



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ADRIANE LENHARD-VIDAL

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL A ANTÍGENOS DE
PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS E *P. LUTZII* NA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA**

Londrina
2013

ADRIANE LENHARD-VIDAL

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL A ANTÍGENOS DE
PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS E *P. LUTZII* NA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L566r Lenhard-Vidal, Adriane.
Resposta imune humoral a antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. Lutzii* na paracoccidioidomicose humana / Adriane Lenhard-Vidal. – Londrina, 2013.
76 f. : il.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Paracoccidioidomicose – Teses. 2. Micoses fungóides – Teses. 3. Resposta imune – Teses. 4. Antígenos de fungos – Teses. 5. Imunodiagnóstico – Teses. I. Itano, Eiko Nakagawa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616.993

Apoio financeiro das seguintes instituições:
PPSUS/Fundação Araucária, MEC/PROEXT,
Fundação Araucária, CNPq, CAPES,
PROPPG/UEL e PROEX/UEL.

ADRIANE LENHARD-VIDAL

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL A ANTÍGENOS DE
PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS E *P. LUTZII* NA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Mário Augusto Ono
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Berenice Tomoko Tatibana
IFPR – Londrina - PR

Londrina, 22 de Fevereiro de 2013.

Dedico este trabalho aos meus pais,
meus maiores exemplos para vencer
as batalhas da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Profa. Dra. Eiko N. Itano, por tão gentilmente me aceitar como sua orientanda, mesmo sem me conhecer e com poucas referências a meu respeito. Espero ter superado as suas expectativas.

Meus pais, Arnildo J. Lenhard e Elfi Lenhard, merecem sempre o meu agradecimento, uma vez que nunca me negaram nada o que fosse relacionado aos estudos e sempre me apoiaram em minhas decisões.

Ao meu marido, Luiz Henrique I. Vidal, que mesmo estando distante em boa parte do meu mestrado, sempre me apoiou e aguentou os dias bons e ruins.

Muito obrigada a todos da família Vidal, que me acolheram em seu lar como se eu tivesse também o seu sangue, especialmente à tia Solange, Ana Carolina e Michele, que sempre me proporcionaram muita diversão e conforto.

Agradeço a toda à equipe do Laboratório de Imunologia Aplicada, em especial, Nilson J. Carlos, Mari S. Kaminami, Paula Leonello Álvares e Silva, Luciene A. Nagashima, Fabiana F. Rigobello, Tânia M.P.S. da Costa, Franciele S. Chyoda e Lilian C.R. de Dio, não apenas pela ajuda sempre disponível, mas também pela amizade oferecida.

Obrigada a todos os alunos de iniciação científica, em especial ao João Paulo Assollini e à Cláudia Y. Akagi, sempre presentes e dispostos a ajudar.

Gostaria também de agradecer aos pacientes e voluntários que deram literalmente seu sangue para colaborar neste trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e PROPPG/UEL pelo auxílio financeiro recebido.

LENHARD-VIDAL, ADRIANE. **Resposta imune humoral a antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii* na Paracoccidioidomicose humana.** 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR.

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3), sendo conhecida uma nova espécie, *P. lutzii*. Considerando-se que a diversidade genética do *Paracoccidioides* sp. possivelmente gera diferenças na resposta imune do hospedeiro, esta pesquisa objetivou determinar e correlacionar níveis de anticorpos IgG a antígenos de *P. brasiliensis* (S1, PS2) e *P. lutzii* em pacientes com PCM. Foram obtidos e utilizados antígeno solúvel total (CFA), fração de gp43, fração de gp70 e fração de alta massa molecular (hMM) provenientes de *P. brasiliensis* B339 (S1), *P. brasiliensis* LDR3 (PS2) e *P. lutzii* (LDR2). Foram utilizadas amostras de soro de pacientes com PCM da forma crônica da região norte e oeste do estado do Paraná (n= 35) e de doadores saudáveis do banco de amostras do Laboratório de Imunologia Aplicada (n= 16). As amostras foram submetidas à análise por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto e por imunodifusão (ID). Os resultados de ELISA para detecção de IgG anti-CFA demonstraram nível significativamente mais elevado para CFA proveniente de B339 em relação a LDR3 e LDR2 (p<0,05). A análise de anticorpos às frações resultou em nível significativamente mais elevado de IgG anti-gp43 de B339>LDR3>LDR2, de IgG anti-gp70 de LDR3=LDR2>B339 e de IgG anti-hMM de B339=LDR3>LDR2 (p<0,05). O teste de correlação dentre cada cepa demonstrou correlação positiva entre CFA e as frações gp43 ou hMM, mas não com a de gp70. Já entre as frações houve correlação positiva para as frações de gp43 ou hMM entre B339/LDR3 e LDR3/LDR2 e da fração de gp70 entre B339/LDR3/LDR2. As porcentagens de positividade por ELISA foram de 100, 84 e 76% com CFA de B339, LDR3 e LDR2, respectivamente. Utilizando pool de soros de pacientes com PCM, os resultados de ID demonstraram linha de identidade total entre todos os CFAs. Na análise com soros individuais, duas amostras apresentaram identidade parcial. As porcentagens de positividade por ID de soros de pacientes com PCM foram de 60, 68 e 65% com CFA de B339, LDR3 e LDR2, respectivamente. Concluímos pelos resultados obtidos que a reação de soros de pacientes varia de acordo com os antígenos totais provenientes de cepas distintas causadoras da PCM e de acordo com a fração de antígeno utilizado. A gp43 provavelmente é o principal componente do CFA interferente na intensidade da reação, independentemente da cepa causadora de PCM investigada. Os antígenos provenientes de *P. brasiliensis* S1 parecem ser mais eficientes do que PS2 e *P. lutzii* para fins de diagnóstico da PCM na região norte/oeste do Paraná, por ELISA, mas não por ID.

Palavras-chave: Micose. Imunodiagnóstico. Ensaio imunoenzimático. Imunodifusão radial dupla. Identidade de antígenos.

LENHARD-VIDAL, ADRIANE. **Humoral immune response to antigens from *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* in human Paracoccidioidomycosis.** 2013. 73 p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the thermodimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (phylogenetic species S1, PS2, PS3) and by the new species, *P. lutzii*. Considering that the genetic differences of *Paracoccidioides* sp. could cause distinct immune responses by the hosts, current worked aimed at determining and correlating IgG antibody levels to antigens from *P. brasiliensis* (S1, PS2) and *P. lutzii* in patients with PCM. Total soluble antigen (CFA) and fractions (gp43, gp70 and high molecular mass [hMM]) were produced from *P. brasiliensis* B339 (S1), *P. brasiliensis* LDR3 (PS2) and *P. lutzii* (LDR2). The serum samples used were from chronic PCM patients from the north and west regions of Paraná state (n= 35) and from 16 healthy donors from the Samples Bank of the Applied Immunology Laboratory. Samples were analyzed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and by immunodiffusion (ID). ELISA results for detection of anti-CFA IgG showed significantly higher level for CFA derived from B339 than from LDR3 and LDR2 ($p < 0.05$). Antibody directed against the fractions were significantly higher for IgG anti-gp43 from B339>LDR3>LDR2, for IgG anti-gp70 from LDR3=LDR2>B339 and for IgG anti-hMM from B339=LDR3>LDR2 ($p < 0.05$). Correlation tests for each isolate showed a positive correlation between CFA and gp43 or hMM fractions, but not for gp70. Among the fractions, there was a positive correlation for the gp43 or hMM fractions between B339/LDR3 and LDR3/LDR2, and for gp70 between B339/LDR3/LDR2. The positivity percentages in ELISA tests were 100, 84 and 76% using CFA from B339, LDR3 and LDR2, respectively. Using a pool of PCM patients' sera, ID results showed a line of total identity among all the CFAs. Using sera individually, two samples had partial identity. The percentage of positive results in ID tests was 60, 68 and 65% using CFA from B339, LDR3 and LDR2, respectively. We conclude by the gathered results that the reaction of the patients' sera varies according to the total antigens derived from different agents of PCM and also varies according to the fraction of antigen used. The gp43 is probably the main CFA component interfering in the intensity of the reactions, independently of the PCM agent investigated. The antigens derived from *P. brasiliensis* S1 seem more efficient than those from PS2 and *P. lutzii* for diagnostic of PCM in the north/west regions of Paraná state, using ELISA but not the ID technique.

Keywords: Mycosis. Immunodiagnostic. Immunoenzymatic assay. Double immunodiffusion. Antigen identity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Paracoccidioides sp. cultivado in vitro à 35°C	25
Figura 2 - Resultado de testes de identidade de antígenos entre CFA proveniente de P. brasiliensis B339 (S1), LDR3 (PS2), P. lutzii (LDR2) e CFA de 2 isolados clínicos de Paracoccidioides sp., utilizando-se pool de soros de pacientes com PCM	55
Figura 3 - Resultado de teste de identidade entre amostras de soros que apresentaram mais de uma linha de precipitação com CFA proveniente de P. brasiliensis LDR3 (PS2).....	56
Figura 4 - Detecção de IgG sérica anti-gp43 (a) e anti-gp70 (b) de P. brasiliensis (B339-S1, LDR3-PS2) e P. lutzii (LDR2)	58
Figura 5 - Western blot utilizando CFA de B339 (S1), LDR3 (PS2) e LDR2 (P. lutzii), respectivamente, utilizando-se 15 amostras de soro diluídas 1:50.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação parcial de referências utilizando técnicas de ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos ou anticorpos no estudo da PCM humana	33
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
mL	Mililitros
nm	Nanômetros
N	Normal
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
kDa	Quilodaltons
Anti-CFA	Anticorpo contra a glicoproteína antígeno solúvel total (CFA)
Anti-gp43	Anticorpo contra a glicoproteína de 43 kDa
Anti-gp70	Anticorpo contra a glicoproteína de 70 kDa
Anti-hMM	Anticorpo contra a fração de alta massa molecular
AS	Antígeno Somático
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CFA	Antígeno livre de células (<i>Cell Free Antigen</i>)
CIE	Contraímunoeletroforese
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COU	Clínica Odontológica Universitária
DO	Densidade ótica
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ExoAg	Exoantígeno de <i>Paracoccidioides</i> sp. (<i>Exoantigen</i>)
Fc	Fragmento cristalizável (<i>Fragment, crystallizable</i>)

GCPSR	Método de concordância genealógica de reconhecimento de espécies filogenéticas (<i>Genealogic Concordance method of Phylogenetic Species Recognition</i>)
gp43	Glicoproteína de 43 kDa
gp70	Glicoproteína de 70 kDa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HC	Hospital das Clínicas
hMM	Fração de alta massa molecular (<i>High Molecular Mass</i>)
HSP	Proteína de choque térmico (<i>Heat Shock Protein</i>)
HURNP	Hospital Universitário da Região Norte do Paraná
ID	Imunodifusão (<i>Immunodiffusion</i>)
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG2	Imunoglobulina G subclasse 2
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
LAMP	Amplificação circular isotérmica (Loop-mediated isothermal amplification method)
MM	Massa molecular
NHS	<i>Normal Human Serum</i>
NO	Óxido nítrico
O.D.	<i>Optical density</i>
OPD	Orto-fenilenediamina (<i>Ortho-Phenylenediamine</i>)

PBS	Tampão salino fosfato (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCM	Paracoccidiodomicose (<i>Paracoccidiodomycosis</i>)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil (<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>).
PS2	Espécie filogenética 2 do <i>P. brasiliensis</i> (<i>Phylogenetic Species 2</i>)
PS3	Espécie filogenética 3 do <i>P. brasiliensis</i> (<i>Phylogenetic Species 3</i>)
S1	Espécie 1 do <i>P. brasiliensis</i> (<i>Species 1</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel poliacrilamida com SDS (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulfate)
SHN	Soro Humano Normal
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF	Fator de transformação de crescimento (<i>Transforming Growth Factor</i>)
Th1	Linfócito T “helper” (auxiliar) 1
Th2	Linfócito T “helper” (auxiliar) 2
TMB	3’3’5’5-tetrametilbenzidina (<i>3,3,5,5-tetramethylbenzidine</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
WB	Western Blot

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	PARACOCCIDIOIOMICOSE	18
2.1.1	Formas Clínicas.....	19
2.1.2	Proteção Hormonal.....	21
2.1.3	Patogenia e Respostas Th1/Th2	22
2.2	O FUNGO PARACOCCIDIOIDES SP.	24
2.2.1	Evolução Taxonômica e a Nova Espécie Paracoccidioides lutzii	25
2.2.2	Ciclo Biológico	26
2.2.3	Fatores de Virulência e Mecanismos de Escape	27
2.2.4	Glicoproteínas de Importância Diagnóstica	28
2.2.5	Diagnóstico Laboratorial	30
3	OBJETIVOS	36
3.1	GERAL	36
3.2	ESPECÍFICOS	36
4	ARTIGO PARA A REVISTA MYCOPATHOLOGIA	37
5	APÊNDICE A: OUTROS RESULTADOS OBTIDOS	54
5.1	IDENTIDADE ANTIGÊNICA.....	54
5.1.1	Isolamento de Paracoccidioides sp. de material biológico.....	54
5.1.2	Imunodifusão - Análise de Identidade Antigênica	54
5.2	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IGG ANTI-GP43 E ANTI-GP70 DE PARACOCCIDIOIDES SP.	56
5.2.1	Obtenção de Antígeno Somático	56
5.2.2	Obtenção de Fração de gp43 e gp70.	57
5.2.3	Análise de IgG Sérica Anti-gp43 e anti-gp70 Paracoccidioides sp. das Cepas de Referência por ELISA Indireto	57
5.2.4	Correlação Entre os Níveis de IgG Contra os Diferentes Antígenos	58

5.2.5	Western Blot para Detecção de IgG Anti-CFAs de P. Brasiliensis (S1, PS2) e P. Lutzii	59
6	DISCUSSÃO	60
	REFERÊNCIAS	63
	CONCLUSÃO	70
	ANEXOS	71
	ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	72

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo microrganismo do gênero *Paracoccidioides*, que atualmente inclui o *P. brasiliensis* e a nova espécie *P. lutzii* (TEIXEIRA et al., 2009). A PCM está restrita à América Latina, do México à Argentina, sendo os casos detectados fora dessa região considerados como importados, já que eram pessoas que viveram ou viajaram pelas regiões endêmicas. Brasil, Colômbia e Venezuela representam o maior número de casos (WANKE; LONDERO, 1994). Por não ser de notificação compulsória em todos os estados brasileiros, há dificuldade de se obter um levantamento de prevalência e morbidade desta doença no Brasil.

O *Paracoccidioides* sp. é um fungo termodimórfico de crescimento lento, que microscopicamente apresenta hifas septadas a 25-28°C e estrutura leveduriforme a 35°C. No exame direto de materiais coletados de pacientes, como escarro ou raspado de lesões, o fungo apresenta uma característica morfológica própria, com múltiplos brotos ligados à célula mãe (LACAZ, 1994b).

A infecção ocorre na maioria das vezes pela inalação de propágulos do fungo presentes no solo onde este vive de forma saprofítica, e por isso a prevalência da PCM é relacionada àquelas profissões que tem contato direto com o solo, como agricultores, jardineiros e tratoristas, afetando principalmente pulmões, pele e mucosas. A infecção costuma ocorrer nas primeiras décadas de vida, mas as manifestações da doença são mais comuns em adultos, havendo um grande período de incubação (WANKE; LONDERO, 1994).

A PCM pode se apresentar como PCM infecção ou doença. Na PCM infecção não há manifestações clínicas aparentes, mas há reação intradérmica positiva para paracoccidioidina (LACAZ et al., 2002). A PCM doença é subdividida em PCM aguda, um quadro geralmente mais grave que costuma acometer crianças e jovens, e PCM crônica, forma mais comum da doença, atingindo principalmente adultos entre 30 e 60 anos, tendo progressão lenta (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A prevalência é maior em homens do que em mulheres, devido à ação protetora de hormônios femininos (RESTREPO et al., 1984; SALAZAR; RESTREPO; STEVENS, 1988).

Para o diagnóstico laboratorial, o Ministério da Saúde tem como padrão ouro a identificação direta do fungo pelo exame micológico ou por cultura

(BRASIL, 2009) em amostras clínicas (escarro, raspado de lesão, aspirado de linfonodo, etc.). A identificação direta é de difícil execução por diversos motivos: necessidade de pessoal treinado para sua execução, má qualidade das amostras coletadas, foco da lesão profundo e em local delicado não se recomendando biópsias, além da dificuldade natural para o isolamento do *Paracoccidioides* sp.

