



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA RUBIA GEREZ

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAMUNDONGOS À SUB-
FRAÇÃO OBTIDA POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA
(TRIPSINA) DO ANTÍGENO DE ALTA MASSA MOLECULAR
DE *Paracoccidioides brasiliensis***

JULIANA RUBIA GEREZ

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAMUNDONGOS À SUB-
FRAÇÃO OBTIDA POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA
(TRIPSINA) DO ANTÍGENO DE ALTA MASSA MOLECULAR
DE *Paracoccidioides brasiliensis***

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eiko Nakagawa Itano

Londrina
2007

JULIANA RUBIA GEREZ

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAMUNDONGOS À SUB-
FRAÇÃO OBTIDA POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA
(TRIPSINA) DO ANTÍGENO DE ALTA MASSA MOLECULAR
DE *Paracoccidioides brasiliensis***

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Prof^a Dr^a Eiko Nakagawa Itano

Prof. Dr. Emerson José Venâncio

Londrina, 06 de maio de 2007.

A Deus, pelo seu infinito amor.

Aos meus pais, pelo incentivo e compreensão durante todos os momentos.

A Ricardo, pelo auxílio e principalmente pelo amor dedicado.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Eiko Nakagawa Itano, pela compreensão, apoio, amizade, dedicação e principalmente pela orientação durante a realização deste trabalho.

À Mari S. Kaminami pelo auxílio técnico durante a fase experimental deste trabalho.

Ao Nilson de Jesus Carlos pela orientação técnica, incentivo e amizade em todas as horas difíceis.

Ao Prof. Dr. Emerson J. Venâncio e Prof. Dr. Mario A. Ono pela participação no exame de qualificação e pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade Filho, que permitiu a utilização de equipamento em seu laboratório.

Aos demais professores, pela grande disponibilidade de ajudar e principalmente por todos os ensinamentos.

Aos maravilhosos amigos de laboratório, Andréa Isacson, Fernanda A. Nakanishi, Nádia H. Kamiji, Berenice Tomoko Tatibana, Audrey de Souza Marquez, Solange de Paula Ramos, Luciene Nagashima, Thiago Massuda e Tiago Fujita, Paula Cezar Leonello, Kátia Key Oshiro, Mariana Cristina da Silva, Carlos, Welder e Rosália Hernandes Fernandes Vivan pelo incentivo e colaboração em todos os momentos.

Aos meus grandes e eternos Amigos, Francisco Lopes Júnior, Aparecida de Oliveira Lopes, André Luiz de Oliveira Lopes, Allinne Daniele Ribeiro e Thiago Augusto de Oliveira Lopes pelo enorme incentivo, compreensão e valiosa amizade.

Ao meu companheiro e amigo Ricardo Adriano de Oliveira Lopes pelo auxílio, incentivo e carinho dedicado em todos os momentos.

Aos meus grandes amigos Alexandre Sasaki, Newton Hashimoto pela paciência e enorme colaboração nos momentos de desafios.

Ao Alexandre Teco pelo apoio Técnico e amizade.

À minha família, pela confiança e apoio fundamental para a conclusão deste trabalho.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

“Comece fazendo o que é necessário; depois o que é possível; e de repente estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

