	KHFADWSKQGGGGKL	2.407	Externo	56.45%
	303	317	DPNVKDWDVPAAFKA	1.433	Externo	61.47%
	308	322	DWDVPAAFKASAEKL	0.822	Externo	94.61%
	357	371	ITQKKVDFAGPMKAA	1.167	Externo	90.62%
	362	376	VDFAGPMKAAADANL	1.867	Externo	78.86%

Fonte: Da autora.

5.11 ANÁLISE DA COBERTURA POPULACIONAL DOS ALELOS QUE TIVERAM LIGAÇÃO COM OS EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS

As 8 proteínas selecionadas passaram pela análise de cobertura populacional mundial com ligação aos alelos do MHC II, sendo testados tanto os seus epítomos imunogênicos internos quanto os externos, utilizando a ferramenta *Population Coverage*, depositada no site do IEBD *Analysis Resource*. Nessas análises foi verificado que os variantes alélicos de MHC II testados quanto a sua possível ligação aos epítomos das 8 proteínas atingiram uma distribuição na população mundial de 99,98%.

Das 5 proteínas que conferem proteção para *T. asahii* e o gênero *Cryptococcus* spp. foi verificado que houve variação na taxa de cobertura populacional dos epítomos imunogênicos. Para a proteína *Major allergen Asp F2*, foi observado que todos os seus epítomos imunogênicos foram externos, sendo que a taxa de cobertura para os epítomos na modelagem 3D, variou entre 56,45% a 99,97%, sendo a média foi de 79,73%. Já para a proteína *Alpha-1,3-glucanase*, foi observado que a taxa de cobertura dos epítomos internos variou de 56,45% a 99,73%, com uma média de 76,55%, sendo que a taxa para os epítomos externos variou de 15,74% a 99,62%, como uma média de 77,85%. Na proteína *Glyoxal oxidase precursor*, foi evidenciado que seus

epítomos internos variou de 17,82 a 97,98% com uma média de 80,73%, já para os epítomos externos a taxa variou de 0,00% a 98,77%, com uma média de 69,69%. Para a proteína *Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98*, a taxa de seus epítomos internos variou de 22,4% a 99,70%, com uma média de 70,01%, e para os epítomos externos, houve uma variação na taxa de 4,47 % a 99,51%, com média de 68,52%. Por fim, para a *Glycoprotein*, foi observado que esta teve uma taxa de cobertura dos epítomos internos de 61,47% a 93,75%, com média de 85,02%, e para os epítomos externos foi verificada a variação de 44,85% a 99,95%, com média de 77,53%.

Finalmente, as análises para as 3 proteínas que conferem proteção exclusiva para *T. asahii.*, mostraram que epítomos da proteína *Curculin domain protein (mannose-binding) lectin* apresentam uma taxa de cobertura dos epítomos internos variando de 95,50% a 99,78%, com média de 95,98%, e para os epítomos externos a cobertura variou de 25,38% a 99,78%, sendo que a média foi de 80,94%. Já para a *Cutinase*, foi visto que a taxa de cobertura dos epítomos internos variou de 56,45% a 93,75% com uma média de 78,37%, e para os epítomos externos a variação foi de 56,10% a 99,83%, com média de 82,53% e a proteína *Beta-1,3-mannanase* obteve uma taxa de cobertura para os epítomos internos variando de 56,45% a 99,88%, com média de 72,85%, e para os epítomos externos, com taxa de cobertura variando de 14,77% a 99,94%, sendo que a média foi de 70,98%.

Os resultados de cada etapa foram sumarizados no fluxograma a seguir:

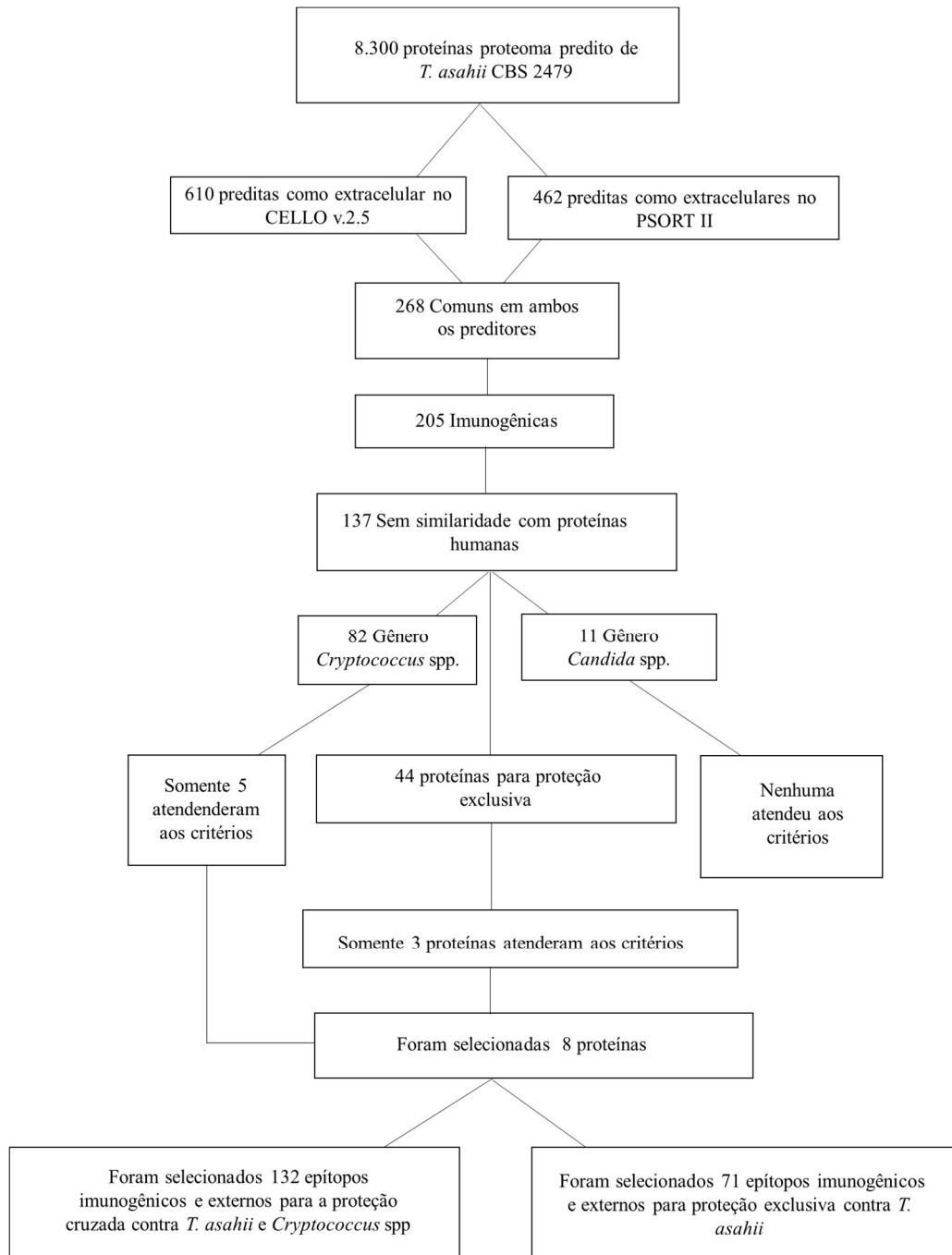


Figura 6 - Fluxograma dos resultados obtidos na predição dos potenciais epítomos vacinais para proteção exclusiva contra *T. asahii* e proteção contra *T. asahii* e *Cryptococcus* spp.

Fonte: Da autora.

6 DISCUSSÃO

Para a identificação dos possíveis candidatos vacinais de *T. asahii* foram empregadas várias ferramentas de predições, utilizando o proteoma predito da cepa referência de *T. asahii* CBS2479. Os preditores utilizados na pesquisa foram elaborados para prever a localização subcelular das proteínas: CELLO V.2.5 e PSORT II identificar o potencial imunogênico: VaxiJen v2.0 verificar a presença de similaridade entre proteínas de espécies diferentes: BLASTp - NCBI (YU; LIN, 2000; NAKAI; KANEHISA, 1991 DOYTCHINOVA; FLOWER, 2008; ALTSCHUL et al., 1990). Após a identificação dos principais alvos, estes foram submetidos a ensaios de mapeamento de epítomos em células T modelagem molecular pelo MODELLER () e I-TASSER e análise de cobertura populacional (PAUL et al., 2016; WEBB; SALI, 2016; ZHANG, 2010; BUI et al., 2006).

Após o emprego dos 2 preditores utilizando o proteoma predito de *T. asahii*, contendo 8.300 proteínas, 610 delas foram preditas como extracelulares (7,35 % do proteoma total) no preditor CELLO v.2.5 e 462 (5,57% do proteoma total) foram preditas como extracelulares no PSORT II, o que condiz com o estudo que utilizou métodos *in silico* para predição da localização subcelular das proteínas fúngicas. Segundo o estudo de Pellegrin e colaboradores (2015), no qual foi desenvolvido um *pipeline* para identificar e comparar proteínas de 49 fungos, incluindo os do filo Basidiomycota, foi evidenciado que estes exibiram uma ampla gama de tamanhos de proteínas que variaram de 155 a 1715 aminoácidos contendo peptídeo sinal. O número total de genes 45 presentes nos genomas fúngicos analisados variou de 4.000 a 25.000 e a proporção de proteínas secretadas e ou extracelulares foi de 3 a 10% do proteoma total (PELLEGRIN et al., 2015).

A escolha de dois preditores para análise de localização celular de proteínas foi estabelecida para se ter uma maior confiabilidade dos resultados, sendo que esta foi baseada na diferença de algoritmos de classificação. O preditor CELLO V.2.5 utiliza um algoritmo chamado de máquina de vetores de suporte (SVM) de dois níveis para prever a localização subcelular. O primeiro nível compreende vários classificadores SVM, cada um com base em um conjunto distinto de vetores de características derivados de sequências de aminoácidos. O segundo nível consiste em um SVM que processa as saídas dos classificadores SVM de primeiro nível para gerar a distribuição de probabilidade de subcelular localização. Cada SVM gera uma distribuição de probabilidade da localização subcelular baseada em sua codificação de sequência particular da proteína. O segundo SVM é usado para processar as probabilidades

e gerar a distribuição final de compartimento subcelular. No quais os aminoácidos são classificados quanto a sua composição físico-química (YU; LIN, 2000).