Além da análise histopatológica (biópsias), exames sorológicos auxiliares para detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis* também podem ser usados no diagnóstico da PCM. As imunoglobulinas tem papel crucial no combate a diversos microrganismos infecciosos. Sua facilidade de detecção nos fluidos corporais permite que sejam um bom critério para determinar a presença e atividade da doença, servindo tanto para diagnóstico quanto para acompanhamento da evolução do tratamento (CAMARGO; CANO, 1994). A imunodifusão é a técnica sorológica mais utilizada por sua facilidade de execução, mas apresenta mais resultados falso negativos quando comparada a outros métodos. Por isso, é importante a sua associação com outras técnicas como contraímunoeletroforese, imunofluorescência indireta, imunoblot e ensaio imunoenzimático (DEL NEGRO et al., 1995; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Na PCM, apesar das imunoglobulinas terem seu papel na defesa do hospedeiro, altos níveis de anticorpos específicos tem sido correlacionados com uma maior gravidade de doença (SINGER-VERMES et al., 1993).

Para fins de diagnóstico da PCM, tem-se utilizado com maior frequência o antígeno de 43 kDa (gp43), seguido pelo antígeno de 70 kDa (gp70), mas sabe-se que estes desaparecem da circulação durante o tratamento, com diminuição no título de anticorpos, o que pode gerar resultados falso negativos (BLOTTA; CAMARGO, 1993; CAMARGO; UNTERKIRCHER; TRAVASSOS, 1989; DA SILVA et al., 2004; MENDES-GIANNINI et al., 1989). Marquez et al. (2005) sugeriram a possibilidade de se utilizar antígeno de alta massa molecular (*high molecular mass antigen*, hMM; ~366 kDa) como diferencial da PCM crônica da aguda. Estudo experimental murino demonstrou um possível papel protetor da hMM, sendo possível o uso dos níveis de IgG anti-hMM como um indicador prognóstico (PAVANELLI et al., 2007).

Estudos têm classificado cepas de *Paracoccidioides* sp. de acordo com suas semelhanças. Em 1998, Calcagno et al. (1998) dividiram cepas do fungo em 5 grupos, de acordo com sua origem geográfica. Matute et al. (2006) propuseram

uma divisão do *P. brasiliensis* em três espécies diferentes (S1, PS2 e PS3). Em 2008 e 2009, estudos filogenéticos evidenciaram a existência de dois isolados atípicos de *Paracoccidioides* (Pb01 e IFM54648), que não se encaixam nestas classificações (CARRERO et al., 2008; TAKAYAMA et al., 2010). Através de método de concordância genealógica de reconhecimento de espécies filogenéticas (GCPSR), foram identificados 17 isolados genotipicamente semelhantes ao Pb01 ("*Pb01 like*"), sendo proposto acrescentar uma nova espécie ao gênero *Paracoccidioides*, o *P. lutzii* (TEIXEIRA. et al., 2009).

Considerando a diversidade genética do fungo *Paracoccidioides* sp., torna-se necessário o conhecimento da resposta imune frente a essas variações, pois isto poderá interferir no imunodiagnóstico da PCM. Adicionalmente é necessário identificar as cepas de *Paracoccidioides* sp. prevalentes no estado do Paraná a fim de que sejam caracterizados antígenos mais eficazes no diagnóstico da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PARACOCCIDIOIOMICOSE

A Paracoccidioidomicose (PCM) é causada pelo fungo termodimórfico *P. brasiliensis* (espécies S1, PS2 e PS3) (MATUTE et al., 2006) e pela nova espécie identificada, *P. lutzii* (TEIXEIRA et al., 2009). Esta micose sistêmica está restrita a América Latina e já foi descrita em 14 países, do México à Argentina, incluindo Panamá e Bolívia, e exceto no Chile e ilhas do Caribe. Os casos detectados fora dessa região são declarados como importados, uma vez que acometeram pessoas que viveram ou viajaram pelas regiões endêmicas. Brasil, Colômbia e Venezuela somam o maior número de casos (WANKE; LONDERO, 1994). No Brasil, as áreas endêmicas são localizadas em áreas subtropicais, com alta umidade, onde há predominância de atividades rurais (LACAZ, 1994a).

A descoberta da PCM ocorreu no início do século XX. Em 1908, o pesquisador Adolpho Lutz (1855-1940) observou a PCM pela primeira vez no Brasil, que lhe chamou atenção pelas lesões encontradas na boca dos pacientes. Em 1910, Alfonso Splendore (1871-1953) descreveu casos desta doença, sendo o primeiro a observar seu dimorfismo dependente da temperatura. Desde 1930, os micologistas utilizam a denominação *Paracoccidioides brasiliensis* para designar o agente da “Paracoccidioidomicose”, termo consagrado em 1971 para substituir a designação anterior “blastomicose sul-americana”. (LACAZ et al., 2002)

Como o provável habitat natural do *Paracoccidioides* sp. é o solo, acredita-se que a infecção ocorra pela inalação de propágulos do fungo. Atividades relacionadas ao seu manejo são consideradas o principal fator de risco para desenvolvimento da PCM. As profissões consideradas mais susceptíveis são as atividades agrícolas, terraplenagem, preparo de solo, práticas de jardinagens e transporte de produtos vegetais. Muitos pacientes são tabagistas e/ou etilistas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Testes intradérmicos utilizando paracoccidioidina no Brasil demonstram uma grande variação de positividade (de 3 a 80%), de acordo com antígeno utilizado, área e população em estudo (FAVA; NETTO, 1998). Estima-se que 50% da população de zonas endêmicas tenham entrado em contato com o *Paracoccidioides* sp. (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006), mas apenas uma pequena

parte desenvolve a doença e aproximadamente 10% pode apresentar focos quiescentes sem desenvolvimento de sintomas (COUTINHO et al., 2002).

Entre 1980 e 1995, a PCM foi a 8ª causa mais comum de morte por doenças infecciosas ou parasitárias predominantemente crônicas ou recorrentes, além de ter tido a maior taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas, com média de 198,81 mortes por ano. A faixa etária de até 15 anos somou pouco mais de 3% do número de mortes. A média de idade para os homens e mulheres foi de 54 e 47 anos respectivamente. Dentre os casos de óbito estudados que apresentavam descrição do tipo de trabalho exercido, mais da metade eram trabalhadores rurais, seguidos de trabalhadores da construção civil, somando 75% dos casos (COUTINHO et al., 2002).

2.1.1 Formas Clínicas

A PCM é uma doença com progressão geralmente lenta. Fatores ambientais, resposta imunológica do hospedeiro e virulência do fungo geram grandes variações na intensidade, extensão e características das lesões. Existe uma vasta gama de sintomas apresentados pelos pacientes com PCM (MENDES, 1994), mas os órgãos mais acometidos são pulmões, pele, mucosas, gânglios, baço, fígado e órgãos linfóides do tubo digestivo (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Vários tipos de classificação foram propostas para a PCM desde o seu descobrimento, baseados em critérios como gravidade da doença, topografia das lesões ou resultados de testes sorológicos. Apesar das apresentações clínicas variarem muito de paciente para paciente, de acordo com o “Consenso em Paracoccidioidomicose” publicado em 2006 (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006), a PCM pode ser classificada como:

- *PCM infecção*: não há manifestações clínicas aparentes, mas há reação intradérmica positiva quando utilizada a paracoccidioidina.
- *Paracoccidioidomicose doença*, subdividida em:
 - *Forma aguda/subaguda*: acomete principalmente crianças, adolescentes e indivíduos de até 30 anos, contabilizando 3 a 5% dos casos; não há diferença na proporção entre sexos. A gravidade dos casos é maior neste grupo, com evolução rápida pela disseminação

linfática. Nesta forma da doença, raramente há o comprometimento pulmonar, mesmo sendo possível realizar exame positivo de escarro para *Paracoccidioides* sp. (RESTREPO; TRUJILLO; GOMEZ, 1989). Os principais sintomas são linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas.

- *Forma crônica*: corresponde a forma mais comum da PCM, acometendo mais de 90% dos pacientes. Costuma ocorrer em adultos entre 30 e 60 anos, com predominância de pacientes do sexo masculino. Tem progressão lenta, com desenvolvimento de sintomas quando focos quiescentes do *Paracoccidioides* sp. tornam-se ativos, muitas vezes anos após o possível contato com o fungo. Os principais órgãos acometidos são os pulmões (90% dos casos), mucosas e pele.
- Ainda pode-se subclassificar a *PCM doença* como *Unifocal* ou *Multifocal* quando apenas um ou mais órgãos forem acometidos pelo fungo, respectivamente.
- *Forma residual ou sequelar*: independentemente do órgão atingido, a PCM geralmente se cura com formação de grande quantidade de fibrose e por isso muitos pacientes apresentam sequelas incapacitantes após o tratamento, como fibrose em pele e mucosas com alterações crônicas de voz, fibrose pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crônica, comprometimento adrenal ou de sistema nervoso central, entre outros.

Devido à disseminação linfática e sanguínea, qualquer órgão pode ser infectado pelo *Paracoccidioides* sp., desenvolvendo uma gama muito diferente de sintomas, o que dificulta a identificação da PCM apenas através da realização do diagnóstico clínico. Como a forma crônica soma aproximadamente 90% dos casos, a PCM constitui problema de Saúde Pública pelo seu potencial incapacitante e mortes prematuras, uma vez que as pessoas mais afetadas são justamente aquelas em idade produtiva (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Sabe-se que o *Paracoccidioides* sp. tem a capacidade de iniciar os sintomas da doença após um longo período de latência, portanto não sendo incomum e estranho ocorrerem recaídas na PCM, mesmo após o término de um

longo período de tratamento, uma vez que pode haver focos quiescentes, inclusive devido à formação de fibrose (BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

2.1.2 Proteção Hormonal

Na infância, a PCM se distribui de maneira uniforme entre os sexos, mas entre adultos ocorre entre 10 e 15 vezes mais em homens do que em mulheres antes da menopausa (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Em estudo sobre os óbitos ocorridos por PCM entre 1980 e 1995, 84,2% das mortes eram de homens (COUTINHO et al., 2002). Apesar da exposição ao fungo ser praticamente igual entre homens e mulheres, o predomínio da PCM em indivíduos do sexo masculino gerou estudos para tentar entender o motivo desta diferença.

Formulou-se a hipótese de que os hormônios femininos poderiam ser os responsáveis pela resistência natural a PCM em mulheres. Considerando-se que a transformação dos conídios (forma infectante do *P. brasiliensis*) para leveduras (forma parasitária) é o primeiro passo para o sucesso da infecção, isto começou a ser analisado. Primeiramente, descobriu-se que existem no citosol do *P. brasiliensis* proteínas ligadoras de esteróides com alta afinidade para o 17 β -estradiol, sendo este o possível receptor hormonal que reconhece também estrógenos dos mamíferos (LOOSE et al., 1983). *In vitro*, a transformação de micélios e conídios para leveduras foi especificamente inibida pelo uso de 17 β -estradiol, sem afetar transformação de levedura para micélio, o crescimento das leveduras ou a reprodução das mesmas por brotamento (RESTREPO et al., 1984; SALAZAR et al., 1988).

Trabalho experimental com camundongos demonstraram diferenças no desenvolvimento da doença entre os sexos após infecção com *P. brasiliensis*, através de inoculação intranasal de conídios. Os camundongos machos apresentaram aumento no número de leveduras, com diminuição no número de conídios, enquanto fêmeas apresentavam apenas conídios, ou seja, a transição não ocorreu e a infecção foi eliminada (ARISTIZABAL et al., 1998).

Através da análise de expressão de transcritos de DNA, Shankar et al. (2011) demonstraram ser possível que o 17 β -estradiol exerça seu efeito inibitório através de genes de sinalização que regulam o dimorfismo do *Paracoccidioides* sp.

Além do efeito direto dos hormônios femininos sobre o

Paracoccidioides sp., acredita-se que há outros fatores nas fêmeas que também contribuem para sua resistência natural ao desenvolvimento da PCM. Em estudo com camundongos machos e fêmeas, diferenças em mecanismos imunológicos foram descritos, como alta produção de citocinas Th1 em fêmeas e de Th2 em machos, além de atividade fungicida de macrófagos mais eficiente em fêmeas, provavelmente devido à produção 50% superior de óxido nítrico, enquanto a atividade fagocítica era semelhante entre os sexos. Isto demonstra que hormônios sexuais possuem grande efeito sobre a biologia de células do sistema imune, com efeito protetor do estradiol (PINZAN et al., 2010).

Os resultados *in vivo* e *in vitro* indicam que os hormônios femininos bloqueiam ou diminuem a transformação de conídios para leveduras no local primário de infecção, sendo responsáveis pela resistência natural das fêmeas a infecção pelo *Paracoccidioides* sp. Isto pode justificar o fato da proporção de incidência entre os sexos ser semelhante na faixa etária infantil.

2.1.3 Patogenia e Respostas Th1/Th2

Quando ocorre a infecção através da inalação dos propágulos do *Paracoccidioides* sp., há a transformação nos pulmões para a forma patogênica de levedura. O organismo do hospedeiro pode eliminar completamente o fungo (cura espontânea), inibi-lo e gerar uma condição assintomática (PCM infecção), ou desenvolver-se e causar a PCM doença, inicialmente causando lesões nos pulmões que podem se disseminar para outros órgãos e tecidos por via linfática ou sanguínea, formando lesões secundárias em mucosas, pele, nódulos linfáticos e glândulas adrenais (BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

Quatro estágios histopatológicos (NEGRONI, 1994) são descritos na PCM de acordo com as respostas inflamatórias e tipo de células envolvidas: (1) estágio neutrofílico ou monocítico-neutrofílico: dura 2 a 3 dias, com predominância de neutrófilos acompanhados de linfócitos e macrófagos; (2) fase prégranulomatosa: dura de 7 a 10 dias, com aumento no fluxo de linfócitos e macrófagos; (3) período granulomatoso: formação de granulomas epitelióides compactos com área central com diferentes graus de necrose caseosa, supuração e carga fúngica; cercado por células gigantes e epitelióides e por um halo externo de linfócitos; (4) estágio crônico: granulomas altamente compactos, poucos fungos e crescente grau de

fibrose.

A resposta Th1 é responsável pela imunidade mediada por células e pela produção de anticorpos IgG opsonizantes, produzindo um perfil de citocinas que estimula a inflamação e ativa certas células T e macrófagos, caracterizado pela presença de citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- β . Já a resposta Th2 corresponde à imunidade humoral com ativação de células B, eosinófilos e com produção de anticorpos, sendo caracterizada pela produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (KINDT; OSBORNE; GOLDSBY et al., 2007).

O balanço entre respostas Th1 e Th2 tem papel central na imunidade contra microrganismos infecciosos. O fenótipo considerado resistente à doença pelo *Paracoccidioides* sp. é aquele que apresenta resposta Th1, com papel protetor pela produção de IL-12, IFN- γ e IL-2. Já a susceptibilidade é associada à produção de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , sugerindo-se que a resposta Th2 seja responsável pela progressão da PCM (CALICH; KASHINO, 1998).

A resposta imune celular (Th1) controla a infecção pelo *Paracoccidioides* sp., com produção de citocinas que ativam macrófagos e linfócitos T, formando granulomas compactos associados com pequeno número de células fúngicas que impedem a disseminação do fungo. Este quadro está presente em pacientes com doença menos grave. Mas pacientes com PCM geralmente apresentam resposta celular antígeno-específica diminuída, com um desvio para resposta Th2, apresentando granulomas mais frouxos associados com muitas células ativas (inclusive com brotamentos), eosinofilia, hipergamaglobulinemia e altos níveis de IgE específico (BENARD et al., 1997; BORGES-WALMSLEY et al., 2002). Considerando-se que a resposta efetiva contra o *Paracoccidioides* sp. é a resposta imune Th1, este desvio para Th2 costuma gerar quadros mais graves da doença.

A produção de óxido nítrico por macrófagos ativados por IFN- γ inibe a transformação do *Paracoccidioides* sp. de conídios para leveduras, mas também pode ter um efeito secundário causando a imunossupressão observada tanto na PCM experimental quanto humana. Além disso, o IFN- γ também estimula os macrófagos infectados a secretar TNF- α , necessário para a formação de granulomas mais firmes. Portanto tanto IFN- γ quanto TNF- α parecem propiciar resistência, controlando a infecção (SOUTO et al., 2000). Os efeitos do IFN- γ e TNF- α são regulados negativamente por prostaglandinas sintetizadas pela via da

ciclooxigenase, provavelmente secretadas pelas células do hospedeiro em resposta ao *Paracoccidioides* sp., regulando a morte mediada por monócitos (SOARES et al., 2001).