GEREZ, Juliana Rubira. **Resposta Imune Humoral em camundongos à sub-fração obtida por digestão enzimática (Tripsina) do antígeno de alta massa molecular de *Paracoccidioides brasiliensis***. 2007. 34f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* que libera diversos componentes imunogênicos, dentre eles o de alta massa molecular (hMM). O objetivo desse trabalho foi obter a sub-fração do componente de alta massa molecular por digestão com tripsina, assim como avaliar a resposta imune humoral a este componente na paracoccidioidomicose experimental. Inicialmente a fração hMM (~380KDa) foi obtida por cromatografia em Coluna de Sephadex G – 200 e a seguir tratada com tripsina por 60', 120', 150' a 37°C e re-analisada por Cromatografia em Coluna de Sephadex G 100. A sub - fração F17 –II selecionada foi analisada por SDS – PAGE e utilizada na imunização de camundongos BALB/c. A seguir foi analisado o nível de IgG anti-gp43 , anti-hMM e gp43 solúvel nos grupos experimentais de camundongos normal, imunizado, imunizado/infectado e infectado utilizando ELISA indireto e ELISA de captura. Os resultados obtidos demonstraram nível significativo de IgG anti – sub-fração F17 –II 28 e 56 dias pós imunização. No entanto não houve diferença significativa no nível de IgG anti-sub-fração F17 –II entre o grupo imunizado/infectado e infectado. Foi observado nível elevado de IgG anti – gp43 ou anti – hMM nos animais infectados em relação ao controle mas não entre infectados e imunizados/infectados. Concluímos pelo trabalho que a fração hMM de *P. brasiliensis* apresenta suscetibilidade à ação da enzima tripsina, podendo gerar dois fragmentos de massa molecular distintas em função do tempo de incubação. A F17-II resultante da digestão com tripsina apresenta massa molecular similar a gp43 e não é capaz de potencializar a resposta imune humoral na PCM experimental em camundongos por processo de imunização.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. *Paracoccidioides brasiliensis*. Alta massa molecular. Resposta Imune Humoral. Tripsina.

GEREZ, Juliana Rubira. **Humoral immune response to trypsin digested sub-fraction from high molecular mass *Paracoccidioides brasiliensis* antigen.** 2007. 34f. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis (Pb), the etiologic agent of a systemic mycosis, produces high molecular mass (hMM) antigens. The objective of this investigation was to obtain the sub-fraction from hMM antigens by trypsin digestion, as well as evaluate the humoral immune response to this component in the murine experimental PCM. The hMM fraction (~380KDa) was obtained by Sephadex G-200 chromatography and digested with trypsin at 37°C during 60, 120, 150 min followed by chromatography on Sephadex G-100. Two fractions were obtained and the selected sub-fraction (F17-II) was analyzed by SDS-PAGE. Groups of BALB/c mice were immunized with F17-II and the levels of IgG anti-F17-II were analyzed in serum samples from 28 and 56 days post-immunization by ELISA. Additionally, groups of mice immunized/infected (i.v.) with 1×10^6 yeast cells (Pb18) and as controls only infected or inoculated with adjuvant or with PBS were used. After 56 days post-infection the levels of IgG anti-gp43, IgG anti-hMM and soluble gp43 were analyzed by indirect and capture ELISA. A significant high level of IgG to F17-II ($p < 0.001$) was observed in 28 and 56 days post-immunization. The analysis of serum IgG anti-gp43, IgG anti-hMM and soluble gp43 demonstrated a higher level in the group of infected animals in relation to the control but not among immunized/infected and infected groups. In conclusion, the hMM antigen is susceptible to trypsin and at least two digestion products, one with MM ~ 43 kDa (F17-II) can be obtained. Also this sub-fraction F17-II doesn't present the capacity to increase the humoral immune response in murine PCM.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. *Paracoccidioides brasiliensis*. High-molecular mass. Humoral immune response. Trypsin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Perfil espectrofotométrico a 280 nm de CFA Pb18 por cromatografia em Coluna Sephadex G-200.....	23
Figura 2 – Perfil espectrofotométrico a 280 nm da fração de hMM (F17) tratada por 60', 120' e 150' com a tripsina a 37°C e refracionada em Coluna Sephadex G 100-120.....	23
Figura 3 – Perfil espectrofotométrico a 280 nm da fração de hMM (F17) tratada por 120' com a tripsina a 37°C e refracionada em Coluna Sephadex G 100-120.....	24
Figura 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%. 1) Padrão de proteína de MM, 2) Amostra sub-fração F17-II.	25
Figura 5 – Nível de IgG anti – F17- II em soro de camundongos Normal (28 e 56 dias), Imunizado (28 e 56 dias), Imunizado/Infectado (56 Dias), AF/Infectado (56 Dias) e Infectado (56 Dias), determinados por ELISA..	26
Figura 6 – Nível de IgG anti- fração de hMM de <i>P. brasiliensis</i> por ELISA no grupo de camundongos Normal, Imunizado, Imunizado/Infectado, AF/Infectado e Infectado, determinados por ELISA.....	26
Figura 7 – Nível de IgG anti – gp43 em soro de camundongos Normal, Imunizado, Imunizado/Infectado, AF/Infectado e Infectado, determinados por ELISA..	27
Figura 8 – Detecção de gp43 solúvel em soro de camundongos Normal, Imunizado, Imunizado/Infectado, AF/Infectado e Infectado, determinados por ELISA..	27
Figura 9 – Lesões histopatológicas de fígado nos grupos (A) imunizado/infectado (10x) e (B) Infectado (20x).	28