Já o PSORT II utiliza um classificador chamado de *k*-nearest-neighbor (knn), que é um algoritmo de reconhecimento de padrões no qual *k* é um parâmetro predefinido, que atribui um local de localização a sequências de entrada arbitrárias usando tendências estatísticas encontradas no conjunto de treinamento (sequências de localização conhecidas). Primeiro, as distâncias euclidianas (as raízes quadradas das somas de distâncias quadradas de todas as variáveis) entre a sequência de entrada e todos os dados de treinamento são calculadas com base em valores normalizados das variáveis de características dos aminoácidos. Então, a localização celular do candidato que ocupa a maioria das sequências do *k*-nearest é atribuído para ser o sítio mais provável (NAKAI; KANEHISA, 1991).

Das proteínas que foram preditas como extracelulares e ou secretadas, 268 proteínas obtiveram resultados semelhantes em ambos preditores. A partir das 268 proteínas preditas como extracelulares, 205 delas obtiveram score para serem identificadas com potencial imunogênico, sendo 137 destas ausentes em similaridade com proteínas humanas. Para identificar o potencial imunogênico das proteínas foi utilizado o programa VaxiJen v2.0. O programa avalia a capacidade imunoestimulante de antígenos, sendo que o limiar determinado para a proteína ser imunogênica para fungos é 0,5. Segundo Doytchinova; Flower (2008) este valor indica maior precisão, sensibilidade e especificidade em relação ao poder imunogênico das proteínas fúngicas (DOYTCHINOVA; FLOWER, 2008).

A fim de comparar as proteínas humanas com as de *T. asahii* foi utilizada a ferramenta BLASTp, na qual as proteínas selecionadas foram comparadas como proteoma humano (*Homo sapiens*, taxid 9606) para descartar antígenos preditos que possam induzir autoimunidade. Proteínas fúngicas podem exibir similaridade com proteínas humanas pois ambas as células são eucariontes, excluindo a possibilidade de auto-imunidade (ALTSCHUL et al., 1990). Para a produção de uma vacina com potencial de proteção cruzada, selecionou-se aquelas proteínas que não possuíam qualquer similaridade com as proteínas humanas, e estas foram comparadas com as proteínas do gênero *Cryptococcus* spp. (tax id 5206) e *Candida* spp. (tax id 5475) utilizando a ferramenta BLASTp-NCBI. Sabe-se que as proteínas fúngicas podem exibir funções semelhantes por ontologia gênica, e também por que os genomas dos gêneros *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. são, em sua maioria, anotados e a função dos genes, verificada, enquanto o de *T. asahii*, ainda é hipotético. Através desta comparação é possível evidenciar se as proteínas analisadas possuem alguma função compartilhada com outros fungos

e se provavelmente, elas existem, de fato, no proteoma de *T. asahii*. Os resultados indicam que das 137 proteínas selecionadas, 82 possuíam alguma similaridade *Cryptococcus* spp. e 11 com o gênero *Candida* spp. Destas, 4 proteínas obtiveram predições de similaridade com ambos os gêneros. Portanto restaram 44 proteínas para proteção somente contra *T. asahii*, sendo que destas apenas 3 possuíam caracterização funcional.

Após aplicação dos critérios de seleção foram obtidas como produto das análises, 5 proteínas para proteção cruzada: *Major allergen Asp F2*, *Alpha-1,3-glucanase*, *Glyoxal oxidase precursor*, *Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98*, *Glycoprotein*, e para proteção exclusiva contra *T. asahii*, 3 proteínas: *Curculin domain protein (mannose-binding) lectin*, *Cutinase* e *Beta-1,3-mannanase*

Quanto as funções das proteínas, a proteína *Major allergen Asp F2*(XP_014180978.1), faz parte da família *M35 like-superfamily*. Esta possui 170 aminoácidos e obteve 100% de cobertura e 60% de identidade com proteínas da espécie *Cryptococcus amyloletus* (XP_018989879.1). No estudo de James e colaboradores (2009) foi demonstrado que o alérgeno Asp F3 presente nos fungos como *Aspergillus fumigatus* foi utilizado em ensaios de vacinação e foi capaz de conferir uma proteção contra aspergilose pulmonar invasiva em camundongos imunossuprimidos (com neutropenia e tratamento com corticóide). Pelo menos dois epítomos de células T (11-mer e 13-mer) foram identificados em Asp F3. Existem homólogos de Asp F3 em outras espécies de fungos filamentosos e leveduras, como *Aspergillus*spp. e *Candida albicans*. Visto isso, é possível que o *Major allergen Asp F2* encontrado no proteoma de *T. asahii* é um homólogo de *Asp F3* de *Aspergillus* spp., portanto, os epítomos podem possuir potencial para desenvolvimento de vacinas antifúngicas eficazes (ITO et al., 2009).

A enzima *Alpha-1,3-glucanase* (XP_014180398.1), composta por 447 aminoácidos, faz parte da família glyco_hidro_71 superfamily, e obteve 99% de cobertura e 52% identidade com proteína da espécie *Cryptococcus depauperatus* (ODN85334.1). É um componente insolúvel, que hidroliza o alfa-1,3-glucana, que é um homopolímero de glicose, catalisando o processo de sintetização da parede celular fúngica. Essas enzimas são classificadas em duas famílias de hidrolases de glicosídeos baseada na similaridade da sequência de aminoácidos, o tipo 71 de alfa-1,3-glucanases são encontradas em fungos e as enzimas do tipo 87, em bactérias. Possuem como papéis fisiológicos a composição das paredes celulares e uma fonte de carbono endógeno para o desenvolvimento sexual (ZONNEVELD, 1972; SIETSMA; WESSEL, 1977; HOCHSTENBACH et al., 1998).

Visto que a parede celular fúngica é essencial para a sobrevivência das células, pois mantém a sua estrutura e previnem a ruptura que podem ocorrer devido a pressão osmótica. A parede celular é uma estrutura complexa composta por polissacarídeos e glicoproteínas reticuladas. Quitina e Beta-1,3-glucana são os principais polissacarídeos de parede da maioria dos fungos (KLIS, 1994; LATGE, 2007). No entanto, a alfa-1,3-glucanase foi encontrada na parede de várias espécies de fungos, sendo que em alguns fungos patogênicos essa atua como um fator de virulência (HOCHSTENBACH et al., 1998).

A *Glyoxal oxidase precursor* (XP_014180666.1) é uma enzima encontrada no proteoma predito de *T. asahii*, que obteve uma cobertura de 98% e identidade de 56% com a espécie *Cryptococcus gatii* (KIR69350.1), fazendo parte da família *E_setsuperfamily*.

No estudo de Rosa e Silva e seus colaboradores (2008), foi estudada a expressão do gene precursor da glioxal oxidase envolvidos no crescimento de *C. neoformans* em diferentes temperaturas, 25 °C e 37 °C. O foco desse estudo foi identificar os genes envolvidos no crescimento a 37 °C (temperatura do corpo humano), como um atributo de virulência essencial da espécie de *C. neoformans*. Foi evidenciado que em *C. neoformans*, o gene precursor da glioxal oxidase atua na virulência do patógeno, pois este foi regulado em duas situações diferentes que mimetizam uma infecção: o crescimento a 37 °C e a hipóxia (ROSA; SILVA et al., 2008).

A *Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98* (XP_014180616.1) foi encontrada no proteoma predito de *T. asahii* com uma cobertura de 82% e identidade de 57% com proteínas da espécie de *C. gatii* (KIR89311.1) e faz parte da família *CE4_SF superfamily*.

Os dados publicados no estudo Huang e colaboradores (2002) descrevem uma segunda glicoproteína criptocócica (MP88) que foi purificada para uma homogeneidade, e o gene que codifica a proteína foi clonado e sequenciado. As glicoproteínas MP88 e MP98 compartilham características estruturais, incluindo seqüências de sinal, regiões C-terminais ricas em serina / treonina (que provavelmente servem como locais de *O*-glicosilação extensiva) e motivos de âncora de glicosilfosfatidilinositol (âncora GPI). A MP88 atuou estimulando respostas das células T em camundongos imunizados. Uma pesquisa de bancos de dados genômicos de *C. neoformans* revelou que o MP88 compartilha esse recurso com no mínimo outros 11 genes, incluindo a MP98. Sendo assim, a MP88 foi identificada como uma segunda manoproteína criptocócica que estimula as respostas das células T e é uma potente candidata vacinal (HUANG et al., 2002).

A *Glycoprotein* (XP_014181003.1), presente no proteoma predito de *T. asahii*, obteve cobertura de 98% e identidade de 58% com proteínas da espécie *C. depauperatus*

(ODO02121.1). As glicoproteínas estão localizadas na parede celular fúngica e são responsáveis por muitos tipos de interações entre a parede e o ambiente extracelular. As glicanas cobrem as superfícies de todas as células de mamíferos e são adicionadas a uma porção protéica ou lipídica através do processo chamado de glicosilação. As glicoproteínas presentes na parede das células fúngicas são reconhecidas pelo sistema imune inato do hospedeiro, participando dos eventos iniciais do reconhecimento (PINTO; BARRETO-BERGTER; TABORDA, 2008).

Para uma proteção somente contra *T. asahii*, a proteína *Curculin domain protein (mannose-binding) lectin* (XP_01479418.1) composta por 350 aminoácidos, foi selecionada como possível candidato vacinal, pois foi evidenciado que esta não obteve nenhuma similaridade com proteínas humanas e nem com as proteínas do gênero *Cryptococcus* spp., e possui caracterização funcional. Porém até o momento não existem estudos sobre o papel dessas proteínas nos fungos, mas ela foi descrita em plantas. Estudos publicados dizem que as plantas se protegem contra vários patógenos, como bactérias, fungos e vírus, com vários mecanismos de defesa, incluindo um sistema imunológico inato (CHISHOLM et al., 2006; JONES; DANGL, 2006).

Como as paredes celulares das plantas são estruturas dinâmicas cuja composição e a arquitetura mudam devido ao crescimento, desenvolvimento e respostas de defesa, as proteínas presentes na parede celular e na membrana plasmática estão envolvidas em sistema de monitoramento necessário para o reconhecimento e transdução de ambiente, desenvolvimento, e sinais associados à defesa (GARCIA-BRUGGER et al., 2006).