Quando há o desenvolvimento de PCM doença, a resposta de citocinas é diferente em quadros multifocais e unifocais, nestes havendo níveis um pouco mais elevados de IFN- γ e menores de IL-4 e IL-5. Ou seja, mesmo os pacientes apresentando citocinas de resposta Th2, eles apresentam concomitantemente uma resposta Th1 capaz de limitar a disseminação do fungo, diferentemente das formas multifocais (MARQUES MELLO; SILVA-VERGARA; RODRIGUES, 2002).

Costuma-se correlacionar o nível de anticorpos com uma maior gravidade da doença, tendo os pacientes agudos os maiores títulos, seguidos pelos crônicos multifocais e por último os crônicos unifocais. Com o decorrer do tratamento, o título de anticorpos costuma diminuir, sendo acompanhado de melhora clínica. Desta maneira, testes para detecção de anticorpos podem ajudar na escolha do tempo de tratamento (DEL NEGRO et al., 2000). Mas nem sempre o alto nível de anticorpos indica um quadro mais grave de PCM, sendo comum a persistência de anticorpos mesmo após o término de um tratamento considerado bem sucedido (DA SILVA, S. H. et al., 2004).

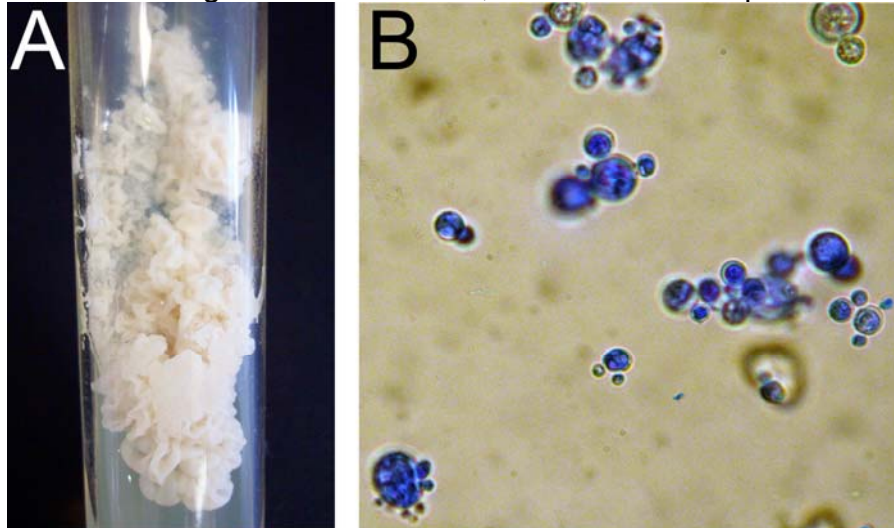
Apesar dos altos níveis séricos de anticorpos serem considerados não protetores (SAN-BLAS, 1993), demonstrou-se que a imunização com anticorpos anti-gp70 pode impedir o desenvolvimento da doença em camundongos, sugerindo-se que a resposta imune humoral possa ter um aspecto protetor na PCM (MATTOS GROSSO et al., 2003).

2.2 O FUNGO *PARACOCCIDIOIDES* SP.

O fungo *Paracoccidioides* sp. é termodimórfico: apresenta-se sob a forma micelial em temperatura ambiente (25°C) e acredita-se que vive de forma saprofítica no solo. Quando cultivado em meio ágar Sabouraud nesta temperatura, apresenta crescimento lento (20-30 dias) de colônias brancas aderentes ao meio e ao exame microscópico, encontram-se filamentos micelianos septados finos, com esporos terminais ou intercalares. Quando *in vivo* parasitando vertebrados ou cultivado *in vitro* a 35°C, o *Paracoccidioides* sp. é leveduriforme, com aspecto macroscópico cerebriforme e microscopicamente apresenta múltiplos brotamentos

que não se desligam da célula mãe, sendo comparado a uma roda de leme(LACAZ et al., 2002), visualizado na Figura 1.

Figura 1 - *Paracoccidioides* sp. cultivado *in vitro* a 35°C. (A) Aspecto macroscópico cerebriforme. (B) Células leveduriformes com a presença de múltiplos brotamentos ligados a célula mãe, vistas o microscópio ótico.



Acredita-se que o *Paracoccidioides* sp. pode apresentar também ciclo sexuado, fato investigado por estudos evolucionários moleculares que revelaram eventos de recombinação dentre populações isoladas, além da presença de genes conservados envolvidos na reprodução sexuada (TEIXEIRA et al., 2012).

2.2.1 Evolução Taxonômica e a Nova Espécie *Paracoccidioides Lutzii*

Trabalho de Matute et al. (2006) indicou que o *P. brasiliensis* consiste em ao menos três espécies distintas: S1 – espécie 1, composta por 38 isolados do Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela; PS2 – espécie filogenética 2, com 6 isolados do Brasil e Venezuela); e PS3 – espécie filogenética 3, contendo 21 isolados colombianos. Além das variações regionais entre as cepas de *P. brasiliensis*, hoje se tem agrupado os isolados atípicos chamados *Pb01-like* em uma nova espécie, *P. lutzii*, identificados através de método de concordância genealógica de reconhecimento de espécies filogenéticas (GCPSR) (TEIXEIRA et al., 2009).

A maior diferença detectada está justamente no gene do principal antígeno produzido pelo *P. brasiliensis*, a gp43, apresentando 89% de identidade

com a sequência da cepa de referência Pb18 (TAKAYAMA et al., 2010). Até então, a maioria dos estudos sobre a resposta imune na PCM foram conduzidos apenas com antígenos de *P. brasiliensis*. O *P. lutzii* pode causar diferentes respostas no hospedeiro e apresentar diferenças na virulência e resistência a agentes antifúngicos, sendo necessários estudos mais profundos desta nova espécie. Um dos problemas a ser superado é que a gp43 não é o principal antígeno produzido pelo *P. lutzii*, podendo inclusive estar ausente em algumas cepas (BATISTA et al., 2010). A dificuldade agora é entender se a resposta imunológica será semelhante contra antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, uma vez que estas respostas já variam com a origem do antígeno utilizado.

Atualmente o fungo *Paracoccidioides* sp. enquadra-se seguinte categoria taxonômica (LACAZ et al., 2002): Reino Fungi; Filo ou Divisão Eumycota; Subdivisão Deuteromycotina; Classe Hypomycetes; Ordem Onygenales¹; Família Ajellomycetaceae¹; Gênero: *Paracoccidioides*; Espécies: *brasiliensis* (S1, PS2, PS3)² e *lutzii*³.

2.2.2 Ciclo Biológico

Não se sabe ao certo quais os verdadeiros habitats e nichos ocupados pelo *Paracoccidioides* sp. O trabalho de Bagagli et al. (2008) resume o provável ciclo biológico do *P. brasiliensis*, que cresce bem tanto em solos argilosos quanto arenosos onde há alta umidade, sendo a disponibilidade de água um fator limitante para o crescimento do fungo, além de não crescer em solos contendo altas quantidades de alumínio trocável. Outros fatores seletivos ambientais podem ser: radiação solar, precipitação, competição e predação. No ambiente, existe a propagação vegetativa através da produção de conídios assexuais. A possível via de infecção é a inalação de propágulos do fungo liberados do solo quando este é manuseado, não sendo possível descartar a via de inoculação dos mesmos por traumatismo, principalmente por espécies que parecem não produzir conídios

¹ Através da análise de sequências de DNA, uma nova filogenia foi inferida, demonstrando que a ordem Onygenales contem subtipos que não correspondem às famílias previamente descritas, enquadrando *Ajellomyces* (incluindo os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia* e *Histoplasma*) e *Paracoccidioides* na nova família Ajellomycetaceae (UNTEREINER et al., 2004).

² Divisão do *P. brasiliensis* em 3 espécies sugerida em 2006 (MATUTE et al., 2006).

³ Agrupamento de cepas atípicas de *P. brasiliensis*, sugerindo-se a nova espécie *P. lutzii* (TEIXEIRA et al., 2009)

(THEODORO et al., 2008). Nos hospedeiros, ocorre a conversão para levedura, com reprodução assexuada por brotamento e disseminação por via linfática e/ou hematogênica. Acredita-se que apenas com a morte do hospedeiro tem-se o retorno do *P. brasiliensis* para o ambiente (BAGAGLI et al., 2008).

Além do humano, outros vertebrados das áreas endêmicas da PCM já foram alvo de estudos sobre anticorpos ou antígenos específicos, mas aparentemente o tatu de nove-bandas ou tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) pode ser o reservatório do fungo, por ter uma temperatura corporal mais baixa, sistema imunológico fraco e estar em constante contato com o fungo no solo, sendo o único animal de que foi possível isolar o *Paracoccidioides* sp. repetidamente (BAGAGLI et al., 1998; BAGAGLI et al., 2008).

2.2.3 Fatores de Virulência e Mecanismos de Escape

A mudança da forma micelial para levedura patogênica resulta em mudança não apenas na forma da célula, mas também na composição da parede celular, na presença de moléculas antigênicas e de fatores de virulência (KLEIN; TEBBETS, 2007). O próprio dimorfismo térmico pode ser considerado como um importante fator de virulência, uma vez que a temperatura corporal dos vertebrados acometidos pelo *Paracoccidioides* sp. costuma ser alta (KUROKAWA; SUGIZAKI; PERAÇOLI, 1998).

Um importante fator de virulência do *P. brasiliensis* é a α -1-3-glucana presente na parede celular, cuja quantidade correlaciona-se ao grau de virulência fúngica. Quando mantido em cultura por longo tempo, a virulência atenua-se pela diminuição da presença de α -1-3-glucana na parede celular, sendo regenerada quando o fungo é inoculado em animais e posteriormente reisolado (LACAZ et al., 2002). Possivelmente a α -1-3-glucana oculta a presença de β -glucanas presentes na parede celular para que não sejam detectadas por receptores dectin-1 de células fagocíticas, impedindo assim a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α por não permitir a estimulação destas células (KLEIN; TEBBETS, 2007).

Várias enzimas são secretadas pelos fungos no meio de cultura, como proteinases, lipases e fosfolipases, que tem papel fundamental no metabolismo fúngico gerando nutrientes, também podendo atuar no desenvolvimento da infecção, causando danos às células do hospedeiro e

consequente invasão de tecidos (KUROKAWA et al., 1998).

Dentre as proteínas caracteristicamente produzidas pelo *P. brasiliensis*, a glicoproteína de 43 kDa (gp43) é o seu principal antígeno, sendo considerado também um fator de virulência. Ela está presente na parede celular e acredita-se estar envolvida na adesão celular à membrana basal e matriz extracelular, pois tem capacidade de se ligar a laminina (VICENTINI et al., 1994), além de ter atividade proteolítica sobre o colágeno, elastina e caseína (MENDES-GIANNINI; MORAES; RICCI, 1990). Assim, a invasão às células do hospedeiro pode ser atribuída em parte a ação da gp43.

Alguns mecanismos de evasão do *P. brasiliensis* são o efeito supressor sobre a proliferação de linfócitos (*in vitro*) (KUROKAWA et al., 1998) e a capacidade de estimular a produção de células supressoras e suas citocinas, demonstrado através de modelo experimental murino com diminuição da resposta imune mediada por células (JIMENEZ-FINKEL; MURPHY, 1988).

2.2.4 Glicoproteínas de Importância Diagnóstica

Vários trabalhos têm descrito glicoproteínas de diversos tamanhos de massa molecular (MM) produzidas pelo *P. brasiliensis*, extraídas por diferentes técnicas de obtenção de antígenos: antígeno livre de célula (*cell free antigens*, CFA), exoantígeno (ExoAg) proveniente de sobrenadante/filtrado de cultura em meio líquido e antígeno somático (AS) obtido por ruptura das células fúngicas. Várias moléculas estão presas de maneira frouxa a superfície celular, sendo facilmente soltas quando suspensas em solução aquosa. Ao contrário das moléculas liberadas em meio de cultura líquido, que podem sofrer ação de proteases endógenas ali também presentes, as moléculas de CFA parecem mais com os antígenos liberados *in vivo* que interagem com as células do sistema imune (BLOTTA; CAMARGO, 1993), sendo portanto uma boa alternativa para obtenção de antígenos mais fiéis a realidade.

As MM de alguns componentes descritos na literatura são: 20-21, 43, 52, 55, 70 kDa e glicoconjugado polidisperso de alta massa molecular, de 278 kDa a 466 kDa, com média de 366 kDa (*high Molecular Mass*, hMM). Os principais antígenos reconhecidos por soros de pacientes com PCM são a gp43, gp70 e hMM (BLOTTA; CAMARGO, 1993; CAMARGO et al., 1991; CAMARGO et al., 1989;

MARQUEZ et al., 2005; PUCCIA et al., 1986).

Descrita inicialmente em trabalho de Puccia et al. (1986), a gp43 é a glicoproteína imunodominante do *P. brasiliensis* e o principal antígeno utilizado no diagnóstico por ser reconhecida por quase 100% dos soros de pacientes com PCM (CAMARGO, Z. P. et al., 1991; CAMARGO, Z. P. et al., 1989; PANUNTO-CASTELO et al., 2003; TABORDA; CAMARGO, 1994). A gp43 é um estímulo persistente para produção de anticorpos, pois está presente na membrana celular e é liberada pelo fungo em grande quantidade (MENDES-GIANNINI et al., 1989). A expressão da gp43 varia de acordo com a cepa: cepas conhecidamente produtoras de gp43 podem deixar de produzi-la, podendo sua produção ser restaurada posteriormente, assim como cepas não produtoras podem passar a expressar gp43 (BERZAGHI; DA SILVA; CAMARGO, 2005). Portanto, alguns lotes de antígeno, mesmo que produzidos sempre nos mesmos moldes, podem não ser precipitados por soros conhecidamente positivos para PCM, gerando resultados falsos negativos.

A gp70 também é um importante marcador da PCM, uma vez que 60-100% dos soros de pacientes com PCM reconhecem esta glicoproteína. Assim como para a gp43, sua concentração de antígenos e anticorpos específicos diminui no decorrer do tratamento com drogas antifúngicas (CAMARGO et al., 1989; DA SILVA et al., 2004; PANUNTO-CASTELO et al., 2003). A gp70 está localizada principalmente no meio intracelular e tem capacidade de alterar a atividade de macrófagos *in vitro*, inibindo a fagocitose por receptores Fc e de manose, além de inibir a liberação de NO e H₂O₂. Portanto, a gp70 poderia ser um mecanismo de escape do *P. brasiliensis* para estabelecimento e progressão da infecção inicial. Testes utilizando anticorpos monoclonais anti-gp70 poderiam ajudar no combate a infecção bloqueando os efeitos inibitórios desta glicoproteína, facilitando a remoção do fungo dos tecidos (MATTOS GROSSO et al., 2003).

A fração hMM constitui entre 15 e 20% do CFA produzido por diversas cepas de *Paracoccidioides* sp., sendo um antígeno solúvel detectável durante a infecção (FREDRICH et al., 2010). Existe uma forte resposta de IgG, mas não de IgE a fração hMM em soros de pacientes com PCM, sugerindo uma resposta Th1 estimulada por este antígeno (MARQUEZ et al., 2005). *In vitro*, a hMM causa a proliferação de linfócitos e produção de IFN- γ em células esplênicas, corroborando a ideia de indução Th1, o que poderia ajudar no combate a infecção (PAVANELLI et al., 2007). O possível papel protetor da fração hMM foi demonstrado em estudo de

PCM experimental, quando camundongos previamente imunizados com hMM apresentaram títulos mais altos de IgG anti-hMM, menor número de CFU (unidades formadoras de colônias), granulomas mais compactos e organizados vistos nos resultados de histopatologia e níveis menores de antigenemia (PAVANELLI et al., 2007). Sendo assim, a detecção de IgG anti-hMM pode servir como marcador de bom prognóstico, auxiliando também na escolha do tempo de tratamento e servindo como diferencial entre quadros de PCM aguda e crônica.

2.2.5 Diagnóstico Laboratorial

O fato de haver uma gama muito diferente de sintomas na PCM dificulta a realização de um diagnóstico clínico preciso, sendo as técnicas laboratoriais de grande auxílio.

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2009), o padrão ouro do diagnóstico laboratorial é a identificação direta do fungo em espécimes clínicos (escarro, raspado de lesão, aspirado de linfonodo, etc.), seja pelo exame micológico direto, análise histopatológica (biópsias) ou por cultura. Para isso, é necessário pessoal treinado tanto para a realização dos exames quanto para a obtenção de amostras que sejam representativas da infecção, uma vez que a heterogeneidade do material examinado pode erroneamente levar a um resultado negativo para a presença do *Paracoccidioides* sp. Infelizmente, muitas amostras coletadas são de baixa qualidade ou então não se recomenda a realização de biópsias pelo fato dos focos serem de difícil acesso, como quando há acometimento do sistema nervoso central (DA SILVA et al., 2005). Existe ainda a dificuldade natural no isolamento do *Paracoccidioides* sp., devido ao seu crescimento lento, sendo sobreposto por outros fungos e bactérias que possam estar presentes na amostra, mesmo com o uso de antibióticos e antifúngicos no meio de cultura (LACAZ, 1994b).

Devido a essas dificuldades, o desenvolvimento de testes para detecção de anticorpos ou antígenos em diversos materiais biológicos que possam auxiliar no diagnóstico da PCM tem sido alvo de constantes pesquisas, utilizando diversas técnicas como contraímuno eletroforese (CIE), fixação do complemento, imunofluorescência, imunoblot, imunodifusão (ID) e ensaio imunoenzimático (ELISA).

Durante o processo de infecção do *Paracoccidioides* sp., seus

antígenos liberados ativam linfócitos B que passam a produzir anticorpos específicos. Como geralmente estão em alta concentração nos fluidos biológicos, a detecção de anticorpos tornou-se uma importante ferramenta no diagnóstico sorológico e monitoramento da evolução do tratamento ou da doença (CAMARGO, 2008).

Um dos problemas sempre questionados quanto às técnicas laboratoriais é a padronização de antígenos utilizados. Além dos diferentes métodos utilizados para obtenção de antígeno total (CFA, ExoAg e AS), há variações nas técnicas entre laboratórios, com diferentes tempos de incubação, cepas utilizadas, meio de cultura, etc. Existe ainda a variação de virulência e de produção de antígenos entre as diversas cepas. Além disso, os isolados de *Paracoccidioides* sp. provavelmente são originados de culturas policlonais presentes na natureza com possíveis propriedades antigênicas diferentes dentro de uma mesma cepa. Outro fator preocupante é a alteração da produção de fatores de virulência durante o cultivo *in vitro* do *Paracoccidioides* sp., que pode deixar de produzir espontaneamente seu principal fator antigênico, a gp43 (BERZAGHI et al., 2005). Por isso, é necessário manter-se um controle de qualidade sobre os insumos imunobiológicos produzidos.

Na maioria dos trabalhos sobre PCM, utiliza-se o ExoAg. Camargo et al (1991) utilizaram CFA e observaram 100% de sensibilidade e especificidade, comprovando ser uma técnica adequada para produção de antígenos utilizados no sorodiagnóstico da PCM. ExoAg e CFA produzem uma gama semelhante de antígenos, especialmente a gp43, principal glicoproteína do *P. brasiliensis* (CAMARGO et al., 1991; CAMARGO et al., 1988). A vantagem do uso de CFA como reagente nos testes de ID e ELISA é por ser uma técnica menos trabalhosa quando comparada a produção de ExoAg, mas este apresenta uma concentração de proteínas até 20 vezes maior (PANUNTO-CASTELO et al., 2003).

As proteínas mais utilizadas nos testes diagnósticos são o antígeno total (geralmente ExoAg) ou proteínas específicas extraídas a partir do antígeno bruto, principalmente gp43 e gp70.

A ID é a técnica sorológica mais utilizada por sua facilidade de execução e baixo custo. É o teste sorológico para PCM disponível no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo as outras técnicas empregadas apenas em centros de referência e pesquisa (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Nesta técnica, geralmente

utiliza-se o antígeno total de *Paracoccidioides* sp., cujo principal antígeno presente é a gp43 (CAMARGO et al., 1991; CAMARGO et al., 1988). O número de bandas de precipitina produzidas na ID são um indicador da gravidade da doença, sendo a banda formada pela reação com a gp43 a mais próxima do orifício onde o antígeno é colocado, demorando mais tempo do que outras bandas para desaparecer durante tratamento (RESTREPO; MONCADA, 1974). Em doenças crônicas, os anticorpos costumam ter forte avidéz, pela exposição prolongada aos antígenos, mas o contrário foi identificado na PCM por Neves et al. (2003) em pacientes conhecidamente doentes, mas com ID negativa. Isto pode ser devido a uma predominância de IgG2, que costuma ter menor avidéz, podendo gerar resultados falso negativos.

Apesar de trabalhos indicarem alta especificidade e sensibilidade, variando de 65 a 100% dependendo do antígeno usado (CAMARGO, 2008), a ID é menos sensível do que outros métodos, detectando um mínimo de 3 µg de anticorpo por mL, enquanto técnicas como o ELISA são capazes de detectar a partir de 0,05 µg/mL (MENDES-GIANNINI; DEL NEGRO; SIQUEIRA, 1994). Por isso, recomenda-se a associação da ID com outros métodos mais sensíveis, principalmente se os resultados da ID forem inconclusivos (DEL NEGRO et al., 1995; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Além da maior sensibilidade verificada na técnica de ELISA, suas vantagens são a relativa facilidade de execução, a estabilidade dos reagentes utilizados, a possibilidade de detectar diversas classes de imunoglobulinas e de poder ser um teste quantitativo (MENDES-GIANNINI et al., 1994). Pons et al. (1976) usaram pela primeira vez a técnica da imunoperoxidase para determinar a presença de anticorpos específicos através da fixação leveduras de *P. brasiliensis* à uma lâmina de microscópio. Desde então as técnicas de ELISA vêm sendo empregadas nos estudos sobre PCM, seja utilizando antígeno total ou antígenos purificados, principalmente gp43 e gp70. Variações da técnica são empregadas para detecção de antígenos ou de anticorpos específicos, como ELISA indireto, captura e de inibição, apresentando alta sensibilidade, mas às vezes com especificidade um pouco mais baixa. A Tabela 1 enumera alguns trabalhos realizados nos últimos anos utilizando ELISA no diagnóstico e acompanhamento do tratamento da PCM, demonstrando sua vasta aplicação.

Tabela 1 - Relação parcial de referências utilizando técnicas de ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos ou anticorpos no estudo da PCM humana.

Referência	Técnica	Ag ou Ac investigado	Amostra
PUCCIA; TRAVASSOS, 1991	ELISA clássico e imunoprecipitação	Anticorpos anti-gp43	Soro
FREITAS-DA-SILVA; ROQUE-BARREIRA, 1992	ELISA competitivo	Antígeno total	Soro
CAMARGO et al., 1994	ELISA captura utilizando anticorpos monoclonais	IgG anti-gp43	Soro
GOMEZ et al., 1997	ELISA de inibição	Antígeno de 87 kDa	Soro
MARTINS et al., 1997	ELISA clássico, Dot-blot e Western Blot	IgG, IgA e IgM anti- <i>P. brasiliensis</i>	Soro
SALINA et al., 1998	Imunoblot e ELISA de competição	Antígeno total	Urina
JUVENALE et al., 2001	ELISA clássico, ID, CIE e imunoblot	IgG total e subclasses anti- <i>P. brasiliensis</i>	Soro
MIURA et al., 2001	(1) ELISA clássico; (2) ELISA captura;	(1) IgG e IgA secretora anti-ExoAg, (2) antígenos de 43 kDa	Saliva, soro
MARQUES DA SILVA et al., 2003	ELISA de inibição	Antígenos de 43 kDa	Soro, líquido e lavado bronco alveolar
DA SILVA et al., 2004	ELISA de inibição	Antígeno de 70 kDa	Soro, líquido e lavado bronco alveolar
MARQUES DA SILVA et al., 2004	ELISA de inibição	Antígeno de 43 kDa	Soro
DA SILVA et al., 2005	(1) ELISA de inibição; (2) ID e ELISA clássico	(1) antígenos de 43 e 70 kDa; (2) anticorpos anti-gp43 e anti-gp70	Líquor, soro
MARQUEZ et al., 2005	ELISA e imunoblot	IgG anti-hMM	Soro
MARQUES-DA-SILVA et al., 2006	ELISA de inibição	Antígenos de 43 e 70 kDa	Lavado bronco alveolar e soro

*Ag: antígeno; Ac: anticorpo

Reações falso positivas (reações cruzadas) podem ocorrer com soros de pacientes com histoplasmose, aspergilose e doença de Jorge Lobo, devido à presença de epítomos em comum com o *Paracoccidioides* sp. (MENDES-GIANNINI et al., 1994). Apesar da existência de reação cruzada, a técnica de ELISA indireto ainda é usada com frequência com a determinação de uma zona de corte (cutoff), o que permite distinguir casos de PCM de outras doenças fúngicas.

Em muitas das técnicas empregadas para detecção de anticorpos na PCM ocorrem reações falso negativas. Sugere-se que seja motivado pela presença de lesões muito localizadas ou pelo fato de que, no momento do diagnóstico, o sistema imune do paciente possa estar deprimido. Após algum tempo de tratamento, o paciente tem sua imunidade restaurada e os testes tornam-se positivos (CAMARGO, 2008; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Por isso, tem-se sugerido o uso de técnicas para detecção de antígenos.

O trabalho de Del negro et al. (2000) relacionou a forma de apresentação da PCM (aguda, crônica uni/multifocal) com a quantidade de anticorpos contra antígeno total antes, durante e após o tratamento. Demonstrou-se que quanto maior a gravidade da doença, maior é a quantidade inicial de anticorpos, podendo-se correlacionar a quantidade de anticorpos com a quantidade de fungo circulante. Os títulos mais altos costumam ser encontrados em pacientes agudos. Após alguns meses de tratamento há uma queda de anticorpos, variando a intensidade e o tempo necessário para diminuição conforme a intensidade da doença. A avaliação imunológica é útil não apenas para o diagnóstico, servindo para confirmação da PCM ou no auxílio da determinação do tempo de tratamento, mas também tem sua utilidade no acompanhamento do doente. Para todas as técnicas sorológicas utilizadas, recomenda-se que os soros sejam titulados/diluídos, para que testes consecutivos possam dar uma ideia da resposta terapêutica, uma vez que os níveis de antígenos e anticorpos específicos diminuem com o decorrer do tratamento e com a melhora dos sintomas (CAMARGO et al., 1989; DA SILVA et al., 2004; PANUNTO-CASTELO et al., 2003). A negativação ou estabilização em títulos baixos de anticorpos serve como um dos critérios de cura da PCM (BRASIL, 2009).

No futuro, técnicas moleculares poderão ser utilizadas para diagnóstico através da identificação direta de material genético do *Paracoccidioides* sp. nas amostras coletadas. Estes métodos são considerados muito eficientes, uma vez que é possível obter resultados positivos com uma pequena quantidade de

material. Já foi possível detectar o *Paracoccidioides* sp. em escarro, biópsias de cavidade oral e em outros tecidos, inclusive após a inclusão em parafina (BIALEK et al., 2000; ENDO et al., 2004; GOMES et al., 2000; KOISHI et al., 2010). Os métodos moleculares também apresentam a vantagem da rapidez na execução. Já foi possível amplificar a sequência da gp43 do material genético do *Paracoccidioides* sp. em menos de 4 horas através do método de amplificação circular isotérmica (LAMP) (TATIBANA et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Determinar e correlacionar níveis de anticorpos IgG a antígenos de *P. brasiliensis* (S1, PS2) e *P. lutzii*, na PCM humana.

3.2 ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar parcialmente os isolados de *Paracoccidioides* sp. proveniente de amostras clínicas;
- Obter CFA e AS do fungo *P. brasiliensis* (S1, PS2) e *P. lutzii*;
- Realizar testes de identidade de antígenos de *P. brasiliensis* (S1, PS2) e *P. lutzii*;
- Obter as frações de gp43, gp70 e hMM de *P. brasiliensis* (S1, PS2) e *P. lutzii*;
- Avaliar e comparar os níveis séricos de IgG a CFA, gp43, gp70 e hMM de *P. brasiliensis* (S1, PS2) e *P. lutzii* na PCM humana;
- Correlacionar níveis séricos de anticorpos IgG a antígenos de *P. brasiliensis* (S1, PS2) e *P. lutzii*;
- Determinar o título do soro de pacientes com PCM por teste de ID radial dupla utilizando CFA de *P. brasiliensis* (S1, PS2) e *P. lutzii*.

4 ARTIGO PARA A REVISTA MYCOPATHOLOGIA

As páginas 38 à 56 correspondem ao artigo científico a ser submetido a revista “Mycopathologia” e por isso possuem duas numerações:

- Canto direito superior: corresponde a sequência de páginas da dissertação.
- Canto direito inferior: corresponde ao número de páginas do artigo, conforme norma da revista.

Em sua edição, foram utilizados as instruções e os arquivos disponibilizados pela revista em:

http://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/11046?detailsPage=pltc_1890368

- Modelo Word com a formatação utilizada na revista, disponível em:

http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/sv-journ.zip?SGWID=0-0-45-431298-0

- Modelo de estilos do Endnote para formatação das referências, disponível em:

http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/SpringerVancouverNumber.zip?SGWID=0-0-45-945137-0

Chronic paracoccidioidomycosis sera may distinctly recognize antigens from

Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii

Serum IgG to *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* antigens

Lenhard-Vidal, A.⁴, Assolini, J.P⁵. Ono M.A¹; Bredt C. S. O⁶ & Itano E.N.^{1*}

⁴ Department of Pathologic Sciences, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil

⁵ University Center Philadelphia, UniFil, Londrina, PR, Brazil

⁶ State University of Western Paraná, Cascavel, PR, Brazil

* *Correspondence to:* Eiko Nakagawa Itano*. Departamento de Ciências Patológicas, CCB. Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário. 86051-970 Londrina, PR, Brazil. Phone: +55 43-3371-4469; Fax: +55 43-3371-4207; E-mail: itano@uel.br

Abstract. Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (S1, PS2, PS3) and by the new species, *P. lutzii*. Considering that the genetic differences in *Paracoccidioides* genus could cause distinct immune responses by the host, current research investigated serum IgG levels to antigens from *P. brasiliensis* B339 (S1), *P. brasiliensis* LDR3 (PS2) and atypical strain LDR2 (*P. lutzii*), in patients with the chronic PCM from the northern and west regions of Paraná, Brazil (n= 35). Cell-free antigen (CFA) and high molecular mass fraction (hMM) were produced from each strain. Samples were analyzed by ELISA and by immunodiffusion (ID). By ELISA, 100%, 83% and 74% of sera were positive using CFA from B339, LDR3 and LDR2, respectively. Response to CFA from B339 was more intense ($p<0.05$), while there was no difference between LDR3 and LDR2. IgG anti-hMM was higher for antigens from B339 or LDR3, when compared to LDR2 ($p<0.05$). There was a positive correlation for each strain between CFA-hMM and for hMM between B339-LDR3 and LDR3-LDR2. ID results were 63%, 66% and 60% positive using CFA from B339, LDR3 and LDR2, respectively. We conclude that the intensity of reaction of the patients' sera varies according to the strain used; the hMM influences the tests that use CFA, independently of strain; and antigens derived from *P. brasiliensis* S1 seem to be more efficient than those from PS2 and *P. lutzii* for diagnostic of PCM in this region of Brazil, using ELISA but not the ID technique.

Keywords: Mycosis; Immunodiagnostic; Immunoenzymatic assay; Double immunodiffusion; Antigen identity

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis* and the new species *P. lutzii* [1], restricted to Latin America, from Mexico to Argentina, which affects mainly male rural workers [2]. Two main clinical presentations are reported: PCM infection with no clinical symptoms and PCM disease. This can be divided into the acute form, more severe and with higher death rates, and the chronic form, which accounts for 90% of the cases, mainly with lung impairment and skin/mucosae lesions [3]. PCM is not a compulsory notification disease in Brazil, which hampers the knowledge of its exact prevalence and mortality.

PCM diagnosis is usually clinical or relies on the finding of its etiological agent in the biological sample (sputum, scraping, biopsy), which requires highly trained personnel. Serological tests are helpful in the diagnosis and especially in the treatment follow-up of PCM patients. The immunodiffusion (ID) test is the most common used technique, due to its low costs and its ease of execution, but it has more false negative results rates when compared to other methods. Therefore, it is

important to combine the ID with a more sensitive method, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [4, 3].