Lectinas ou aglutininas são proteínas de ligação a carboidratos onipresentes em muitas espécies de plantas e funcionam em respostas de defesa contra patógenos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Possuem a função de ligação de glicoproteínas nas superfícies celulares, seu papel nos animais também incluem a ligação de células extracelulares solúveis e glicoproteínas intercelulares. As lectinas de plantas são envolvidas em interações específicas proteína-carboidrato dentro dos compartimentos citoplasmáticos e/ou nucleares (VAN DAMME et al., 2004).

O amplo espectro da especificidade de ligação de carboidratos das lectinas pode ser interpretada como o reconhecimento bem-sucedido por células de plantas de diferentes tipos de receptores contendo açúcar. Lectinas se ligam aos glicanos de glicoproteínas, glicolípidos ou polissacarídeos com alta afinidade, e elas são asúnicas proteínas vegetais que reconhecem os glicoconjugados presente nas superfícies de microorganismos como bactérias e fungos. Por

exemplo, as lectinas reconhecem quitina que é um carboidrato típico de paredes de células de fungos (BROEKAERT et al., 1989).

Várias lectinas de plantas desempenham um papel na defesa contra bactérias através de um mecanismo indireto, com base em interação com carboidratos da parede celular ou glicanos extracelulares. A lectina de batata (*Solanum tuberosum*) imobiliza estirpes avirulentas de *Pseudomonas solanacearum* na parede celular da planta; no entanto, uma cepa virulenta não é reconhecida pelas lectinas (SEQUEIRA; GRAHAM, 1977).

A *Cutinase* (XP_01483618.1) faz parte da família serina hidrolase, contém 221 aminoácidos em *T. asahii*, e foi selecionada como um potencial candidato vacinal, pois não obteve nenhuma similaridade com os gêneros analisados, e possui caracterização funcional.

Assim como as lectinas, as cutinases foram descritas em plantas. Cutinases são enzimas fúngicas que atuam catalisando a hidrólise de um biopoliéster insolúvel que é um impregnado com ceras, a cutina, componente estrutural da cutícula das plantas. O envolvimento das cutinases é crucial durante a invasão no hospedeiro e tem sido sugerida para inúmeros agentes patogênicos, com o fungo *Fusarium solani* (*Nectria haematococca*) infectando hipocótilos de ervilha. Várias evidências indicaram que as cutinases expressas durante a utilização saprofítica de cutina por patógenos fúngicos também foram crucialmente envolvidas na penetração de cutículas (BRECCIA et al., 2003; AKUTSU et al., 1998; GROSS, KALRA, 2002; KAMINI; LEFUJI, 2001).

A *Beta-1,3-mannanase* (XP_014184219.1) composta por 383 aminoácidos, também é uma enzima e foi selecionada a partir do proteoma predito de *T. asahii* como uma candidata com potencial vacinal, pois não obteve nenhuma similaridade com os gêneros analisados e possuía caracterização funcional. Assim como as outras enzimas descritas a *Beta-1,3-mannanase* também foi descrita em plantas, as enzimas manases desempenham um papel crucial na reciclagem natural da biomassa e desenvolvimento das plantas (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2012), estas também servem como poderosas ferramentas biotecnológicas em aplicações industriais que utilizam mananas (COUTURIER et al., 2011; CHAUHAN; PURI; SHARMA, 2012).

As β -mananases de ação final (MANs) clivam as ligações glicosídicas internas do esqueleto ligado a β -1,3 de vários mananos e constituem as principais enzimas envolvidas na modificação do manano. Com base na similaridade da sequência de proteínas, as MANs caracterizadas pertencem a qualquer uma das famílias de glicosídeo hidrolase (GH) 5, 26 ou 113, conforme classificado de acordo com a base de dados do CAZy (www.cazy.org) de

enzimas ativas contracarbohidratos. Não está claro por que as plantas precisam de múltiplas formas de MANs, mas uma das razões, pode ser pelo fato que as isoenzimas evoluíram para exibir diversas atividades em relação aos vários substratos de manana existentes nas plantas (LOMBARD et al., 2013).

Para o complemento do estudo das 8 proteínas candidatas vacinais foi realizado o mapeamento dos epítomos. Sabe-se que estes se ligam às moléculas de MHC na fenda de ligação peptídica, formando um complexo peptídeo-MHC que é reconhecido pelos receptores das células T. Neste trabalho foram realizados mapeamentos dos epítomos somente com ligação ao MHC II que são reconhecidos pelos linfócitos T CD4 +. As moléculas de classe II, têm uma fenda de ligação, permitindo que epítomos mais longos se liguem, tipicamente os epítomos de 12 a 20 resíduos de comprimento. No caso do presente estudo, para uma ligação mais estável, os peptídeos foram fixados em 15 resíduos para as previsões de ligação ao MHC de classe II. De acordo com os criadores da ferramenta TepiTool, a presença de aminoácidos adicionais apoiando o núcleo de ligação também parece ser necessário para uma ligação estável, mesmo que estes não interajam especificamente com o MHC na fenda de ligação. Desta forma, a possibilidade de selecionar peptídeos com os mesmos núcleos de ligações pode ser evitado (MURPHY, 2011).

Geralmente, as ferramentas de previsão de ligação ao MHC fazem a varredura de sequências de aminoácidos para estimar a afinidade de ligação de cada peptídeo componente a um MHC específico. A força de ligação (afinidade) de um peptídeo a uma molécula de MHC é um fator importante que determina a sua imunogenicidade potencial (SETTE et al., 1994).

Foi visto que todas as proteínas que passaram por estas previsões tiveram ligação de parte ou a totalidade de seus epítomos preditos a vários e diferentes alelos do MHC II. Esta descoberta é importante pois sabe-se que a previsão computacional de epítomos imunogênicos e com alta afinidade de ligação ao MHC II acelera a pré-seleção dos peptídeos e poupa tempo e vários recursos necessários para a criação de vacinas. Existem várias ferramentas para predição destes, mas o recurso de análise do IEDB hospeda as ferramentas de previsão de epítomos de células T para os alelos MHC classe I e classe II que fornecem alguns dos melhores algoritmos de previsão para centenas de alelos (MOUTAFTSI et al., 2006; WANG et al., 2008; WANG et al., 2010; TROLLE et al., 2015).

Em relação a modelagem molecular, o genoma de *T. asahii* CBS2479 utilizado como base para nossas buscas ainda possui sua anotação como hipotético, ou seja, muitas das proteínas não possuem caracterização funcional e as que possuem, a anotação ocorreu por

ontologia gênica e não necessariamente por verificação da função celular por ensaios biológicos. Desta forma, as buscas via PSI-BLAST para obter *templates* com similaridade $\geq 40\%$ com as proteínas selecionadas para realização da modelagem por homologia não foram bem sucedidas.

É sabido que algoritmo do PSI-BLAST é capaz de encontrar similaridades entre sequências distantes, pois faz combinações das informações de conservação encontradas em uma sequência relacionando-as a uma matriz de pontuação, reconhecendo, assim, as estruturas tridimensionais de proteínas que estão conservadas mesmo após a perda de similaridade entre sequências de aminoácidos (ALTSCHUL et al., 1997). Mesmo assim, 5 das 8 proteínas não obtiveram *templates* com o critério de possuir identidade $\geq 40\%$, o que não iria permitir a construção de modelos completos e confiáveis.

De acordo com o estudo de Kopp, Schwede (2004) que compararam métodos de modelagem por homologia, foi visto que quando os *templates* selecionados para as proteínas possuíam identidade menor do que 40%, a modelagem não era confiável devido a presença de *coils*, que são regiões que não possuem alinhamento para serem modeladas, fazendo com que conformação da estrutura protéica fique com baixa confiabilidade (KOPP; SCHWEDE, 2004).

Apesar de haver a presença de *coils* nas modelagens geradas pelo o I-TASSER, este foi ainda mais confiável, pois o método utilizado por este *software*, é baseado no princípio de que o número dos diferentes enovelamentos das proteínas é bem mais limitado que o número de sequências existentes. O número de enovelamentos é estimado pelo agrupamento em família das estruturas depositadas no Protein Data Bank (PDB). O método de *Threading*, desta forma, tem por objetivo encaixar a sequência alvo de uma proteína a uma biblioteca de estruturas com enovelamentos que já são conhecidos, permitindo integrar limitações na proteína alvo, como pontes dissulfeto ou restrições de distância (TOOMULA; KUMARE KUMARA, 2011).

Como consequência, optou-se pelo método de *Threading* pelo *software* I-TASSER, já que, segundo Zhang (2008), o método é o melhor para este tipo de ocasião, em que a taxa de identidade entre um possível *template* e a proteína de interesse é baixa $< 40\%$. O *software* permite que outras proteínas que não sejam necessariamente homólogas possam ser utilizadas como moldes pois regiões que forem bem pontuadas nos alinhamentos entre a proteína alvo e outras proteínas com estrutura conhecida, podem servir como molde para segmentos

específicos do modelo tridimensional em construção, embora, também possa ser designado um molde homólogo já conhecido, como em outros tipos de métodos (ZHANG, 2008).

Visto isso, a escolha do modelo mais confiável e acurado baseou-se no ranqueamento do *C-Score* de cada um dos 5 modelos gerados para cada uma das 8 proteínas. De acordo com Roy, Kucukural e Zhang, (2010) e Yang e colaboradores (2014), o *C-Score* confere a confiabilidade e acurácia dos modelos que foram gerados nas análises do I-TASSER, o qual é calculado baseando-se na significância dos alinhamentos das sequências e na afinidade nas construções das estruturas terciárias na forma tridimensional. Dessa maneira, os modelos gerados que possuíam os maiores *C-Score* representam modelos mais confiáveis e acurados (ROY; KUCUKURAL,;ZHANG, 2010; YANG et al., 2014). Somente os primeiros modelos em o *TM-Score* estimados através de equações feitas pelo *software* I-TASSER, mas apesar da correlação significativa entre o *C-Score* e o *TM-Score*, estes foram introduzidos para propósitos diferentes, visto que enquanto o *C-score* está relacionado a confiabilidade das simulações de modelagem, o *TM-Score* é uma medida de qualidade do modelo final em comparação com a estrutura nativa, que é estimada através do cálculo do *C-Score* (ZHANG, 2008).