In PCM, high levels of specific antibodies are usually correlated with a more severe presentation of the disease [5]. The most used antigens in serodiagnosis of PCM are exoantigens (ExoAg), cell free antigens (CFA) and the purified glycoprotein of 43 kDa (gp43) [6-11]. One possibly useful and under researched antigen is the high molecular mass fraction (hMM), which may be used to differentiate chronic and acute forms of the disease [12].

The thermomorphous fungus of the genus *Paracoccidioides* sp. was initially sorted in 1998 by geographic distribution [13]. Gene genealogies study published in 2006 [14] divided *P. brasiliensis* into three distinct clades: S1 (species 1; 38 isolates from Brazil, Argentina, Paraguay, Peru e Venezuela), PS2 (phylogenetic species 2, with 6 isolates from Brazil and Venezuela) and PS3 (phylogenetic species 3, with 21 Colombian isolates). Nevertheless, some researches demonstrated the existence of atypical isolates that did not fit in any of the proposed groups, having extensive genetic variability, which suggested the possible existence of another clade [15-18]. In 2009, Teixeira et al. [1] used the genealogic concordance method of phylogenetic species recognition (GCPSR) to analyze *P. brasiliensis* isolates and proposed grouping the atypical isolates (*Pb-01 like*) as the new species *P. lutzii*.

Until today, most researches of the immune responses driven by PCM were performed only with *P. brasiliensis* antigens. The new species *P. lutzii* may cause different responses by the host and present distinguished virulence or resistance to antifungal drugs. Considering the genetic diversity of the fungus *Paracoccidioides* sp., it is necessary to study the immune responses raised against these variations, because this may interfere in PCM's immunodiagnosis or in its pathogenesis. Current research aimed to investigate the serum levels of IgG anti-CFA and anti-hMM produced by three different strains of three different clades of *Paracoccidioides* sp. in a group of chronic PCM patients. Because *P. brasiliensis* PS3 isolates are solely found in Colombia, we excluded this clade from our study. We used a *P. lutzii* strain (LDR2) that was isolated from a patient living in the northern region of Paraná State, Brazil [18].

Material and methods

Serum samples

The PCM group consisted of serum samples from patients from the northern and west regions of Paraná State, Brazil (Clinics Hospital, University Hospital and University Dental Clinic, from Londrina State University [HC / HURNP / COU - UEL]; Municipal Laboratory from Foz do Iguaçu; Clinics Hospital from State University of Western Paraná [HC / UNIOESTE]). A total of 35 samples were used, 5 from female and 30 from male patients with chronic unifocal or multifocal disease, not-yet treated or currently under treatment, with a mean age of 54 years-old. Sixteen samples of normal human serum (NHS) were used as negative controls (6 men, 10 women) all from the biological samples bank (Applied Immunology Laboratory, CCB, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil). Current study was approved by the Internal Scientific Commission and the Research Bioethics Committee of the State University of Londrina.

Fungal strains

Three strains were used: (1) *P. brasiliensis* species S1 B339 (typical; IFM 41630), [14, 18]; (2) *P. brasiliensis* phylogenetic species PS2: LDR3 (typical; IFM 54649), [18]; and (3) *P. lutzii*: LDR2 (*Pb01-like*; IFM 54648), [18]. The fungi were maintained in yeast form on Sabouraud dextrose agar at 35°C, subcultured every 5 to 7 days.

Antigen preparation and hMM purification

CFA was obtained from the 3 strains according to the method described by Camargo et al. [7], modified by the addition of 2.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) protease inhibitor to the supernatant, which was stored at -80°C until use. For hMM purification, 4 mL CFA samples of each strain were filtered through a 0.45 µm pore diameter membrane and were applied to a Sephacryl S200-HR (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) column (0.65 x 30 cm) equilibrated with 0,15 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2.

Using an automatic fraction collector, 2 mL fractions were obtained and read at 280 nm in a spectrophotometer (Spectrum SP-2000UV; Spectrum, Shanghai, China), which were subsequently at -20°C.

To determine in which fraction the hMM was present, the samples were analyzed by immunoblot. Fractions were treated with mercaptoethanol sample-buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and then examined in individual lanes of a 10% polyacrylamide gel electrophoresis with SDS (10% SDS-PAGE) in tris-glycine buffer, pH 8.1, at 100V, along with a pre-stained molecular weight protein standard was used (Bio-Rad Precision Plus Protein™ Kaleidoscope cat. #161-0375, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane which was incubated with a pool of PCM patients' sera (1:10) for 2 h at 37°C, then with anti-human IgG peroxidase labeled antibody was used (1:2000; Sigma A8775 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 1,5 h at 37°C. Detection was performed using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Zymed cat. #00-2019, Zymed, San Francisco, CA, USA).

To further purify the hMM fraction, the protocol described by Rigobello et al. [19] was followed, using tube electrophoresis. Purity of hMM was determined by immunoblot, as previously described.

ELISA for IgG anti-CFA and anti-hMM

Serum samples were analyzed in duplicates by indirect ELISA to detect IgG anti-CFA or anti-hMM, using antigens from the 3 strains (*P. brasiliensis*: S1, PS2; *P. lutzii*).

High affinity 96 wells polystyrene plates (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) were coated with CFA or hMM from each *Paracoccidioides* sp. at 1 µg/mL (100 µL/well) for 1 h at 35°C and 18 h at 4°C. Unbound sites were blocked for 1 h at room temperature with PBS-Tween-5% skim milk and plates were incubated with serum samples diluted 1:400 in PBS-0.5% skim milk for 2 h at 35°C. Anti-human IgG-peroxidase labeled antibody (Sigma A6029 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was added at 1:4000 dilution and incubated for 1,5 h at 35°C, followed by the addition of o-phenylenediamine (OPD) substrate solution. The reaction was stopped using 50 µL/well of 4N H₂SO₄ and absorbance at 492 nm was measured in a Multiskan EX Reader (Labsystems,

Helsinki, Finland). Antibody levels were expressed as optical density units (O.D.). The cutoff value was determined for each test as the mean plus two standard deviations of the NHS readings in O.D..

ID tests

The ID tests were performed in duplicates as previously described [7], using 25 μ L of antigen or serum per well. The central well was filled using one CFA from each of the three strains and serum samples were applied undiluted and diluted 1:2 to 1:32 in the surrounding wells.

Statistical Analysis

After Shapiro-Wilk normality test and Bartlett's test were applied, One-way ANOVA was performed with Tukey's post hoc test to analyze variables between ELISA groups. Significance was defined as $p\text{-value} \leq 0.05$. Pearson's correlation was defined as a moderate correlation when $0,50 \geq r < 0,75$ and a strong correlation when $r \geq 0,75$. Statistical analyzes were performed using the R software v. 2.13.0 (<http://www.R-project.org/>). Correlation tests and graphics were performed using GraphPad Prism v. 6.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

Results

***Paracoccidioides* sp. CFA fractions analysis by immunoblot**

The spectrophotometric profile at 280 nm of the CFA fractions is shown in Fig. 1a. Upon immunoblot, hMM was observed in fractions 10 and 11 (Fig. 1b). The small amounts of other contaminant proteins recognized in the same fractions, was eliminated by another SDS-PAGE, resulting in purified hMM fraction (not shown).

Serum levels of IgG anti-CFA, anti-hMM and correlation analysis

Fig. 2a shows the ELISA results for detection of IgG anti-CFA of three strains in sera of PCM and NHS groups, expressed in O.D. at 492 nm. All serum samples were positive by ELISA when using CFA from B339 (S1) strain. Considering the number of patients whose readings were below the established cutoff for each strain, the number of false negative results would be 17% for LDR3 (S2) and 26% LDR2 (*P. lutzii*). Significant higher levels of IgG anti-CFA were observed with antigen produced by B339 (S1) strain, when compared to LDR3 and LDR2.

Fig. 2b shows the results expressed in O.D. at 492 nm of the ELISA for IgG anti-hMM. Analyzing the cutoff values for each strain, the number of false negatives results would be 14%, 20% and 17% for B339 (S1), LDR3 (PS2) and LDR2 (*P. lutzii*). There was a significant difference between IgG levels anti-hMM between B339-LDR2 and LDR3-LDR2 strains.

The hMM fraction showed a strong correlation between LDR3-LDR2 and moderate correlation between B339-LDR3. There was a strong correlation between CFA-hMM from each of the strains analyzed.

Serum titers by ID tests

Table 1 summarizes the distribution of the ID tests results according to the titer observed and CFA strain used. Of the 35 sera analyzed, 7 had more than one precipitin band, showing the recognition of more than one antigen from the CFA tested. Table 2 demonstrates the serum titers of these patients.

Of the 35 patients tested, 13 had positive results for all ELISA and ID tests. Of the 17 positive patients for the 3 strains by ID tests, only one had the same titer for the 3 CFAs used (100% concordance). There were 6 patients who had different titers for each CFA, 18 who had the same titer for 2 strains and 10 patients who did not react with any CFA, of which 4 were positive in all ELISA tests.

There were 37%, 34% and 40% of false negative results by ID test when using CFA from B339 (S1), LDR3 (PS2) and LDR2 (*P. lutzii*), respectively. If the ID tests are analyzed along the ELISA results for detection of IgG anti-CFA, the

number of false negative results drops to 0%, 11% and 17% using CFA from B339 (S1), LDR3 (PS2) and LDR2 (*P. lutzii*), respectively.

Discussion

It is common knowledge that *P. brasiliensis* strains have regional variations and that *P. lutzii* is phylogenetic distant from the other clades, then being possible that the immune responses also vary according to the source of the antigen used. The use of methods that detect specific antibodies is an important tool for the diagnosis and treatment follow-up of PCM patients, especially for those with internal organ injuries, which makes it difficult to obtain samples for direct examination.

Current research analyzed the serum levels of immunoglobulins specific for antigens of *P. brasiliensis* (S1, PS2) and *P. lutzii* in chronic PCM patients from the northern and west regions of Paraná state, Brazil. All patients' sera were positive in the ELISA test when using CFA from *P. brasiliensis* B339 (S1) as the antigen. However, 17% and 26% were negative for CFA from LDR3 (PS2) and LDR2 (*P. lutzii*), respectively. Also in this assay, it was observed higher IgG levels anti-CFA from B339 (S1) than from *P. brasiliensis* LDR3 (PS2) or *P. lutzii* (LDR2). The low percentage of positivity and lower IgG levels with CFA from LDR2 observed in this study suggests that this species may not be indigenous to our region. Although the *P. lutzii* strain (LDR2) used in this study was isolated from a patient living in the northern region of Paraná state, Brazil, he had formerly lived in Botucatu, São Paulo, Brazil, so the infection might have occurred previously.

In agreement with other works, the ELISA method was more efficient than ID [20], with 37%, 34% and 40% of false negative results in the ID tests using CFA from B339 (S1), LDR3 (PS2) and LDR2 (*P. lutzii*), respectively. There were also differences detected by ID in the number of precipitin bands between the three strains studied: interestingly, the ID tests using CFA from LDR3 (PS2) presented more frequently two or more precipitin bands (20% of the samples, with different titers for each strain). Differences in positivity by ID have also been demonstrated when sera of patients from Mato Grosso and São Paulo states, Brazil, were tested with strains isolated from these sites [21]. This suggests heterogeneity in the humoral immune response to the diversity of strains causing PCM.

Although ID tests are recommended because it has up to 100% specificity, still false negative results occur due to its lower sensitivity [22, 7]. Some patients had negative ID results but positive ELISA anti-CFA tests, always with lower levels when compared to patients who were positive in both tests, in agreement with the work of Neves et al. [20]. It is possible that the carbohydrate epitopes of gp43 become more exposed when the antigen is in solid phase (ELISA) instead of solution (ID), enabling a higher number of linkages and therefore greater efficiency when samples of chronic patients are tested, who generally produce a greater amount of IgG2 which binds to carbohydrate epitopes [20]. To diminish the chances of false negative results in the serodiagnosis of PCM, it is advisable to associate different techniques. When ELISA and ID results for the same CFA were combined, the number of false negative results drops to zero, 11 and 17% using CFA from B339 (S1), LDR3 (PS2) and LDR2 (*P. lutzii*), respectively.

The advantage of using CFA as the antigen in ID tests is the less labor needed to produce it when compared to the production ExoAg, but this has a concentration of proteins up to 20 times higher [23]. The lower concentration of protein in CFA may be an explanation for the greater number of false negative ID results observed in current work when compared to other studies [24].

The main immunogenic component produced by most *P. brasiliensis* strains is the gp43 antigen [7], but its expression varies with strain and even may stop being expressed [25]. The major difference from *P. brasiliensis* and *P. lutzii* (LDR2) is located on the sequence of the gp43 gene that is 89% identical to the reference strain Pb18 [18]. This may be influencing our results. Most patients who had a positive ID result using CFA from B339 (S1) had a lower titer in the ID with LDR2 (*P. lutzii*). Besides, there were 26% of false negative results by ELISA using CFA from *P. lutzii*. There is possibly a greater difficulty to recognize the gp43 produced by *P. lutzii* also influencing the tests using total antigen.

Although the hMM fraction of wide electrophoretic migration detected by Puccia et al. [6] had not been considered relevant in terms of diagnosis, Marquez et al. [12] used a fraction of ~366 kDa MM and detected differences in IgG and IgE responses between chronic and acute PCM patients. Differently to the antigens gp43 and gp70 that possibly induce Th2 response [26, 27, 19], the hMM fraction seems to induce a Th1 response with a protective effect [12, 28]. Investigation of IgG anti-hMM resulted in greater hMM recognition of antigens of *P. brasiliensis* (B339 and LDR3)

over *P. lutzii* (LDR2) in our serum samples. This result may be due to higher prevalence of *P. brasiliensis* S1 and PS2 in our region, according to the map of geographic distribution of the phylogenetic species of the *Paracoccidioides* genus [1].

There was a strong positive correlation between CFA and hMM fraction from the B339 (S1) or LDR3 (PS2) and a moderate correlation for LDR2 (*P. lutzii*) antigens. This suggests that hMM fraction influences the intensity of reaction when CFA is used as antigen, independently of the investigated strain causing PCM.

Current work represents the first investigation of antibody recognition using soluble antigens of *P. brasiliensis* (S1, PS2) and *P. lutzii*, in patients with PCM in the northern and west regions of Paraná state, Brazil and suggests a partially distinct recognition of the antigens evaluated. Future work associated with antigenemia could clarify the impacts of these different responses, and also contribute to a more effective diagnosis of PCM. This study shows greater effectiveness in diagnosis by ELISA with the use of antigens from *P. brasiliensis* B339 in this region of Brazil.

Acknowledgments

Current work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária/PR, Ministério da Educação e Cultura/Programa de Extensão Universitária (MEC/PROEXT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Pró-reitorias de Pós-graduação e Extensão from Londrina State University (PROPPG/PROEX/UEL). The authors thank Mari S. Kaminami and Nilson de Jesus Carlos for their technical assistance; Dra. Berenice Tomoko Tatibana for her advices about this manuscript.

REFERENCES

1. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009;52(2):273-83. doi:S1055-7903(09)00135-3 [pii] 10.1016/j.ympev.2009.04.005.
2. Wanke B, Londero AT. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis Infection. In: Franco M, Lacaz CdS, Restrepo Moreno A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 109-20.
3. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho Fde Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(3):297-310. doi:S0037-86822006000300017 [pii].
4. Del Negro GM, Benard G, de Assis CM, Vidal MS, Garcia NM, Otani C et al. Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. *J Med Vet Mycol.* 1995;33(2):113-6.
5. Singer-Vermes LM, Caldeira CB, Burger E, Calich LG. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol.* 1993;94(1):75-9.
6. Puccia R, Schenkman S, Gorin PA, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun.* 1986;53(1):199-206.
7. Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol.* 1988;26(10):2147-51.
8. Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J Med Vet Mycol.* 1991;29(1):31-8.
9. Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol.* 1991;29(8):1610-5.
10. Blotta MH, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(3):671-6.
11. Marques da Silva SH, Colombo AL, Blotta MH, Lopes JD, Queiroz-Telles F, Pires de Camargo Z. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3675-80.

12. Marquez AS, Vicentini AP, Ono MA, Watanabe MA, de Camargo ZP, Itano EN. Reactivity of antibodies from patients with acute and chronic paracoccidioidomycosis to a high molecular mass antigen from *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Lab Anal. 2005;19(5):199-204. doi:10.1002/jcla.20078.
13. Calcagno AM, Nino-Vega G, San-Blas F, San-Blas G. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol. 1998;36(6):1733-6.
14. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. Mol Biol Evol. 2006;23(1):65-73. doi:msj008 [pii] 10.1093/molbev/msj008.
15. Soares CM, Madlun EE, da Silva SP, Pereira M, Felipe MS. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol. 1995;33(2):505-7.
16. Hahn RC, Macedo AM, Santos NL, Resende JC, Hamdan JS. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* atypical isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. Rev Iberoam Micol. 2002;19(1):49-51. doi:2002190149 [pii].
17. Carrero LL, Nino-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJ, Soares CM, Pereira M et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. Fungal Genet Biol. 2008;45(5):605-12. doi:10.1016/j.fgb.2008.02.002 S1087-1845(08)00020-0 [pii].
18. Takayama A, Itano EN, Sano A, Ono MA, Kamei K. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. Med Mycol. 2010;48(1):64-72. doi:10.3109/13693780902718065 908828556 [pii].
19. Rigobello FF, Marquez AS, Lopes JD, Nakanishi-Ito FA, Itano EN. Patients with chronic-form paracoccidioidomycosis present high serum levels of IgE anti-*Paracoccidioides brasiliensis* gp70. Mycopathologia. 2013 (Epub ahead of print). doi:10.1007/s11046-013-9624-5.
20. Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, de Camargo ZP, Blotta MH. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. Clin Diagn Lab Immunol. 2003;10(5):802-7.
21. Batista J, Jr., de Camargo ZP, Fernandes GF, Vicentini AP, Fontes CJ, Hahn RC. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? Mycoses. 2010;53(2):176-80. doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01687.x MYC1687 [pii].
22. Del Negro GM, Garcia NM, Rodrigues EG, Cano MI, de Aguiar MS, Lirio Vde S et al. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1991;33(4):277-80.

23. Panunto-Castelo A, Freitas-da-Silva G, Bragheto IC, Martinez R, Roque-Barreira MC. *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 2003;5(13):1205-11. doi:S1286457903002247 [pii].
24. Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008;165(4-5):289-302.
25. Berzaghi R, da Silva SH, de Camargo ZP. Variable gp43 secretion by *Paracoccidioides brasiliensis* clones obtained by two different culture methods. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):491-3. doi:43/1/491 [pii] 10.1128/JCM.43.1.491-493.2005.
26. Mendes-Giannini MJ, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Masuda A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1989;27(12):2842-5.
27. Benard G, Mendes-Giannini MJ, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJ. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J Infect Dis.* 1997;175(5):1263-7.
28. Pavanelli WR, Kaminami MS, Geres JR, Sano A, Ono MA, Camargo IC et al. Protection induced in BALB/c mice by the high-molecular-mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia.* 2007;163(3):117-28. doi:10.1007/s11046-007-0095-4.

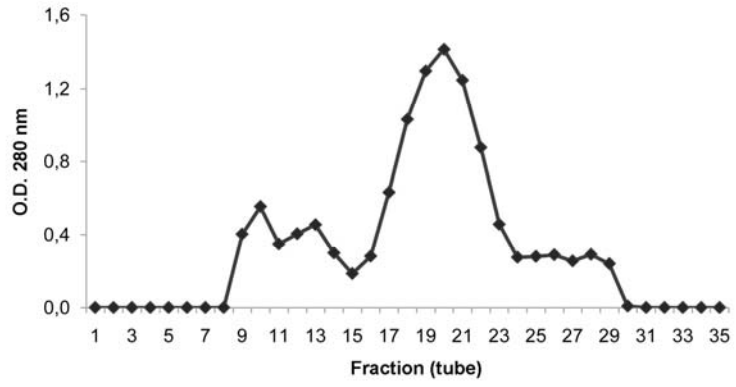
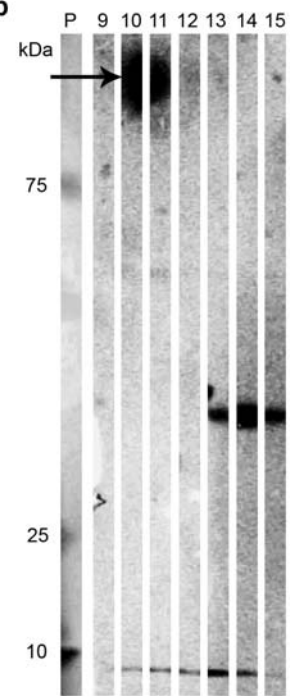
Figure captions

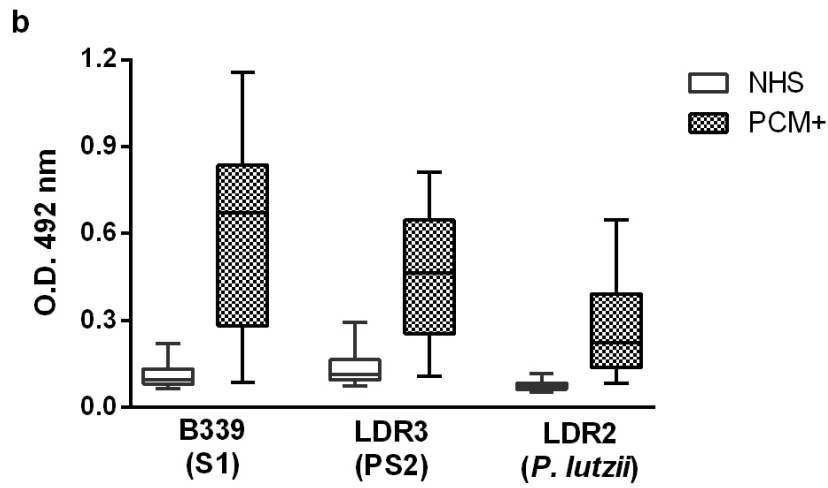
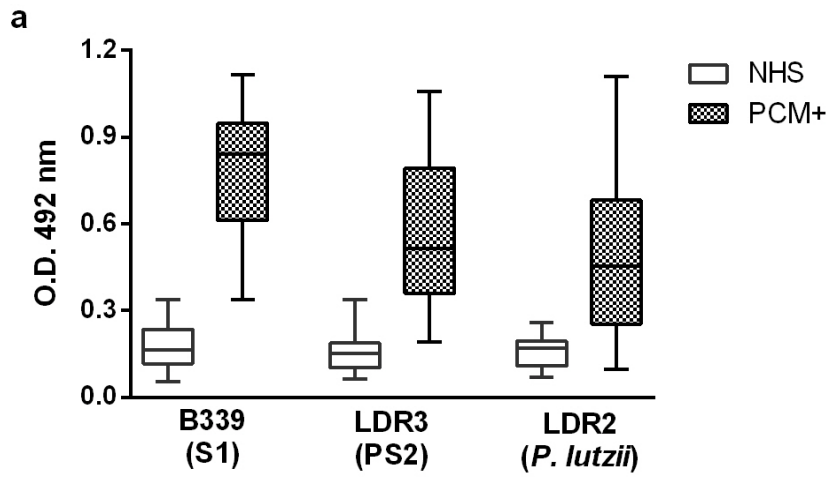
Fig. 1 Purification of hMM. **a** Spectrophotometric profile at 280 nm of the CFA fractions collected from a Sephacryl S200-HR column. **b** Immunoblot of fractions 9 to 15 performed with a pool of PCM patients' sera, demonstrating the presence of hMM in fractions 10 and 11 (arrow). O.D.: optical density; P: molecular mass pattern Bio-Rad Precision Plus Protein™ Kaleidoscope

Fig. 2 Detection of serum IgG anti-CFA (**a**) and anti-hMM (**b**) from *P. brasiliensis* (B339, LDR3) and *P. lutzii* (LDR2). O.D.: optical density; SHN: normal human serum (n = 16); PCM: chronic patients (n = 35)

Table 1. Results of double radial immunodiffusion tests distributed according to the maximum titer of the serum and CFA strain used

Table 2. Results of double radial immunodiffusion tests from patients with more than one precipitin band using CFA from *P. brasiliensis* (S1, PS2) and *P. lutzii*. (e): external band; (i): internal band, closer to the central well

a**b**



ID result	B339 (S1)	LDR3 (PS2)	LDR2 (<i>P. lutzii</i>)
Negative	13	12	14
Undiluted	4	3	4
1:2	6	6	9
1:4	5	6	4
1:8	5	6	1
1:16	1	1	1
1:32	1	1	2

Serum	B339 (S1)	LDR3 (PS2)	LDR2 (<i>P. lutzi</i>)
1	1:8	1:2 (e); 1:16 (i)	1:16
2	1:8	1:8 (e), 1:16 (i)	1:4
3	1:4	1:8 (e, i)	1:2
4	1:4	1:2 (e), 1:4 (i)	1:2
5	1:16	1:4 (e), 1:32 (i)	1:4
6	1:8 (e, i)	1:4 (e), 1:8 (i)	1:2 (e), 1:4 e 1:32 (i)
7	1:2 (e, i)	1:4	1:2 (e, i)

5 APÊNDICE A: OUTROS RESULTADOS OBTIDOS

5.1 IDENTIDADE ANTIGÊNICA

5.1.1 Isolamento de *Paracoccidioides* sp. de Material Biológico

Foram obtidos e parcialmente caracterizados *Paracoccidioides* sp. denominados de LDR_S e LDR_C. O isolado LDR_S é proveniente de biópsia de lesão no assoalho da língua da paciente S.B.F: sexo feminino, 57 anos, de Sertãozinho – PR, em tratamento na COU / CCS / UEL. O isolado LDR_C é proveniente do paciente C.R.V.: sexo masculino, 42 anos, de Faxinal – PR, fumante há aproximadamente 20 anos, etilista; foi atendido no Pronto Socorro Odontológico / CCS / UEL, onde foi realizada biópsia da lesão de mucosa oral.

Após isolamento e caracterização parcial pelos aspectos morfológicos e microscópicos dos isolados clínicos, foram feitos repiques para obtenção de CFA, que foram utilizados nos testes de identidade de antígenos.

5.1.2 Imunodifusão - Análise de Identidade Antigênica

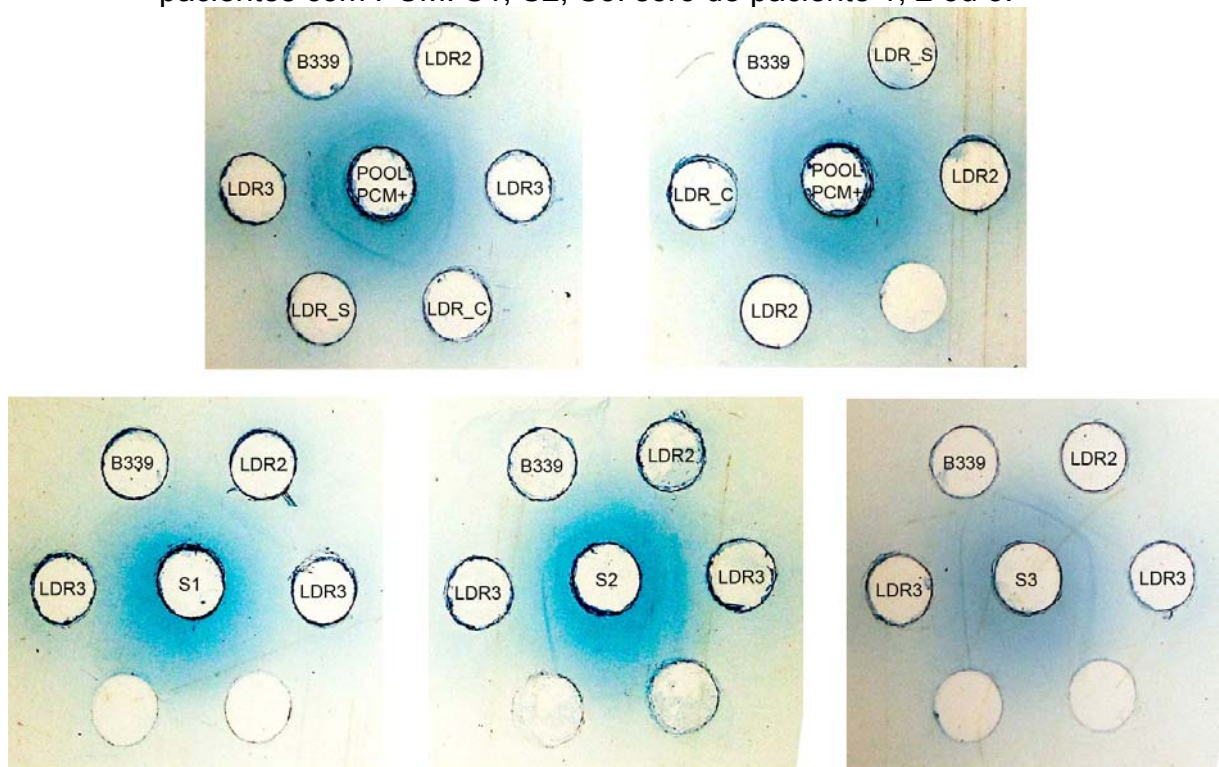
Após o preparo das lâminas de vidro com ágar nobre e sua perfuração com o molde, foi realizada análise de identidade antigênica utilizando os CFAs obtidos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* de cepas de referência e isolados clínicos. Para tanto, os CFAs foram aplicados nos orifícios periféricos e no orifício central aplicaram-se três soros individuais ou pool de soros de pacientes com PCM (6 soros selecionados em análise prévia por apresentarem títulos uniformes aos 3 CFAs das cepas de referência). Adicionalmente, foi realizado teste de identidade antigênica entre soros individuais de quatro pacientes com PCM que apresentavam mais de uma linha de precipitação. Para tanto foi aplicada amostra de CFA no orifício central e nos orifícios periféricos aplicaram-se soros com as respectivas diluições previamente determinadas. As linhas formadas podem ser de identidade total (linha contínua), de identidade parcial (formação de esporão na linha) ou de não identidade (linhas que se cruzam, indicando ausência de relação entre os antígenos).

Todos os testes foram realizados em duplicata, aplicando-se 25 µL de amostra/orifício. As lâminas foram mantidas em câmara úmida em temperatura

ambiente por 24 horas para difusão das amostras, sendo posteriormente lavadas com solução salina 0,85%, secas utilizando-se papel filtro, coradas por 20 minutos com solução de negro de amido e descoradas com solução de ácido acético 5%.

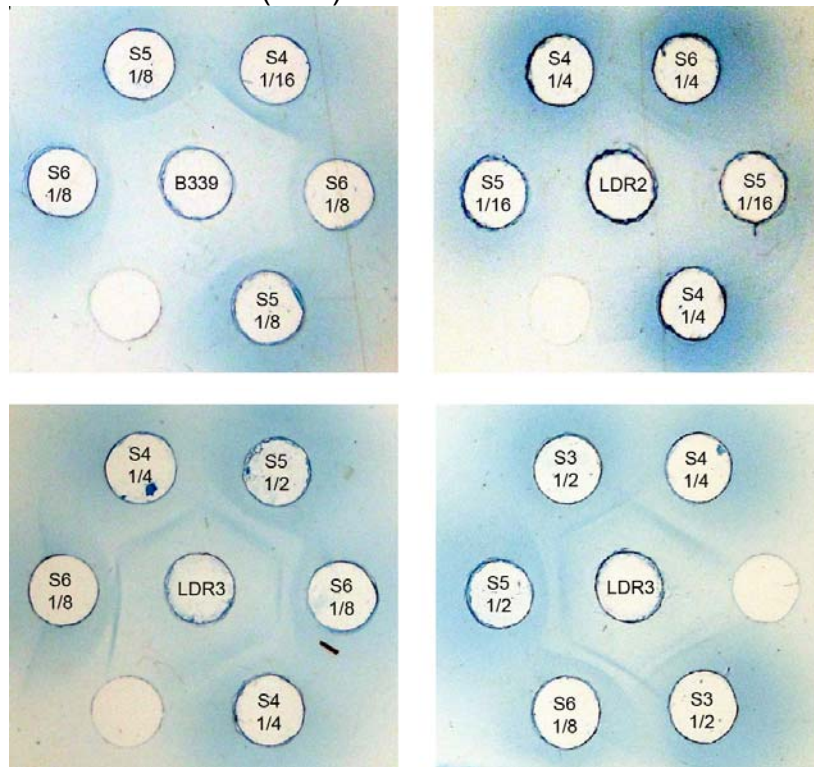
Utilizando-se o pool de soros com PCM (6 soros de pacientes que obtiveram títulos semelhantes nas ID com os diferentes CFAs) ou soros individuais de 3 pacientes, houve formação de linhas de identidade entre todos os CFAs, independente da cepa analisada (Figura 2).