Todas as 8 proteínas modeladas apresentaram conformações entre seus aminoácidos como as alfa-hélices e folhas-beta pregueadas, sendo que Alfa-hélice e beta-plana são as duas principais conformações da estrutura secundária das proteínas. Sabe-se que de acordo com a estrutura primária, a secundária tem uma ou outra forma. Na alfa-hélice a estrutura polipeptídica se encurva pela ação de pontes de hidrogênio formando uma espiral ou uma hélice. Já nas folhas- beta, a proteína é mais distendida e as pontes de hidrogênio se formam em ziguezague, modelando a proteína em uma estrutura chamada de beta-pregueada. Muitas sequências beta-pregueadas formam a estrutura beta-plana. As alfa-hélices são os elementos mais comuns da estrutura secundária proteica, pois estas conferem rigidez e dão estabilidade à proteína, sendo capaz de se distender quando a proteína é aquecida. Já as folhas-beta pregueadas são estruturas conformacionais que conferem resistência, na qual a proteína não se distende quando a mesma é aquecida. Foi visto também que todas as proteínas apresentaram grande quantidade de *coils* que são estruturas com baixas afinidades com os aminoácidos, é responsável pela flexibilidade das proteínas (LEHNINGER, 2014).

Através da modelagem molecular foi possível realizar a localização dos epítomos preditos como imunogênicos, selecionando-se aqueles externos nos modelos 3D de cada proteína. Em nossas análises, todas as 8 proteínas de *T. asahii* possuíram epítomos imunogênicos de 15 aminoácidos, localizados externamente nos modelos tridimensionais. Isso é importante pois indica a capacidade de serem reconhecidos pelo MHC II, expressos na superfície das

células dendríticas e macrófagos, que reconhecem epítomos derivados de proteínas extracelulares e apresentam estas para células T auxiliares (CASTELLINO et al., 1997; PURCELL et al., 2007). Apenas os epítomos que forem reconhecidos pelos receptores de células T possuem capacidade de desencadear uma resposta imune. A identificação dos epítomos de células T é importante para uma compreensão geral da imunidade celular para o desenvolvimento de vacinas (LIN et al., 2008).

Sabe-se que no processo de seleção dos epítomos para uma vacina baseada em células T, a cobertura populacional de pacientes proporcionada por um conjunto de epítomos não corresponde simplesmente a soma da cobertura dos componentes individuais. O método que foi utilizado neste trabalho calcula a fração de indivíduos previstos para responder a um dado epítomo ou epítomo definido com base nas frequências genotípicas de HLA e com base na ligação de MHC e / ou células T (BUI et al., 2006; SCHIPPER et al., 1996; GULUKOTA; DELIS, 1996). Desta forma, a proposta deste estudo evidenciou que os epítomos imunogênicos de *T. asahii* possuem cobertura populacional mundial de 99,98% para os alelos do MHC II, indicando que os epítomos selecionados sejam ótimos candidatos para o desenvolvimento de uma vacina.

Oany e colaboradores (2015) que também realizaram análises *in silico* de epítomos imunogênicos presentes em proteínas do vírus RNA Ebola, evidenciou que o epítomo selecionado em seu estudo era reconhecido pelo MHC I e II de 99,87% da população mundial, indicando comocandidato supremo para o desenvolvimento de vacinas (OANY et al., 2015).

Assim como no estudo de Murphy e colaboradores (2018), que também utilizaram técnicas *in silico* para a predição de candidatos vacinais para uma vacina contra o vírus da Dengue, no qual fizeram uso de combinações dos epítomos do MHC I e II para gerar potenciais vacinas com cobertura populacional > 90%, foi visto que combinação de 15 epítomos (6 CD8 + e 9 CD4 +) gerou uma vacina universal putativa com uma cobertura populacional mundial de 92,49% (MURPHY et al., 2018). Segundo Abraham e colaboradores (2013) que também utilizaram protocolos de imunoinformática para definir uma vacina contra *Mycobacterium tuberculosis*, combinando o MHC I e II, foi visto que a potencial vacina que ofereceu 97,4% e 92,67% de cobertura para a população da África Oriental, o que evidenciou que a suposta vacina contra a tuberculose precisa ter seus epítomos do MHC I e do II combinados para poder ter uma ampla cobertura populacional (ABRAHAM et al., 2013).

A análise de cobertura populacional foi útil para a identificação dos epítomos que se ligam aos alelos HLA do MHC de classe II, validando a estratégia preditiva de candidatos

vacinais em potencial para o desenvolvimento de uma vacina amplamente eficaz baseada em epítomos contra a tricosporonose.

Tendo em vista que foi possível selecionar variados possíveis alvos para serem utilizados como vacinas para proteção contra infecções provocadas por *T. asahii* e por *T. asahii* e *Cryptococcus* spp., estudos *in vitro* e *in vivo* serão necessários para validá-los individualmente ou na forma de quimeras. Contudo, com os resultados obtidos no presente estudo, é possível afirmar que o caminho está correto para o possível desenvolvimento de uma vacina pioneira, baseada na detecção das proteínas com potencial vacinal no filo Basidiomycota, utilizando como modelo o patógeno emergente *T. asahii*.

7 CONCLUSÕES

1) Nas análises de predição de proteínas extracelulares realizadas por dois preditores *in silico*, foi possível determinar que das 8.300 proteínas de *T. asahii*, 268 delas foram preditas como extracelulares, sendo 205, com potencial imunogênico, e destas, 137 que não apresentaram similaridade com proteínas humanas.

2) Nas análises para seleção de proteínas com potencial imunogênico e com proteção exclusiva para *T. asahii*, foi possível identificar que das 137 proteínas, 44 tiveram potencial imunogênico e não tiveram similaridade com outros fungos, mas somente 3 delas apresentaram caracterização funcional e seguiram para as análises seguintes.

3) Na seleção de proteínas com potencial imunogênico que apresentaram similaridade com proteínas de *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., foi possível selecionar a partir das 137 proteínas, 82 com similaridade com o gênero *Cryptococcus* spp. e 11 com o gênero *Candida* spp. para conferirem proteção cruzada. Destas, apenas 5 proteínas de *Cryptococcus* spp. possuíam caracterização funcional.

4) Através da modelagem molecular pelo *software* I-TASSER foi possível estabelecer a estrutura tridimensional das 8 proteínas selecionadas de forma confiável, com a observação em todas as proteínas da presença de alfa-hélices, folhas beta-preguedas e presença de *coils*. Ainda, o mapeamento dos epítomos imunogênicos mostrou ser, em sua maioria, com localização nas regiões externas dos modelos proteicos tridimensionais.

5) Através da análise da cobertura populacional de HLA de MHC II, foi possível obter 94 epítomos imunogênicos para proteção exclusiva para *T. asahii* e 177, para proteção cruzada de *T. asahii* e *Cryptococcus* spp., com uma taxa de distribuição na população mundial desses alelos de 99,98%.

6) Como candidatos vacinais, foram selecionados apenas epítomos externos visualizados por modelagem 3D nas 8 proteínas, sendo 71 epítomos que conferem proteção exclusiva contra *T. asahii* e 132, para proteção cruzada contra *T. asahii* e *Cryptococcus* spp., demonstrando que a tecnologia de vacinologia reversa foi essencial para o sucesso na seleção de candidatos proteicos para o desenvolvimento de vacinas fúngicas.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v.3, p. 403-410, 1990.

AKUTSU, Y. et al. Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 62–67, 1998.

ANSARI, H. R.; RAGHAVA, G. P. S. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. **Immunome Research**, v. 6, n. 6, 2010.

ARMSTRONG-JAMES, D. et al. Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v: 3099, n. 17, p. 1–10, 2017.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 54, n. 5, 2016.

BAQUIR, B. et al. Immunological Reactivity of Blood from Healthy Humans to the rAls3p-N Vaccine Protein. **NIH Public Access**, v. 201, n. 3, p. 473–477, 2010.

BÄR, E. et al. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 117–127, 2014.

BENTUBO, H. D. L.; GOMPERTZ, O. F. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. **Springer Plus**, v. 3, n. 377, p. 1-10, 2014.

BOURGEOIS, C. et al. Conventional dendritic cells mount a type I IFN response against *Candida* spp. requiring novel phagosomal TLR-7 mediated IFN signaling. **J Immunol**, v. 186, p. 3104–3112, 2011.

BYRD, A. S. et al. An extracellular matrix based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. **J Immunol**, v. 190, p. 4136–4148, 2013.

BRAGA, C. J. M. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* Vaccine Formulations Based on the gp43 Derived P10 Sequence and the Salmonella enterica. **Infection and Immunity**, v.77, n. 4, p. 1700–1707, 2009.

BRECCIA, J. D. et al. **Enzyme Microb. Technol**, v. 33, p. 244, 2003.

BROEKAERT WF, VAN PARIJS J, LEYNS F, JOOS H, PEUMANS WJ. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. **Science**, p. 1100–1102, 1989.

BROMURO, C. et al. Beta-glucan-CRM197 conjugates as candidates antifungal vaccines. **Vaccine**. v. 28, n. 14, p. 2615–2623, 2010.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition: A new receptor for glucans. **Nature**, v. 413, p. 36–37, 2001.

BUI, H. H. et al. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 17, p. 153, 2006.

CARTER, R. W. et al. Preferential induction of CD4+ T cell responses through in vivo targeting of antigen to dendritic cell associated C-type lectin-I. **J Immunol**, v. 171, p. 2276–2284, 2006.

CASADEVALL, A.; FELDMESSER, M.; PIROFSKI, L. A. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, p. 386-391, 2002.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. **Cell Host Microbe**, v. 11, n. 5, p. 447–456, 2012.

CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infection: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **BJOG**, v. 122, p. 785-794, 2014.

CAWLEY, M.J. et al. *Trichosporon beigelii* infection: Experience in a regional burn center. **Burns**, v. 26, p. 483-486, 2000.

CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the genus *Trichosporon*. **Mycopathologia**, v. 166: p. 121–132, 2008.

CHAGAS-NETO, T. C. et al. Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: Species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 4, p.1074–1081, 2009.

COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES, G.M. Current Knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 24, n. 4, p. 682–700, 2011.

COLOMBO, A. L. et al. Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: An emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 4, n. 4, p. 253–257, 2003.

CONG, LIN et al. Early Transcriptional Response of Human Monocyte-like THP-1 Cells in Response to *Trichosporon asahii* Infection. **Mycopathologia**, v. 179, n. 1–2, p.11–20. 2015.

CUNHA, C. et al. Dectin-I Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. **Blood**, v. 116, p. 5394–5402, 2010.

CHAI, LYA et al. The Y238X stop codon polymorphism in the human glucan receptor dectin I and susceptibility to invasive aspergillosis. **J Infect Dis**, v. 203, p. 736–743, 2011.

CHISHOLM, S. T. et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**. v. 124, p. 803-814, 2006.