Figura 2 - Resultado de testes de identidade de antígenos entre CFA proveniente de *P. brasiliensis* B339 (S1), LDR3 (PS2), *P. lutzii* (LDR2) e CFA de 2 isolados clínicos de *Paracoccidioides* sp., utilizando-se pool de soros de pacientes com PCM. S1, S2, S3: soro de paciente 1, 2 ou 3.



Para complementar os testes de identidade antigênica, nos orifícios externos foram colocados soros individuais em diluições previamente determinadas pela titulação dos soros, utilizando-se CFA de B339, LDR3 ou LDR2 no orifício central. Houve identidade de antígenos entre todas as amostras de soros analisados, exceto identidade parcial para 2 soros utilizando-se LDR3 (Figura 3).

Figura 3 - Resultado de teste de identidade entre amostras de soros que apresentaram mais de uma linha de precipitação com CFA proveniente de *P. brasiliensis* LDR3 (PS2).



5.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IGG ANTI-GP43 E ANTI-GP70 DE *PARACOCIDIoidES* SP.

5.2.1 Obtenção de Antígeno Somático

De acordo com estudo de Marquez e cols. (MARQUEZ et al., 2005), o AS apresenta maior concentração de gp70 do que o preparado de CFA. Sendo assim, esta glicoproteína foi obtida através do preparo de AS das cepas de referência de acordo com este trabalho. As massas dos fungos de *Paracoccidioides* sp. (B339, LDR3 ou LDR2) cultivados em ágar Sabouraud por 7 dias à 35°C foram coletadas em um graal de porcelana em banho de gelo com aproximadamente 10 mL de PBS 0,15 M pH 7,2. Foi adicionado nitrogênio líquido e feita maceração manual, sendo este procedimento repetido mais duas vezes. O homogenato foi transferido para tubo de fundo cônico, sendo adicionado PMSF 2,5 mM e agitado em vórtex por 5 min, centrifugado por 15 min, 4500 rpm (2604 x g) à 4°C e seu sobrenadante coletado em microtubos para outra centrifugação por 15 min, 12000 rpm (15294 x g) à 4°C (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Germany). Uma

amostra do sobrenadante foi coletada para dosagem de concentração proteica pelo método de Folin (LOWRY et al., 1951) e o restante foi aliqotado e armazenado em freezer -80°C até sua utilização.

5.2.2 Obtenção de Fração de gp43 e gp70.

Para obtenção de gp43, foi feito o fracionamento de CFA por cromatografia de exclusão, conforme descrito no item “*Antigen preparation and hMM purification*” do artigo. A fração de gp43 foi designada como as frações eluídas da coluna de Sephacryl S200HR com maior intensidade de reação no WB com massa molecular (MM) aproximada de 43 kDa, conforme pode ser observado nas frações 13, 14 e 15 na Fig. 1 do artigo.

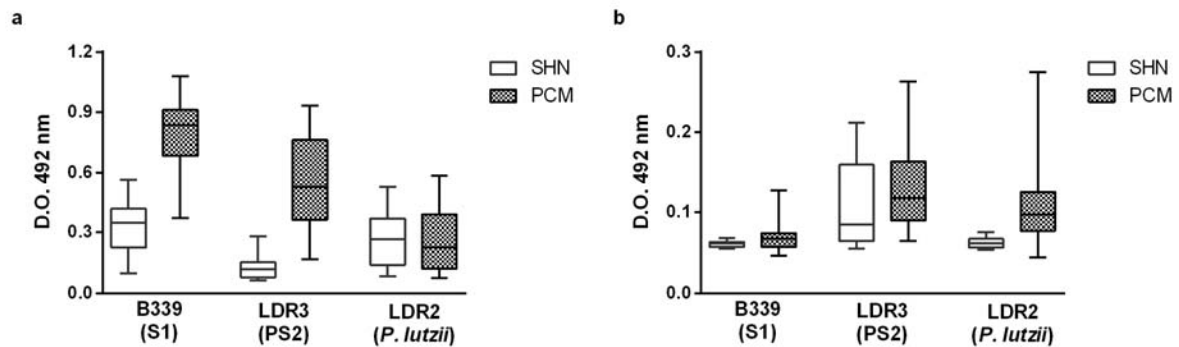
Para obtenção de gp70, utilizaram-se os mesmo métodos descritos no artigo para obtenção de hMM. Devido a presença concomitante de hMM e gp70 nas frações 10 e 11, estas foram submetidas ao método de eletroforese em tubo para purificação de gp70 (RIGOBELLO et al., 2013)

5.2.3 Análise de IgG Sérica anti-gp43 e anti-gp70 *Paracoccidioides* sp. das Cepas de Referência por ELISA Indireto

A mesma metodologia descrita no item “*ELISA for IgG anti-CFA and anti-hMM*” do artigo foi utilizada para a detecção de anticorpos IgG anti-gp43 e anti-gp70 por ELISA indireto.

A Figura 4 demonstra os resultados em D.O. a 492 nm de ELISA indireto para detecção de IgG anti-gp43 e anti-gp70 de *P. brasiliensis* (B339-S1, LDR3-PS2) e *P. lutzii* (LDR2).

Figura 4 - Detecção de IgG sérica anti-gp43 (a) e anti-gp70 (b) de *P. brasiliensis* (B339-S1, LDR3-PS2) e *P. lutzii* (LDR2). D.O.: densidade ótica; SHN: soro humano normal (n= 16); PCM: pacientes crônicos (n= 35).



Analisando-se as diferenças entre os grupos SHN e PCM, apenas não houve diferença significativa (p -valor $> 0,05$) para gp43 de LDR2 e gp70 de LDR3.

A análise de variância resultou em diferença significativa (p -valor $< 0,05$) na resposta à gp43 entre as 3 cepas e à gp70 entre B339-LDR2 (S1-*P. lutzii*) e B339-LDR3 (S1-PS2).

Considerando-se o número de pacientes que tiveram leitura abaixo do cutoff estabelecido para cada fungo, o número de falso negativos para B339 (S1), LDR3 (PS2) e LDR2 (*P. lutzii*), respectivamente seria de: 14%, 9% e 97% para gp43 e 51%, 89% e 23% para gp70.

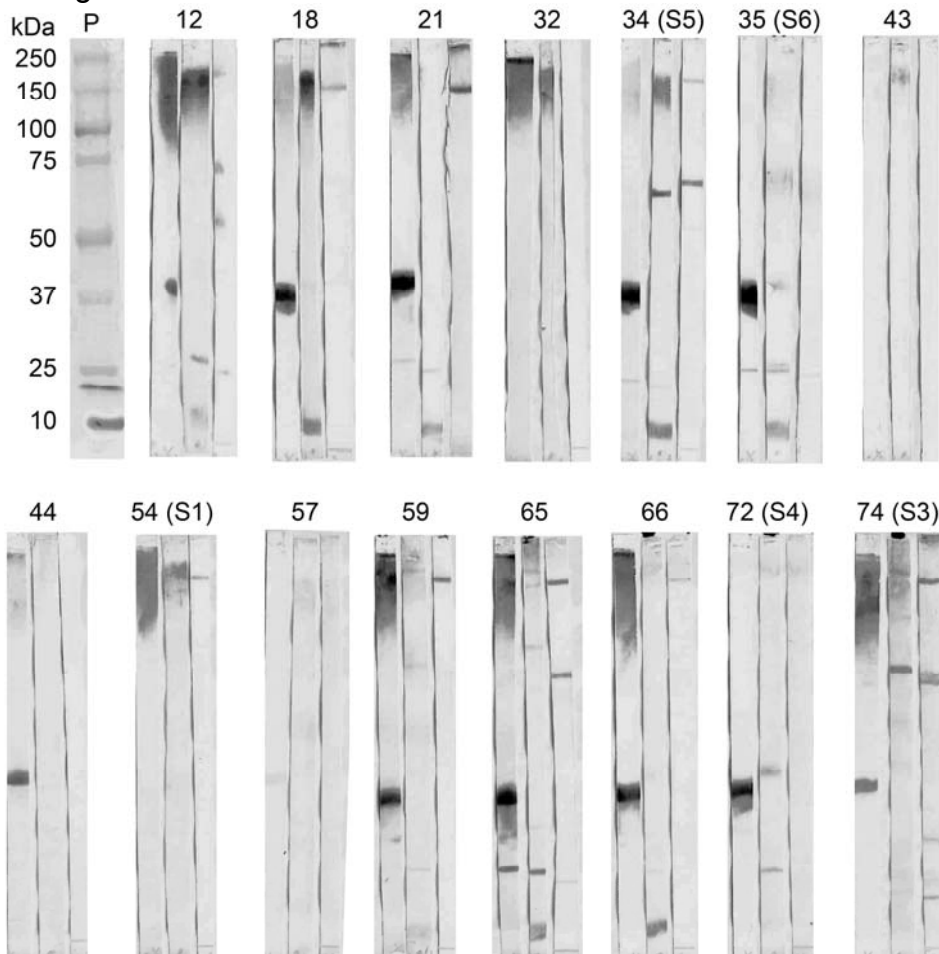
5.2.4 Correlação entre os Níveis de IgG Contra os Diferentes Antígenos

Para as frações gp43, encontrou-se forte correlação positiva entre LDR3-LDR2 e moderadas correlações para B339-LDR3. Para gp70, houve forte correlação entre B339-LDR2 e moderada entre B339-LDR3 ou LDR3-LDR2. Observou-se correlação positiva entre CFA-gp43 provenientes das três cepas de referência em estudo.

5.2.5 Western Blot para Detecção de IgG Anti-CFAs de *P. Brasiliensis* (S1, PS2) e *P. Lutzii*

Foi realizado WB conforme protocolo descrito no item “*Antigen preparation and hMM purification*” do artigo, utilizando-se CFA à 2 mg/mL de B339, LDR3 e LDR2. A partir dos resultados de titulação dos soros (imunodifusão), foram escolhidos 15 amostras: por apresentarem mais de uma linha de precipitação, títulos muito diferentes entre os CFAs utilizados na ID ou não reagentes para ELISA anti-gp43 proveniente de B339. Os soros foram diluídos 1:50. Analisando-se a Figura 5, observa-se que poucos pacientes reagem com a gp70, alguns não reagem com gp43 de B339 (S1) e nenhum paciente é reagente para gp43 de LDR2.

Figura 5 - Western blot utilizando CFA de B339 (S1), LDR3 (PS2) e LDR2 (*P. lutzii*), respectivamente, utilizando-se 15 amostras de soro diluídas 1:50. Números acima das fitas são os registros dos pacientes e números entre parênteses indicam código do paciente no testes de identidade antigênica.



4 DISCUSSÃO

A PCM é uma doença que se não tratada leva muitas vezes a morte, principalmente nos casos agudos. No período de 1980 à 1998, esta micose foi a 8ª causa de morte mais comum entre doenças parasitárias e infecciosas crônicas ou recorrentes, tendo a maior taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas (COUTINHO et al., 2002), inclusive no Paraná (BITTENCOURT; DE OLIVEIRA; COUTINHO, 2005). Por isso, é necessária a padronização de técnicas de diagnóstico mais eficientes do que o exame direto e o isolamento, para uma detecção mais precoce da doença.

A técnica de ID foi utilizada para a análise de identidade entre os antígenos totais provenientes de CFA de B339, LDR3 e LDR2, utilizando-se pool de soros de pacientes com títulos semelhantes para as 3 cepas estudadas. Essa análise resultou em linha de identidade total, demonstrando que os anticorpos presentes nos soros reconhecem os mesmos epítomos dos antígenos de cepas distintas. Adicionalmente foi investigada a identidade de antígenos utilizando algumas amostras individuais de soros de pacientes com PCM, resultando em linha de identidade parcial entre dois soros com CFA de *P. brasiliensis* LDR3. Sugere-se que existem soros de pacientes com PCM que apresentam anticorpos específicos adicionais a epítomos de uma cepa específica, o que requer estudos adicionais.

A gp70 é utilizada como marcador da PCM, pois é reconhecida por 60-100% dos soros de pacientes com PCM (CAMARGO et al., 1989; DA SILVA et al., 2004; PANUNTO-CASTELO et al., 2003). De forma distinta da gp43, o nível de IgG a gp70 foi significativamente inferior com *P. brasiliensis* B339 em relação às demais fontes (LDR2 e LDR3). Torna-se importante maior investigação da resposta imune a essa glicoproteína, considerando-se que o título de anticorpos anti-gp70 cai durante o tratamento antifúngico (CAMARGO et al., 1989; DA SILVA et al., 2004; PANUNTO-CASTELO et al., 2003) e devido a sua ação como fator de virulência, uma vez que a gp70 modula a atividade de macrófagos *in vitro*, sendo proposto que anticorpos anti-gp70 podem ajudar no combate a infecção, bloqueando os efeitos inibitórios desta glicoproteína (MATTOS GROSSO et al., 2003). As nossas amostras investigadas são provenientes principalmente de pacientes com PCM em tratamento, o que poderia justificar o nível menor de IgG anti-gp70 de *P. brasiliensis* B339. No entanto, o reconhecimento de soros de pacientes com PCM a gp70 de

LDR3 (PS2) ou LDR2 (*P. lutzii*) em diferentes intensidades em relação ao B339, sugere que os anticorpos podem reconhecer epítomos distintos presentes nas diferentes cepas, o que requer estudos adicionais.

A avaliação por ELISA do nível sérico de IgG anti-gp43 resultou em reconhecimento significativamente maior de gp43 de *P. brasiliensis* B339, seguida de LDR3 e por último em menor nível a LDR2 (*P. lutzii*), sugerindo reconhecimento distinto de gp43 destas cepas. A gp43 é o principal componente produzido pelo *P. brasiliensis*, sendo utilizado com frequência para diagnóstico, além de também ser muito investigado por sua importância como fator de virulência (MENDES-GIANNINI et al., 1990; TABORDA; CAMARGO, 1994; VICENTINI et al., 1994). Sua expressão varia de acordo com a cepa e mesmo cepas conhecidamente produtoras de gp43 podem deixar de produzi-la, assim como também o inverso pode ocorrer (BERZAGHI et al., 2005). A nova espécie *P. lutzii* difere justamente neste antígeno, com 89% de identidade na sequência do gene responsável pela gp43 quando comparado a cepa de referência Pb18 (TAKAYAMA et al., 2010), o que poderia ser a causa de nossos resultados. Para a maioria dos pacientes, quando o resultado era positivo na ID utilizando CFA de B339 o título para ID com LDR2 era menor, além de que houve 26% de falsos negativos no teste de ELISA utilizando CFA de LDR2, demonstrando que há possivelmente uma maior dificuldade no reconhecimento da gp43 produzida pelo *P. lutzii* influenciando também os resultados com antígeno total, uma vez que este é o principal componente deste antígeno bruto (CAMARGO et al., 1991).

A análise de correlação entre CFA e as frações gp43 demonstra forte correlação positiva para as 3 cepas de referência (B339, LDR3 e LDR2). Sugere-se que o principal componente de CFA interferente na intensidade da reação é a gp43, independentemente da cepa causadora da PCM investigada.

A análise de antígenos purificados demonstrou que a gp43 proveniente de LDR3 é mais eficaz por ter maior porcentagem de positividade em nossas amostras de soros. De maneira inversa, a gp70 proveniente de LDR3 demonstrou menor porcentagem de positividade. Esses resultados possivelmente se devem a alguma reação falso positiva pelos soros normais, tornando o valor de cutoff mais elevado. A fração de gp70 utilizada nos testes é proveniente de antígeno sonificado e não de CFA, portanto há maior chance de conter outros componentes com massas moleculares (MM) semelhantes. Possivelmente nessa faixa de MM

também podemos encontrar a proteína de choque térmico (HSP) que apresenta certa homologia estrutural com *Histoplasma capsulatum*, sendo reconhecida também por alguns soros normais (CUNHA et al., 2002; DA SILVA et al., 1999)

Alguns pacientes tiveram ID negativo e ELISA anti-gp43 ou anti-CFA reagente, mas com leituras em D.O. geralmente menores do que os pacientes positivos nos dois tipos de testes, conforme observado por Neves et al. (2003). É possível que os epítomos de carboidrato da gp43 fiquem mais expostos quando o antígeno está em fase sólida (ELISA) ao invés de solução (ID), possibilitando maior número de ligações e, portanto, maior eficiência no grupo de pacientes crônicos geralmente produtores de uma quantidade maior de IgG2 que se liga a epítomos de carboidrato (NEVES et al., 2003).