CONTI, H. R. et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. **J Exp Med**, v. 206, n.2, p. 299–311, 2009.

CUTLER, J. E.; DEEPE JR, G. S.; KLEIN, B. S. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 1, p. 13–28, 2007.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Update on the epidemiology and diagnosis of invasive fungal infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 2, p. 143–147, 2008.

SOUSA, M. G. et al. Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin. **Cell Host Microbe**, v. 9, p. 436–443, 2011.

DAN, J. M. et al. Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. **Infect Immun**, v. 76, p. 2362–2367, 2008.

DATTA, K.; PIROFSKI, L.A. Towards a vaccine for *Cryptococcus neoformans*: principles and caveats. **FEMS. Yeast Res.**, v. 6, p. 525-536, 2006.

DE HOOGS, G. S.; J. GUARRO, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000.

DEL FRESNO, C. et al. Interferon production via Dectin-I Syk IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*. **Immunity**, v. 38, p. 1176–1186, 2013.

DENNEHY, K. M. et al. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-I and TLR signaling pathways. **Eur J Immunol**, v. 39, p. 1379–1386, 2009.

DEEPE, G. S. Prospects for the development of fungal vaccines. **Clin Microb Ver**, v.10, n. 5, p. 85–96, 1997.

_____. Preventative and therapeutic vaccines for fungal infections: from concept to implementation. **Expert Rev Vaccines**, v. 3, n. 6, p. 701–709, 2004.

DEEPE, G. S.; GIBBONS, R. S. Interleukins 17 and 23 influence the host response to *Histoplasma capsulatum*. **J Infect Dis**, v. 200, n.1, p. 142–151, 2009.

DEVI, S. J. et al. *Cryptococcus neoformans* serotype A glucuro- noxylomannann-protein conjugate vaccines: synthesis, charac- terization and immunogenicity. **Infect Immunol**, v. 59, p. 3700-3707, 1991.

DI BONAVENTURA, G. et al. Biofilm Formation by the Emerging Fungal Pathogen *Trichosporon asahii*: Development, Architecture, and Antifungal Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 10, p. 3269–3276, 2006.

DONINI; M. et al. NADPH oxidase of human dendritic cells: Role in *Candida albicans* killing and regulation by interferons, dectin I and CD206. **Eur J Immunol**, v. 37, p. 1194–1203, 2007.

DOYTCHINOVA, I. A., FLOWER, D. R. Bioinformatic Approach for Identifying Parasite and Fungal Candidate Subunit Vaccines. **The Open Vaccine Journal**. v. 1, n.1, p. 22–26, 2008.

DRUMMOND, R. A.; BROWN, G. D. The role of Dectin-I in the host defence against fungal infections. **Curr Opin Microbiol**, v. 14, p. 392–399, 2011.

DRUMMOND RA, Brown GD. Signalling C typelectins in antimicrobial immunity. **Plos pathog**, v. 9, 2013.

EDWARDS JR , J. E. Fungal cell wall vaccines: an update. **J Med Microbiol**, v. 61, p. 895-903, 2012.

ERWIG, L. P.; GOW, N. A. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 3, p. 163–176, 2016.

FELDMESSER, M. Prospects of vaccines for invasive aspergillosis. **Med Mycol**, v. 43, n. 7, p. 571–587, 2005.

FERA, M. T., CAMERA, E. L., SARRO, A. New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. Expert Reviews of Anti-infective therapy, **United Kingdom**, v. 7, n. 8, p. 981-998, 2009.

FERRANTE, A. et al. Effects of tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 and beta on human neutrophil migration, respiratory burst and degradation. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v. 86, p. 82-91, 1988.

FERIOTTI, C. et al. Mannosyl recognizing receptors induce an M1-like phenotype in macrophages of susceptible mice but an M2-like phenotype in mice resistant to a fungal infection. **PLoS ONE**, v. 8, p. 2013.

FERWERDA, B. et al . Human dectin I deficiency and mucocutaneous fungal infections. **N Engl Med**, v. 361, p. 1760–1767, 2009.

FLEISCHMANN, R. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**. v. 269, p. 496–512, 1995.

FLOWER, D. R. et al. Computer aided selection of candidate vaccine antigens. **Immunome Research**. v. 6, 2010.

FONSECA, F. L. et al . Structural and functional properties of the *Trichosporon asahii* glucuronoxylomannan. **Fungal Genetic. Biology**. v. 46, p. 496–505, 2009.

FOSTER, C. E. et al . Trichosporonosis in Pediatric Patients With a Hematologic Disorder. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v.00, n. 00, p. 1–7, 2017.

GHANNOUM, M. A. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1. p. 122–143, 2000.

GARLANDA. C. et al. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. **Nature**, v. 420, p. 182–6, 2002.

GIRMENIA, C. et al. Invasive Infections Caused by *Trichosporon* Species and *Geotrichum capitatum* in Patients with Hematological Malignancies : a Retrospective Multicenter Study from Italy and Review of the Literature. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 4, p.1818–1828, 2005.

GJERTSON, D. W. HLA-A/B and -DRB1/DQB1 allele-level haplotype frequencies. In HLA 1998 Edited by: Terasaki PI. Lenexa, KS, USA: **American Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, p. 365-450, 1998.

GLADIATOR, A. et al. IL 17 secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. **J Immunol**, v. 190, p. 521–525, 2013.

GLOCKER, E. O. et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. **N Eng J Med**, v. 361, p. 1727–1735, 2009.

GLOCKER, E. GRIMBACHER B. Chronic mucocutaneous candidiasis and congenital susceptibility to *Candida*. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 10, p. 542–550, 2010.

GROSS, R. A.; KALRA, B. Biodegradable polymers for the environment. **Science**, v. 297, p. 803–807, 2002.

GROSS, O. et al. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. **Nature**, v. 442, n. 7103, p. 651–656, 2006.

GULUKOTA, K.; DELISI, C. HLA allele selection for designing peptide vaccines. **Genet Anal**, v. 13, n.3, p. 81-86,1996.

GUO, H. Innate responses of corneal epithelial cells against *Aspergillus fumigatus* challenge. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 56, p. 88–93, 2009.

HAMAD, M. Antifungal Immunotherapy and Immunomodulation : A Double-hitter Approach to Deal with Invasive Fungal Infections. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 67, n.6, p. 533–543, 2008.

_____. Could there be light at the end of the tunnel ? **Human Vaccines e Immunotherapeutics**. v. 8, n. 12, p. 1758–1763, 2012.

HARDISON, S. E. et al. Protective immunity against pulmonary Cryptococcosis is associated with STAT1 mediated classical macrophage activation. **J Immunol**, v. 189, p. 4060–4068, 2012.

HARDISON, S. E.; BROWN, G. D. C type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. **Nat Immunol**, v. 13, p. 817–822, 2012.

HAZIROLAN, G. et al. Head-to-Head Comparison of Inhibitory and Fungicidal Activities of Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, Posaconazole, and Isavuconazole against Clinical Isolates of *Trichosporon asahii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4841–4847, 2013.

HERNÁNDEZ-SANTOS, N. et al. Th17 cells confer long term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. **Mucosal Immunol**, v. 6, p. 900–910, 2013.

HOCHSTENBACH, F. et al. Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 9161–9166, 1998.

HOSHINO, A.; ISONO, Y. Degradation of aliphatic polyester films by commercially available lipases with special reference to rapid and complete degradation of poly(L-lactide) film by lipase PL derived from *Alcaligenes* sp. **Biodegradation** v. 13, p.141–147, 2002.

HUANG, et al. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-cell responses». **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5485–5493, 2002.

HUANG. W. et al. Requirement of interleukin-17A for systemic anti- *Candida albicans* host defense in mice. **J Infect Dis**, v.190, n. 3, p. 624–631, 2004.

HUPPLER, A. R.; BISHU, S.; GAFFEN, S. L. Mucocutaneous candidiasis: The IL 17 pathway and implications for targeted immunotherapy. **Arthritis Res Ther**, v. 14, p. 217, 2012.

IMANISHI, T. et al. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In *HLA 1991: Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference* Edited by: Tsuji K MA, Sasazuki T. Oxford: **Oxford University Press**, v. 4, p. 1065-1220, 1992.

IANNITI, R. G. CARVALHO A, ROMANI L. From memory to antifungal vaccine design. **Trends Immunol**, v. 33, p. 467- 474, 2012.

IEFUJI, H.; IIMURA, Y.; OBATA, T. Isolation and characterization of a yeast *Cryptococcus* sp. S-2 that produces raw starch-digesting-amylase, xylanase, and polygalacturonase. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 58, p. 2261–2262, 1994.

IGYARTO, B. Z. et al. Skin resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen specific T helper cell responses. **Immunity**, v. 35, p. 260–272, 2011.

ILIEV, I. D. et al. Interactions between commensal fungi and the C type lectin receptor Dectin-I influence colitis. **Science**, v. 336, p. 1314–1317, 2012.

IKURA, Y.; KUDO, T. Isolation of microorganism capable of degrading poly-(L-lactide). **J. Gen. Appl. Microbiol**, v. 45, p. 247–251, 1999.

ISLAM, A. et al. An acidic microenvironment increases NK cell killing of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by enhancing perforin degranulation. **Plos pathlog**, v. 9, 2013.

ISHIKAWA, T. et al. Identification of distinct ligands for the C type lectin receptors Mincle and Dectin 2 in the pathogenic fungus *Malassezia*. **Cell Host Microbe**, v. 13, p. 477–488, 2013.

ITURRIETA-GONZALEZ, I. A. et al. Multiple Species of Trichosporon Produce Biofilms Highly Resistant to Triazoles and Amphotericin B. **Plos one**, v. 9, n. 10, 2014.

YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic acids research**, v. 43, n.1, p. 174-181, 2015.

JIAN, D.Y. et al. Trichosporon asahii follo-wing polymicrobial infection in peritoneal dialysis-associatedperitonitis. **Perit Dial Int**. v. 28, p. 100-123, 2008.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323–329, 2006.

KAGAMI, S. et al. IL-23 and IL 17A, but not IL-12 and IL-22, are required for optimal skin host defense against *Candida albicans*. **J Immunol**, v. 185, p. 5453–5462, 2010.

KAMAI, Y. et al. New model of oropharyngeal candidiasis in mice. **AntimicrobAgen Chemother**, v. 45, p. 3195–3197, 2001.

KAMINI, N. R. et al. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochem**, v. 36, p. 317–324, 2000.

KAMINI, N. R.; H. IEFUJI. Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochem**, v. 37, p. 405–410, 2001.

KELLY, M. et al. Memory CD4+ T cells are required for optimal NK cell effector functions against the opportunistic fungal pathogen *Pneumocystis murina*. **J Immunol**, v. 190, p. 285–295, 2013.

KASHEM, S. W. et al. Nociceptive sensory fibers drive interleukin-23 production from CD301b+ dermal dendritic cells and drive protective cutaneous immunity. **Immunity**, v. 43, n. 3, p. 515–526, 2015.

KERSCHER, B.; WILLMENT, J. A.; BROWN, G. D. The Dectin 2 family of C typelectin like receptors: An update. **Int Immunol**, v. 25, p. 271–277, 2013.

KIFLMARIAM, M. G.; YANG, H. J.; ZHANG, Z. Y. Gene delivery to dendritic cells by orally administered recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in mice. **Vaccine**, v. 31, p. 1360–1363, 2013.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. et al. Syk- and CARD9- dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. **Nat Immunol**, v. 8, n. 6, p. 630–638, 2007.

LEOPOLD, W. et al. Is Development of a Vaccine against *Cryptococcus neoformans* Feasible. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 6, 2015.

LEVITZ, S.; GOLENBOCK, D. Beyond empiricism: informing vaccine development through innate immunity research. **Cell**, v. 148, p. 1284–1292, 2012.

LIPINSKI, T. et al. Enhanced immunogenicity of a tricomponent mannan tetanus toxoid conjugate vaccine targeted to dendritic cells via Dectin-I by incorporating glucan. **J Immunol**, v. 190, p. 4116–4128, 2013.

LIU, X. Z. et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in Mycology**, v. 81, p. 85–147, 2015.

LONGHI, L. et al. Phenotypic and functional characterization of NK cells in human immune response against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Immunol**, v. 189, p. 935–945, 2012.

MA, J.; et al. Dectin-I triggered recruitment of light Chain 3 protein to phagosomes facilitates major histocompatibility complex class II presentation of fungal derived antigens. **J Biol Chem**, v.287, p. 34149–34156, 2012.

MACEDO, G. A.; PIO, T. F. **Braz. J. Microbiol**, v. 36, p. 388, 2005.

MARINÉ, M. et al. On and Under the Skin: Emerging Basidiomycetous Yeast Infections Caused by *Trichosporon* Species. **PLoS Pathogens**, v.11, n. 7, p. 1-9, 2015.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV Light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4592–4601, 2007.

MEDNICK, A. J. et al. Neutropenia alters lung cytokine production in mice and reduces their susceptibility to pulmonary cryptococcosis. **Eur J Immunol**, v. 33, p. 1744–1753, 2003.

MELO, A. S. et al. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. **Medical Mycology**, v. 49, n. 4, p.253–262, 2011.

MOTOYOSHI, K. Biological activities and clinical application of M-CSF. **Int J Hematology**, v. 67, p. 109-122, 1998.

MOSSER, DM.; EDWARDS, JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, p. 958–969, 2008.

Moyes, DL. et al. A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. **Cell Host Microbe**, v.8 p. 225–235, 2010.

NAKAI, K.; KANEHISA, M. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 11, n. 2, p. 95–110, 1991.

NAKAMURA, K. et al. Purification and characterization of an extracellular poly (L-lactic acid) depolymerase from a soil isolate, *Amycolatopsis* sp. strain K104-1. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 67, p. 345–353, 2001.

NANJAPPA, S. G. et al. Tc17 cells mediate vaccine immunity against lethal fungal pneumonia in immune deficient hosts lacking CD4+. 2012.

NISIDA, H.; TOKIWA, Y. Distribution of poly (hydroxybutyrate) and poly(ϵ caprolacton) aerobic degrading microorganisms in different environments. **J. Environ. Polym. Degrad**, v. 1, p. 227–233, 1993.

NUNES, J. M. et al. Formation of Clinical and Environmental *Rhodotorula* Species Isolates. **American Society for Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 382–389, 2013.

OTOMI, CHO.; MANAMI, M.; SUGITA, T. Molecular evidence that the opportunistic fungal pathogen *Trichosporon asahii* is part of the normal fungal microbiota of the human gut based on rRNA genotyping. **International Journal of Infectious Diseases**, v.39, p. 87–88, 2015.

O'NEILL, I. A. J.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, AG. The history of Toll like receptors Redefining innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 13, p. 453–460, 2013.

PAUL, S. et al. TepiTool: A pipeline for computational prediction of T cell epitope candidates. **Curr. Protoc. Immunol**, v. 114, p. 19-24, 2016.

PANDIYAN, P. et al. CD⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. **Immunity**, v. 34, p. 422–434, 2011.

PEUMANS, WJ.; VAN DAMME, EJM. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol**, v. 109, p. 347–352, 1995.

PINTO, M. R.; BARRETO-BERGTER, C. P. TABORDA. Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 195–208, 2008.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Crit Rev Microbiol**, v. 36, n. 1, p. 1–53, 2010.

Plantinga, T. S. et al. Toll like receptor1 polymorphisms increase susceptibility to Candidemia. **J Infect Dis**, v. 205, p. 934–943, 2012.

PULENDRAN, B.; SEDER, R. A. Host-pathogen interactions in the 21st century. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 4, p. 335–337, 2005.

RAMIREZ-ORTIZ, Z. G. et al. Toll like receptor 9 dependent immune activation by unmethylated CpG motifs in *Aspergillus fumigatus* DNA. **Infect Immun**, v. 76, p. 2123–2129, 2008.

RAMIREZ-ORTIZ, Z. G. et al. A nonredundant role for plasmacytoid dendritic cells in host defense against the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Cell Host Microbe**, v. 9, p. 415–424, 2011.

RAPAKA, R. R. et al. Conserved natural IgM antibodies mediate innate and adaptive immunity against the opportunistic fungus *Pneumocystis murina*. **J Exp Med**, v. 207. N. 13, p. 2907–2919, 2010.

RIBEIRO; A. M. et al. HSP65 DNA as therapeutic strategy to treat experimental paracoccidioidomycosis. **Vaccine**, v. 28, p. 1528–34, 2010.

RINALDI, M. G. Controversies in medical mycology. **Dermatology**, v. 194, p. 45–47, 1997. Rivera A, *et al* . Innate immune activation and CD4⁺ T cell priming during respiratory fungal infection. **Immunity**, v. 25, n. 4, p. 665–675, 2006.

ROBINSON, M. J. et al. Dectin 2 is a Syk coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. **J Exp Med**, v. 206, p. 2037–2051, 2009.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. et al. Susceptibility Patterns and Molecular Identification of *Trichosporon* Species Susceptibility Patterns and Molecular Identification of *Trichosporon* Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4026–4034, 2005.

ROGERS, N. C. et al. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. **Immunity**, v. 22, n. 4, p. 507–517, 2005.

ROSA E SILVA. et al. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. **Research in Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 221–29, 2008.

RUAN, S. Y.; CHIEN, J. Y., HSUEH, P. R. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 49, n. 1, p. 11–17, 2009.

RUDNER, X. L. et al. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. **Infect Immun**, v. 75, n. 6, p. 3055–3061, 2007.

SAIJO, S. et al. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. **Nat Immunol**, v. 8, n. 1, p. 39–46, 2007.

_____. Dectin-2 recognition of α -mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. **Immunity**, v. 32, p. 681–691. 2010.

SASAKI. Effects of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on anti-fungal activity of mononuclear phagocytes against *Trichosporon asahii*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 119, n. 2, p. 293-298, 2000.

SAVILLE, S. P. et al. Efficacy of a genetically engineered *Candida albicans* tet-NRG1 strain as an experimental live attenuated vaccine against hematogenously disseminated candidiasis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, p. 430-432, 2009.

SEQUEIRA, L.; GRAHAM, T. L. Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin. **Physiol Plant Pathol**, v. 11, p. 43–54, 1977.

Serrano-Gomez, D. et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3- grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. **J. Immunol**, v. 173, p. 5635–5643, 2004.

SIETSMA, J. H.; WESSEL, J. G. H. Hemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. **Biochem Biophys Acta**, v. 496, p. 225–239, 1977.

SILVA-BEDOYA, L. M.; CASTRILLÓN, M. R.; CADAVID, E. O. Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 135-142, 2014.

SCHIPPER, R. F. et al. Minimal phenotype panels. A method for achieving maximum population coverage with a minimum of HLA antigens. **Hum Immunol**, v. 51, n.2, p. 95-98, 1996.

SCHMIDT, S. et al. Natural killer cells and antifungal host response. **Clin Vaccine Immunol**, v. 20, p. 452–458, 2013b.

SIM, J. H. C. et al. Characterization of *Trichosporon* spp. Isolates from Blood Stream and Central Nervous System Infections in a Tertiary Hospital in Singapore. **Open Forum Infectious Diseases, United States**, v. 3, n. 1, 2016.

SPECHT, C. A. et al. Protection against experimental cryptococcosis following vaccination with glucan particles containing *Cryptococcus* alkaline extracts. *mBio*, v. 6, n. 6, p. 1–11, 2015.

SPELLBERG, B. Vaccines for invasive fungal infections. **F1000 reports medicine**, v. 8, n.7, p. 1–8, 2011.

STUEHLER, C. et al. Cross-protective T H 1 immunity against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. **IMMUNOBIOLOGY**, v. 117, n. 22, p.5881–5892, 2016.

SU, CHIA-YU et al. Protein subcellular localization prediction based on compartment-specific biological features. **Computational systems bioinformatics / Life Sciences Society. Computational Systems Bioinformatics Conference**, p. 325–30, 2006.

SUEGARA, N.; SIEGEL, J. E.; SAVAGE, D. C. Ecological determinants in microbial colonization of the murine gastro intestinal tract Adherence of *Torulopsis pintolopesii* to epithelial surfaces. **Infect Immun**, v. 25, p. 139–145, 1979.

SUGITA, T. et al. Taxonomic position of deep-seated, mucosa-associated, and superficial isolates of *Trichosporon* cutaneum from trichosporonosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p.1368–1370, 1995.

SUGITA, T.; IKEDA, R.; SISHIKA, A. Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. **Journal of clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5467–5471, 2004.

SUN, W. et al. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1750–1757, 2012.

TABORDA, CP.; CASADEVALL, A. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement independent antibody mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. **Immunity**, v. 16, p. 791–802, 2002.