É importante que haja altas doses de gp43 no material utilizado para os testes de ID (PUCCIA et al., 1986), ao menos no diagnóstico onde a espécie mais prevalente seja o *P. brasiliensis*, já que este é o seu principal antígeno. Já nas cepas de *P. lutzii*, a gp43 não é o principal antígeno produzido, inclusive podendo estar ausente nas cepas isoladas no Centro-Oeste brasileiro (BATISTA et al., 2010). Assim, a gp43 pode não ter o mesmo valor diagnóstico em todos os locais, além de provavelmente ter diferenças estruturais que causam produção de outros anticorpos específicos, diferentes dos gerados contra *P. brasiliensis*. É possível que gp43 produzida a partir de *P. lutzii* não seja útil nos exames de muitos pacientes se usado de forma pura em nossa região, por haver maior dificuldade no reconhecimento deste antígeno.

O fato de nenhum paciente ter reagido no WB com a gp43 de LDR2 necessita de maior investigação. Serão necessários mais estudos para confirmação da presença da gp43 nas frações de CFA de LDR2 utilizadas nos testes de ELISA ou a detecção de RNA codificador de gp43 da cepa LDR2 através de testes moleculares. Se este for o caso, ficará comprovado que a IgG sérica dos pacientes com PCM não reage com a gp43 produzida pelo *P. lutzii*, possivelmente por alguma diferença em seus epítomos.

REFERÊNCIAS

- ARISTIZABAL, B. H. et al. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infect Immun**, v. 66, n. 11, p. 5587-91, Nov. 1998.
- BAGAGLI, E. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 4, p. 505-12, Apr. 1998.
- BAGAGLI, E. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, Apr./May 2008.
- BATISTA, J., JR. et al. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? **Mycoses**, v. 53, n. 2, p. 176-80, Mar. 2010.
- BENARD, G. et al. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J Infect Dis**, v. 175, n. 5, p. 1263-7, May. 1997.
- BERZAGHI, R.; DA SILVA, S. H.; DE CAMARGO, Z. P. Variable gp43 secretion by *Paracoccidioides brasiliensis* clones obtained by two different culture methods. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 1, p. 491-3, Jan. 2005.
- BIALEK, R. et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 8, p. 2940-2, Aug. 2000.
- BITTENCOURT, J. I.; DE OLIVEIRA, R. M.; COUTINHO, Z. F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Parana, Brazil, 1980/1998. **Cad Saude Publica**, v. 21, n. 6, p. 1856-64, Nov./Dec. 2005.
- BLOTTA, M. H.; CAMARGO, Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 3, p. 671-6, Mar. 1993.
- BORGES-WALMSLEY, M. I. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 80-7, Feb. 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, DF, 2009. Caderno 7 - Paracoccidioidomycose, p.29-37.
- CALICH, V. L.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 5, p. 615-23, May 1998.
- CAMARGO, Z. P. et al. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J Clin Microbiol**, v. 26, n. 10, p. 2147-51, Oct. 1988.

CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C.; TRAVASSOS, L. R. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. **J Med Vet Mycol**, v. 27, n. 6, p. 407-12, 1989.

CAMARGO, Z. P. et al. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **J Med Vet Mycol**, v. 29, n. 1, p. 31-8, 1991.

CAMARGO, Z. P.; CANO, L. E. Humoral Immunity. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. D. S., et al (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. cap. 12, p.187-201.

CAMARGO, Z. P. et al. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 10, p. 2377-81, Oct.1994.

CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 289-302, Apr./May 2008.

CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 5, p. 605-12, May. 2008.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441-54, Sept./Oct. 2002.

CUNHA, D. A. et al. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 2, p. 374-7, Mar. 2002.

DA SILVA, S. H. et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 10, p. 4480-6, Oct. 2004.

DA SILVA, S. H. et al. Diagnosis of neuroparacoccidioidomycosis by detection of circulating antigen and antibody in cerebrospinal fluid. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 9, p. 4680-3, set. 2005.

DA SILVA, S. P. et al. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol Microbiol**, v. 31, n. 4, p. 1039-50, Feb. 1999.

DEL NEGRO, G. M. et al. Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. **J Med Vet Mycol**, v. 33, n. 2, p. 113-6, Mar./Apr. 1995.

DEL NEGRO, G. M. et al. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. **J Med Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 37-46, Jan. 2000

ENDO, S. et al. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. **FEMS Microbiol Lett**, v. 234, n. 1, p. 93-7, May. 2004.

FAVA, S. D. C.; NETTO, C. F. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 40, n. 3, p. 155-64, May/June 1998.

FREDRICH, A. L. et al. High molecular mass fraction in clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 5, p. 526-30, Sept./Oct. 2010.

FREITAS-DA-SILVA, G.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 2, p. 381-5, Feb. 1992.

GOMES, G. M. et al. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 9, p. 3478-80, Sept. 2000.

GOMEZ, B. L. et al. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 12, p. 3278-83, Dec. 1997.

JIMENEZ-FINKEL, B. E.; MURPHY, J. W. Induction of antigen-specific T suppressor cells by soluble *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. **Infect Immun**, v. 56, n. 4, p. 734-43, Apr. 1988.

JUVENALE, M. et al. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. **J Med Microbiol**, v. 50, n. 2, p. 127-34, Feb. 2001.

KINDT, T. J.; OSBORNE, B.A.; GOLDSBY, R.A. **Kuby Immunology**. 6 ed. New York: W. H. Freeman, 2007.

KLEIN, B. S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 314-9, Aug. 2007.

KOISHI, A. C. et al. A semi-nested PCR assay for molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 6, p. 728-30, Nov./Dec. 2010.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 40, n. 3, p. 125-35, May/June 1998.

LACAZ, C. S. Historical Evolution of the Knowledge on Paracoccidioidomycosis and its Etiologic Agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. D. S., et al (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994a. cap. 1, p.1-12.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: Morphology; Evolutionary Cycle, Maintenance during Saprophytic Life; Biology, Virulence, Taxonomy. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. D. S., et al (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994b. cap. 2, p.13-22..

LACAZ, C. S. et al. Paracoccidioidomycose. In: _____ et al. (Ed.). **Tratado de micologia médica Lacaz**. São Paulo: Sarvier, 2002. cap. 27, p.639-729.

LOOSE, D. S. et al. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 24, p. 7659-63, Dec. 1983.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov. 1951.

MARQUES DA SILVA, S. H. et al. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 8, p. 3675-80, Aug. 2003.

MARQUES DA SILVA, S. H. et al. Monitoring gp43 antigenemia in Paracoccidioidomycosis patients during therapy. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 2419-24, June. 2004.

MARQUES DA SILVA, S. H. et al. Diagnosis of Paracoccidioidomycosis by detection of antigen and antibody in bronchoalveolar lavage fluids. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 12, p. 1363-6, Dec. 2006.

MARQUES MELLO, L.; SILVA-VERGARA, M. L.; RODRIGUES, V., JR. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high Interleukin-4 and Interleukin-5 production. **Hum Immunol**, v. 63, n. 2, p. 149-54, Feb. 2002.

MARQUEZ, A. S. et al. Reactivity of antibodies from patients with acute and chronic paracoccidioidomycosis to a high molecular mass antigen from *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Lab Anal**, v. 19, n. 5, p. 199-204, 2005.

MARTINS, R. et al. Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with itraconazole using Dot-blot, ELISA and western-blot. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 39, n. 5, p. 261-9, Sept./Oct. 1997.

MATTOS GROSSO, D. et al. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 71, n. 11, p. 6534-42, Nov. 2003.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73, Jan. 2006.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 12, p. 2842-5, Dec. 1989.

MENDES-GIANNINI, M. J.; MORAES, R. A.; RICCI, T. A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 32, n. 5, p. 384-5, Sept./Oct. 1990.

MENDES-GIANNINI, M. J.; DEL NEGRO, G. B.; SIQUEIRA, A. M. Serodiagnosis. In: FRANCO, M.;LACAZ, C. D. S., *et al* (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. cap. 27, p.345-363.

MENDES, R. P. The Gamut of Clinical Manifestations. In: FRANCO, M.;LACAZ, C. D. S., *et al* (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. cap. 16, p.233-258.

MIURA, C. S. *et al*. Levels of specific antigen (gp43), specific antibodies, and antigen-antibody complexes in saliva and serum of paracoccidioidomycosis patients. **Med Mycol**, v. 39, n. 5, p. 423-8, Oct. 2001.

NEGRONI, R. Pathogenesis. In: FRANCO, M.;LACAZ, C. D. S., *et al* (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. cap. 13, p.203-212.

NEVES, A. R. *et al*. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 10, n. 5, p. 802-7, Sept. 2003.

PANUNTO-CASTELO, A. *et al*. *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect**, v. 5, n. 13, p. 1205-11, Nov. 2003.

PAVANELLI, W. R. *et al*. Protection induced in BALB/c mice by the high-molecular-mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 163, n. 3, p. 117-28, Mar. 2007.

PINZAN, C. F. *et al*. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10757, 2010.

PONS, L. *et al*. The immunoperoxidase technic in the detection of specific antibodies in human infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medicina (B Aires)**, v. 36, n. 5, p. 510-2, 1976.

PUCCIA, R. *et al*. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect Immun**, v. 53, n. 1, p. 199-206, July 1986.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 8, p. 1610-5, Aug. 1991.

RESTREPO, A.; MONCADA, L. H. Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. **Appl Microbiol**, v. 28, n. 1, p. 138-44, Jul. 1974.

RESTREPO, A. *et al*. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 46, n. 2, p. 346-53, Nov. 1984.

- RESTREPO, A.; TRUJILLO, M.; GOMEZ, I. Inapparent lung involvement in patients with the subacute juvenile type of paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 31, n. 1, p. 18-22, Jan./Feb. 1989.
- RIGOBELLO, F. F. et al. Patients with chronic-form paracoccidioidomycosis present high serum levels of IgE anti-*Paracoccidioides brasiliensis* gp70. **Mycopathologia**, 2013 (epub ahead of print).
- SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect Immun**, v. 56, n. 3, p. 711-3, Mar. 1988.
- SALINA, M. A. et al. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 6, p. 1723-8, June 1998.
- SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol**, v. 31, n. 2, p. 99-113, 1993.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, May/June 2006.
- SINGER-VERMES, L. M. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clin Exp Immunol**, v. 94, n. 1, p. 75-9, Oct. 1993.
- SOARES, A. M. et al. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology**, v. 102, n. 4, p. 480-5, Abr. 2001.
- SOUTO, J. T. et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am J Pathol**, v. 156, n. 5, p. 1811-20, May 2000.
- TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 2, p. 554-6, Feb. 1994.
- TAKAYAMA, A. et al. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. **Med Mycol**, v. 48, n. 1, p. 64-72, Feb. 2010.
- TATIBANA, B. T. et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 gene in sputa by loop-mediated isothermal amplification method. **J Clin Lab Anal**, v. 23, n. 2, p. 139-43, 2009.
- TEIXEIRA, M. D. et al. Molecular and morphological data supports the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*. **Eukaryot Cell**, Nov. 2012.
- TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol**, v. 52, n. 2, p. 273-83, Aug. 2009.

THEODORO, R.C. et al. Dimorphism, thermal tolerance, virulence and heat shock protein 70 transcription in different isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 165, n. 6, p. 355-365, June 2008.

UNTEREINER, W. A. et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812-21, July/Aug. 2004.

VICENTINI, A. P. et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect Immun**, v. 62, n. 4, p. 1465-9, Apr. 1994.

WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis Infection. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. D. S., et al (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. cap. 7, p.109-120.

CONCLUSÃO

O teste de identidade de antígenos por ID demonstrou que soros reconhecem epítomos semelhantes de *P. brasiliensis* (S1, PS2) e *P. lutzii* (LDR2). Algumas amostras de soro de pacientes com PCM podem apresentar anticorpos específicos adicionais a epítomos de uma cepa específica, o que requer estudos adicionais.

Os anticorpos IgG de soros de pacientes com PCM da região norte e oeste do Paraná reconhecem com maior intensidade antígenos solúveis totais (CFA) de *P. brasiliensis* B339 (S1) do que de *P. brasiliensis* LDR3 (PS2) ou de LDR2 (*P. lutzii*) por teste de ELISA.

Os níveis elevados de IgG ao CFA possivelmente se devem à participação de gp43, independentemente da cepa causadora da PCM, considerando-se a forte correlação entre CFA e gp43 das cepas investigadas.

Diferentemente de gp43, as frações de gp70 e de hMM de LDR2 (*P. lutzii*) são reconhecidos amplamente pelos soros de pacientes com PCM da região norte e oeste do Paraná.

A menor porcentagem de positividade na ID do que no ELISA de soros de pacientes com PCM da região norte e oeste do Paraná com os antígenos totais de *P. lutzii* é concordante com os dados da literatura descrita para os antígenos de *P. brasiliensis*.

Nos testes diagnósticos da região norte e oeste do Paraná, o uso de LDR3 não apresentou vantagens quando comparado a cepa B339. O uso de LDR2 isoladamente pode não ser adequado devido as suas possíveis diferenças estruturais na gp43. A diferença na gp43 produzida por *P. lutzii* (LDR2) quando comparada a *P. brasiliensis* pode influenciar os testes onde esta glicoproteína está presente e tem grande importância (ID, ELISA anti-CFA, ELISA anti-gp43).

Para testes com maior valor diagnóstico, sugere-se a combinação de técnicas, como ID e ELISA, utilizando-se um pool de antígenos produzidos por cepas de diferentes espécies filogenéticas ou utilizando CFA de B339, por apresentar o menor número de falsos negativos.

ANEXOS

ANEXO A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa:

Resposta imune humoral a antígenos de Paracoccidioides brasiliensis (S1, PS2 e P. brasiliensis atípico/P. lutzii) e isolamento e caracterização de P. brasiliensis / P. lutzii de amostras clínicas na paracoccidioidomicose humana

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa “Resposta imune humoral a antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* (S1, PS2 e *P. brasiliensis* atípico/*P. lutzii*) e isolamento e caracterização de *P. brasiliensis*/*P. lutzii* de amostras clínicas na paracoccidioidomicose humana”, realizada pelo Departamento de Ciências Patológicas/Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é tentar melhorar as técnicas/exames usados para diagnosticar a paracoccidioidomicose, um tipo de micose que pode causar lesões principalmente em seu pulmão, pele e boca, mas também em qualquer outro lugar do corpo.

A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: a coleta de urina, sangue e de saliva será realizada por pessoas especializadas, e todos os materiais usados estarão devidamente esterilizados. Caso a sua doença seja pulmonar, será solicitada também a amostra de escarro. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

A amostra de sangue, escarro, saliva ou urina será utilizada para obtenção de soro, ou de fungos o qual após a realização deste projeto, ficará a disposição para utilização de outras pesquisas sob coordenação e gerenciamento do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina, desde que esta instituição venha futuramente apresentar um Regulamento Institucional para sua utilização. Todos os projetos que utilizarem este material posterior a esse projeto, deverão ser submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa para reanálise e consentimento da pesquisa a ser realizada.

Os benefícios esperados são diagnósticos mais eficazes e rápidos da doença paracoccidioidomicose. Informamos que o senhor não pagará nem será remunerado por sua participação, que o senhor não terá prejuízo e que por outro lado obterá o benefício de ter um diagnóstico da paracoccidioidomicose mais sensível, portanto mais eficaz (melhor) ou ainda caso o senhor já seja portador da doença, terá uma metodologia adicional para o acompanhamento do tratamento.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contatar: **Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano**, Endereço: Universidade Estadual de Londrina – CCB - Depto de Ciências Patológicas; Laboratório de Imunologia Aplicada; Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, Campus Universitário; CEP 86051-980, Londrina – PR; Telefone: (43) 3371-4469, ou procurar o **Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina**, na Avenida Robert Kock, nº 60, Londrina-PR ou no telefone (43) 33712490.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

_____, ____ de _____ de 2011.

Pesquisador Responsável:

 RG:: _____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Titulo da pesquisa:

Resposta imune humoral a antígenos de Paracoccidioides brasiliensis (S1, PS2 e P. brasiliensis atípico/P. lutzii) e isolamento e caracterização de P. brasiliensis / P. lutzii de amostras clínicas na paracoccidioidomicose humana

_____, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: ____ / ____ / ____

Nome do convidado _____

Data de Nascimento ____ / ____ / ____

Fone (__) _____ Celular (__) _____

Endereço _____

Bairro _____ Cidade _____

CEP _____

Assinatura _____

Assinatura do pesquisador responsável _____

Local e data _____