TAKAHARA, K. et al. C-type lectin SIGNRI enhances cellular oxidative burst response against *C. albicans* in cooperation with Dectin-I. **Eur J Immunol**, v. 41, p. 1435–1444, 2011.

TAYLOR, P. R. et al. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. **Nat Immunol**, v. 8, n. 1, p. 31–38, 2007.

TKALCEVIC, J. et al. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. **Immunity**, v. 12, p. 201–210, 2000.

TOROSANTUCCI, A. et al. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 5, p. 597–606, 2005.

TUON, F.; ALMEIDA, G. M. D.; COSTA, S. F. Central venous catheter-associated fungemia due to *Rhodotorula* spp. a systematic review. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 45, n. 8, p. 441–447, 2007.

UNDERHILL, D. M. et al. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2543–2550, 2005.

UNDERHILL, D. M.; PEARLMAN, E. Immune interactions with pathogenic and commensal fungi: a two-way street. **Immunity**, v. 43, n. 5, p. 845–858, 2015.

VAN BRUGGEN, R. et al. Complement receptor 3, not Dectin-I, is the major receptor on human neutrophils for β -glucan bearing particles. **Mol Immunol**, v. 41, p. 575–581, 2009.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. **Trends Plant Sci**, v. 9, p. 484–489, 2004.

VAN DER GRAAF, C. A. A. et al. Toll like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for *Candida* bloodstream infection. **Eur Cytokine Netw**, v. 17, p. 29–34, 2006.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. The macrophagemannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. **Cell Host Microbe**, v. 5, p. 329–340, 2009.

VERMA, A. et al. Adaptive immunity to fungi. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 3, 2014.

VON BERNUTH H. et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. **Science**, v. 321, p. 691–696, 2008.

WAGENER, J. et al. A peptide derived from the highly conserved protein GAPDH is involved in tissue protection by different antifungal strategies and epithelial immunomodulation. **J Invest Dermatol**, p. 133:144–153, 2013.

WALSH, T. J. et al. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology Infection**. v.10, p. 44–66, 2004.

WARREN, M. K.; RALPH, P. Macrophage growth factor CSF-1 simulates human monocyte production of interferon, tumor necrosis factor, and colony stimulating activity. **J Immunology**, v. 137, p. 2281–2285, 1986.

WERNER, J. L. et al. Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. **J Immunol**, v.182, n.8, p. 4938–4946, 2009.

WHITMAN, R. et al. Microbes in Beach Sands: Integrating Environment, Ecology and Public Health. **National Institutes of Health**, v.13 n. 3, p. 329–368, 2014.

WIESNER, D. L. et al. Chitin recognition via chitotriosidase promotes pathologic type-2 helper T cell responses to cryptococcal infection. **PLoS Pathog**, v.11, n. 3, 2015.

WOZNIACK, K. L.; YONG, M. L.; WORMLEY JR.; F. L. Protective immunity against experimental pulmonary cryptococcosis in T-cell depleted mice. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, p. 717–723, 2011.

WÜTHRICH, M. et al. Vaccine immunity to pathogenic fungi overcomes the requirement for CD4 help in exogenous antigen presentation to CD8+ T cells: implications for vaccine development in immune-deficient hosts. **J Exp Med**, v. 197, n. 11, p. 1405–1416, 2003.

WÜTHRICH, M.; FILUTOWICZ, H. I.; KLEIN, B. S. Mutation of the WI-1 gene yields an attenuated *Blastomyces dermatitidis* strain that induces host resistance. **J Clin Invest**, v.106, n, 11, p. 1381–1389, 2000.

XIN, H.; CUTLER, J. E. Vaccine and Monoclonal Antibody That Enhance Mouse Resistance to Candidiasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 10, p. 1656–1667, 2011.

XUE, J. et al. A genetically engineered live attenuated vaccine of *Coccidioides posadasii* protects BALB/c mice against coccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 77, p. 3196–3208, 2009.

YANG, R. Y. et al. Draft genome sequence of CBS 2479, the standard type strain of *Trichosporon asahii*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 11, p. 1415–1416, 2012a.

. Genome sequence of the *Trichosporon asahii* environmental strain CBS 8904. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 12, p. 1586–1587, 2012b.

YANO, J. et al. The acute neutrophil response mediated by SI100 alarmins during vaginal *Candida* infections is independent of the Th17 pathway. **PLoS ONE**, 2012.

ZONNEVELD, B. J. Morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. The significance of an alpha-1, 3-glucan of the cell wall and alpha- 1,3-glucanases for cleistothecium development. *Biochim Biophys Acta*. **Eukaryotic Cell**, v. 273, p. 174–187, 1972.

Apêndice A - As 268 proteínas que obtiveram a mesma predição nos preditores CELLO v.2.5 e PSORT II.

ID das proteínas	Número de Aminoácidos	CELLO v.2.5	PSORT II
XP_014176263.1	281	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176270.1	85	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176272.1	381	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176291.1	512	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176328.1	174	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176348.1	141	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176352.1	288	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176353.1	274	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176411.1	281	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176426.1	571	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176478.1	575	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176484.1	83	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176505.1	210	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176506.1	177	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176558.1	166	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176566.1	190	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176635.1	441	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176674.1	294	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176675.1	197	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176693.1	247	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176697.1	166	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176698.1	237	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176700.1	256	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176734.1	157	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176735.1	159	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176757.1	256	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176779.1	193	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176811.1	220	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176823.1	257	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176825.1	129	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176889.1	93	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176907.1	81	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176908.1	100	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176909.1	93	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176950.1	238	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014176974.1	223	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177024.1	388	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177071.1	368	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177134.1	182	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177212.1	212	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR

XP_014177230.1	311	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177266.1	239	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177292.1	588	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177355.1	122	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177369.1	354	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177385.1	362	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177586.1	427	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177675.1	165	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177718.1	408	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177727.1	165	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177744.1	195	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177746.1	190	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177747.1	175	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177748.1	229	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177757.1	250	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014177861.1	439	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178023.1	136	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178037.1	560	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178049.1	607	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178053.1	212	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178171.1	260	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178234.1	179	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178245.1	144	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178337.1	325	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178356.1	438	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178363.1	354	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178375.1	674	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178376.1	141	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178377.1	144	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178392.1	180	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178418.1	161	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178437.1	305	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178440.1	151	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178443.1	379	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178513.1	141	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178517.1	172	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178537.1	553	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178544.1	315	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178554.1	171	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178570.1	296	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178588.1	611	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178594.1	317	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178646.1	370	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178657.1	584	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR

XP_014178841.1	513	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178843.1	603	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178848.1	192	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178884.1	177	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178912.1	587	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178918.1	426	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178920.1	400	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014178967.1	506	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179054.1	152	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179055.1	166	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179061.1	182	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179066.1	231	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179069.1	232	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179124.1	362	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179129.1	107	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179141.1	89	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179250.1	258	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179252.1	116	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179266.1	190	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179299.1	466	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179308.1	208	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179371.1	322	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179404.1	449	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179418.1	350	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179486.1	662	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179556.1	366	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179627.1	870	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179635.1	283	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179837.1	187	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179881.1	255	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179948.1	713	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014179997.1	255	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180075.1	315	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180099.1	235	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180166.1	374	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180204.1	479	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180223.1	149	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180224.1	305	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180225.1	127	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180227.1	161	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180228.1	139	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180250.1	420	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180252.1	101	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180253.1	98	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR

XP_014180263.1	72	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180282.1	136	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180283.1	303	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180315.1	154	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180326.1	265	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180351.1	538	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180354.1	261	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180386.1	391	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180398.1	447	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180455.1	429	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180518.1	305	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180521.1	119	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180524.1	229	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180526.1	193	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180538.1	108	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180564.1	658	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180616.1	445	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180666.1	690	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180763.1	264	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180802.1	71	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180838.1	266	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180841.1	353	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180844.1	718	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180849.1	106	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180861.1	197	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180862.1	165	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180863.1	622	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180898.1	519	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180925.1	273	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180928.1	204	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180955.1	781	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180970.1	89	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180971.1	103	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180972.1	84	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180973.1	112	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014180978.1	170	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181003.1	404	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181018.1	582	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181029.1	148	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181030.1	210	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181046.1	1004	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181060.1	145	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181065.1	116	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181078.1	109	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR

XP_014181130.1	246	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181235.1	171	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181288.1	643	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181300.1	132	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181306.1	238	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181343.1	116	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181344.1	126	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181374.1	226	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181405.1	179	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181413.1	212	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181423.1	161	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181426.1	135	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181446.1	99	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181477.1	564	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181502.1	408	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181674.1	695	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181713.1	517	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181855.1	608	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181856.1	168	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181858.1	449	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181867.1	405	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181888.1	178	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014181940.1	320	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182064.1	128	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182115.1	246	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182274.1	639	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182302.1	414	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182356.1	128	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182357.1	376	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182358.1	125	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182372.1	150	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182376.1	153	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182455.1	216	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182480.1	131	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182498.1	510	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182543.1	547	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182544.1	409	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182561.1	173	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182566.1	433	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182748.1	468	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014182913.1	281	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183004.1	161	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183027.1	391	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183071.1	131	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR

XP_014183088.1	236	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183128.1	228	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183141.1	256	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183150.1	580	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183178.1	319	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183223.1	504	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183240.1	505	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183263.1	474	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183270.1	100	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183275.1	606	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183286.1	343	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183299.1	481	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183329.1	132	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183565.1	586	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183589.1	875	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183605.1	491	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183618.1	221	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183663.1	663	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183679.1	156	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183681.1	94	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183723.1	463	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183730.1	895	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183737.1	575	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183795.1	237	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183886.1	387	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183897.1	423	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014183969.1	485	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184000.1	183	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184002.1	249	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184003.1	169	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184004.1	131	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184010.1	180	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184029.1	452	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184061.1	636	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184168.1	141	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184170.1	392	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184171.1	139	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184175.1	294	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184182.1	306	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184219.1	383	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184236.1	818	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184258.1	319	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184259.1	291	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184260.1	289	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR

XP_014184264.1	143	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184265.1	149	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184274.1	195	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184350.1	167	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184433.1	136	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184434.1	137	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR
XP_014184473.1	212	EXTRACELULAR	EXTRACELULAR

Fonte: Da autora.

Apêndice B - As 268 proteínas analisadas no VaxiJen v2.0.

ID das proteínas	Número de aminoácidos	Score de VaxiJen v2.0*	ID das proteínas	Número de aminoácidos	Score de VaxiJen v2.0*
XP_014176263.1	281	0.6003	XP_014177024.1	388	0.7841
XP_014176270.1	85	0.5901	XP_014177071.1	368	0.6200
XP_014176272.1	381	0.6104	XP_014177134.1	182	0.9022
XP_014176291.1	512	0.5089	XP_014177212.1	212	0.7342
XP_014176328.1	174	0.6382	XP_014177230.1	311	0.6967
XP_014176348.1	141	0.5804	XP_014177266.1	239	0.6826
XP_014176352.1	288	0.7570	XP_014177292.1	588	0.6090
XP_014176353.1	274	0.8747	XP_014177355.1	122	0.4515
XP_014176411.1	281	0.9510	XP_014177369.1	354	0.2157
XP_014176426.1	571	0.6378	XP_014177385.1	362	0.5406
XP_014176478.1	575	0.7224	XP_014177586.1	427	0.4349
XP_014176484.1	83	0.1532	XP_014177639.1	555	0.5415
XP_014176505.1	210	1.398	XP_014177675.1	165	0.8391
XP_014176506.1	177	0.8080	XP_014177718.1	408	0.7047
XP_014176558.1	166	0.4616	XP_014177727.1	165	1.025
XP_014176566.1	190	0.7144	XP_014177744.1	195	0.7046
XP_014176635.1	441	0.6560	XP_014177746.1	190	0.8505
XP_014176674.1	294	1.018	XP_014177747.1	175	0.4802
XP_014176675.1	197	0.6773	XP_014177748.1	229	0.8052
XP_014176693.1	247	0.6191	XP_014177757.1	250	-0.4218
XP_014176697.1	166	0.0053	XP_014177861.1	439	0.7153
XP_014176698.1	237	0.4241	XP_014178023.1	136	-0.4041
XP_014176700.1	256	1.016	XP_014178037.1	560	0.7054
XP_014176734.1	157	1.160	XP_014178049.1	607	0.6086
XP_014176735.1	159	0.7300	XP_014178053.1	212	0.7299
XP_014176757.1	256	0.5472	XP_014178171.1	260	0.9078
XP_014176779.1	193	0.7249	XP_014178234.1	179	0.5860
XP_014176811.1	220	0.8212	XP_014178245.1	144	0.7528
XP_014176823.1	257	0.5115	XP_014178337.1	325	0.3122
XP_014176825.1	129	0.6729	XP_014178356.1	438	0.5769
XP_014176889.1	93	0.3339	XP_014178363.1	354	0.5352
XP_014176907.1	81	0.2045	XP_014178375.1	674	0.6714
XP_014176908.1	100	0.4683	XP_014178376.1	141	0.5128
XP_014176909.1	93	0.5980	XP_014178377.1	144	0.5626
XP_014176950.1	238	1.118	XP_014178392.1	180	0.8376
XP_014176974.1	223	1.066	XP_014178418.1	161	0.7804

XP_014178437.1	305	0.6015	XP_014179627.1	870	0.5426
XP_014178440.1	151	0.9210	XP_014179635.1	283	0.6357
XP_014178443.1	379	0.7512	XP_014179837.1	187	0.6115
XP_014178513.1	141	0.7923	XP_014179881.1	255	0.4920
XP_014178517.1	172	0.8236	XP_014179948.1	713	0.4524
XP_014178537.1	553	0.6115	XP_014179997.1	255	1.078
XP_014178544.1	315	0.8544	XP_014180075.1	315	0.6864
XP_014178554.1	171	1.144	XP_014180099.1	235	0.7106
XP_014178570.1	296	0.3370	XP_014180166.1	374	0.6148
XP_014178588.1	611	0.4820	XP_014180204.1	479	0.4601
XP_014178594.1	317	0.7491	XP_014180223.1	149	0.6311
XP_014178646.1	370	0.8628	XP_014180224.1	305	0.5078
XP_014178657.1	584	0.6264	XP_014180225.1	127	0.9759
XP_014178841.1	513	0.5329	XP_014180227.1	161	0.4394
XP_014178843.1	603	0.8166	XP_014180228.1	139	0.2248
XP_014178848.1	192	0.4916	XP_014180250.1	420	0.7758
XP_014178884.1	177	0.5722	XP_014180252.1	101	0.6762
XP_014178912.1	587	0.7681	XP_014180253.1	98	0.4485
XP_014178918.1	426	0.7582	XP_014180263.1	72	0.6663
XP_014178920.1	400	0.6048	XP_014180282.1	136	0.5326
XP_014178967.1	506	0.7463	XP_014180283.1	303	0.5858
XP_014179054.1	152	0.8520	XP_014180315.1	154	0.3403
XP_014179055.1	166	0.7494	XP_014180326.1	265	0.8409
XP_014179061.1	182	0.9909	XP_014180351.1	538	0.4875
XP_014179066.1	231	0.8376	XP_014180354.1	261	0.8580
XP_014179069.1	232	0.5788	XP_014180386.1	391	0.4575
XP_014179124.1	362	0.6197	XP_014180398.1	447	0.6732
XP_014179129.1	107	0.6606	XP_014180455.1	429	0.5488
XP_014179141.1	89	0.4988	XP_014180518.1	305	0.3406
XP_014179250.1	258	0.5959	XP_014180521.1	119	0.9554
XP_014179252.1	116	0.5477	XP_014180524.1	229	0.9840
XP_014179266.1	190	0.9094	XP_014180526.1	193	0.8378
XP_014179299.1	466	0.5074	XP_014180538.1	108	0.2327
XP_014179308.1	208	1.022	XP_014180564.1	658	0.9432
XP_014179371.1	322	0.5105	XP_014180571.1	176	0.9532
XP_014179404.1	449	0.7475	XP_014180616.1	445	0.6769
XP_014179418.1	350	1.101	XP_014180666.1	690	0.6052
XP_014179486.1	662	0.5841	XP_014180763.1	264	0.9024
XP_014179556.1	366	0.1994	XP_014180802.1	71	0.6540
XP_014179590.1	512	0.3429	XP_014180838.1	266	0.7783

XP_014180841.1	353	1.002	XP_014181855.1	608	0.6853
XP_014180844.1	718	0.7797	XP_014181856.1	168	0.7695
XP_014180849.1	106	0.8181	XP_014181858.1	449	0.6905
XP_014180861.1	197	0.9563	XP_014181867.1	405	0.6846
XP_014180862.1	165	0.7100	XP_014181879.1	211	0.5115
XP_014180863.1	622	0.5079	XP_014181888.1	178	0.6951
XP_014180898.1	519	0.5427	XP_014181940.1	320	0.5482
XP_014180925.1	273	0.6935	XP_014182064.1	128	0.1267
XP_014180928.1	204	0.3735	XP_014182115.1	246	0.2401
XP_014180955.1	781	0.7343	XP_014182274.1	639	0.6532
XP_014180970.1	89	0.5450	XP_014182302.1	414	0.6159
XP_014180971.1	103	0.3147	XP_014182356.1	128	0.6232
XP_014180972.1	84	0.5603	XP_014182357.1	376	0.4798
XP_014180973.1	112	0.3272	XP_014182358.1	125	0.4705
XP_014180978.1	170	0.7651	XP_014182372.1	150	0.2351
XP_014181003.1	404	0.6327	XP_014182376.1	153	0.9934
XP_014181018.1	582	0.8030	XP_014182455.1	216	0.9141
XP_014181029.1	148	0.6832	XP_014182480.1	131	0.6498
XP_014181030.1	210	0.5023	XP_014182498.1	510	0.5003
XP_014181046.1	1004	0.6649	XP_014182543.1	547	0.7120
XP_014181060.1	145	0.9009	XP_014182544.1	409	0.7794
XP_014181065.1	116	0.4025	XP_014182561.1	173	0.8163
XP_014181078.1	109	0.4188	XP_014182566.1	433	0.9282
XP_014181130.1	246	0.3115	XP_014182748.1	468	0.6463
XP_014181235.1	171	0.5853	XP_014182913.1	281	0.8047
XP_014181288.1	643	0.4257	XP_014183004.1	161	0.4130
XP_014181300.1	132	0.7029	XP_014183027.1	391	0.7082
XP_014181306.1	238	0.8181	XP_014183071.1	131	0.8588
XP_014181343.1	116	0.0669	XP_014183088.1	236	0.3525
XP_014181344.1	126	0.3809	XP_014183128.1	228	0.9296
XP_014181374.1	226	0.3159	XP_014183141.1	256	0.9151
XP_014181405.1	179	0.3961	XP_014183150.1	580	0.7103
XP_014181413.1	212	0.7031	XP_014183178.1	319	0.9602
XP_014181423.1	161	1.1112	XP_014183223.1	504	0.6295
XP_014181426.1	135	0.6546	XP_014183240.1	505	0.6019
XP_014181446.1	99	0.2499	XP_014183263.1	474	0.5964
XP_014181477.1	564	-0.1344	XP_014183270.1	100	0.3880
XP_014181502.1	408	0.7271	XP_014183275.1	606	0.6616
XP_014181674.1	695	0.6054	XP_014183286.1	343	0.8498
XP_014181713.1	517	0.6117	XP_014183299.1	481	0.8233

XP_014183565.1	586	0.7299
XP_014183589.1	875	0.7313
XP_014183605.1	491	0.6230
XP_014183618.1	221	0.6027
XP_014183663.1	663	0.7962
XP_014183679.1	156	0.4862
XP_014183681.1	94	-0.2160
XP_014183723.1	463	0.4447
XP_014183730.1	895	0.6635
XP_014183737.1	575	0.7529
XP_014183795.1	237	0.4344
XP_014183886.1	387	0.3229
XP_014183897.1	423	0.6641
XP_014183969.1	485	0.8498
XP_014184000.1	183	0.8330
XP_014184002.1	249	1.1864
XP_014184003.1	169	0.5148
XP_014184029.1	452	0.5661
XP_014184061.1	636	0.5199
XP_014184168.1	141	0.4573
XP_014184170.1	392	0.3105
XP_014184171.1	139	0.2719
XP_014184175.1	294	0.7163
XP_014184182.1	306	0.3294
XP_014184219.1	383	0.6012
XP_014184236.1	818	0.8536
XP_014184258.1	319	0.5552
XP_014184259.1	291	0.1779
XP_014184260.1	289	0.3484
XP_014184264.1	143	0.4058
XP_014184265.1	149	0.4597
XP_014184274.1	195	0.8799