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante completo de Freund
AIF	Adjuvante incompleto de Freund
Ag	Antígeno
ANOVA	Análise de Variância
Anti-IgG	Anticorpo contra Imunoglobulina G
AS	Antígeno somático
CFA	Antígeno <i>cell free</i>
CFU	Unidade Formadora de Colônia
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ExoAg	Exoantígeno
F17	Fração 17 (obtida por cromatografia por gel filtração)
F17- I	Sub-fração 17- I (Fração I obtida por tratamento enzimático F17 e seguida de cromatografia)
F17- II	Sub-fração 17- II (Fração II obtida por tratamento enzimático F17 e seguida de cromatografia)
gp	Glicoproteína
gp43	Glicoproteína de 43 kDa
°C	Graus Celsius
h	Hora
min	Minutos
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
hMM	Antígeno de alta massa molecular
IgG	Imunoglobulina G
INF-γ	Interferon gamma
IL-2	Interleucina – 2
kDA	Quilodaltons
mg	Miligrama
ml	Mililitro
M	Molar
MM	Massa Molecular
N	Normalidade

nm	Nanômetros
OPD	O-phenylenediamine Dihydrochloride
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb 18	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> cepa 18
PBS	Solução fosfato-salina tamponada
PCM	Paracoccidioidomicose
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluoride
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SP	São Paulo
TCA	Ácido tricloroacético
Th1	Células T helper 1
Th2	Células T helper 2
%	Porcentagem
µl	Microlitro
µg	Micrograma
USA	Estados Unidos da América
V	Voltagem
v/v	Volume por volume.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Animais.....	16
3.2 Microorganismos.....	16
3.3 Obtenção de Antígeno <i>cell free</i>	16
3.4 Cromatografia em coluna de Sephadex G-200.....	17
3.5 Digestão da fração de hMM com a enzima Tripsina.....	17
3.6 Cromatografia em Coluna Sephadex G 100-120.....	17
3.7 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).....	17
3.8 Infecção e imunização de camundongos BALB/c.....	18
3.9 ELISA para detecção de IgG-hMM, IgG anti- F17-II, IgG anti- gp 43 em soro de camundongos BALB/c	19
3.10 ELISA captura para detecção de gp43 solúvel em soro de camundongos BALB/c	19
3.11 Análise Histopatológica.....	20
3.12 Análise Estatística	20
4 RESULTADOS	21
4.1 Cromatografia de CFA Pb18 em Coluna de Sephadex G-200	21
4.2 Re-fracionamento da fração F17 tratada com tripsina na Coluna Sephadex G100-120 ...	21
4.3 Análise da sub - fração por SDS – PAGE	21
4.4 Nível de IgG anti-F17-II.....	22
4.5 Nível de IgG anti-hMM, IgG anti- gp 43 e de gp43 em soro de camundongos BALB/c .	22
4.6 Análise Histopatológica.....	22
5 DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença infecciosa, granulomatosa, causada por um fungo dimórfico, *Paracoccidioides brasiliensis*, que cresce no hospedeiro na forma de levedura a uma temperatura de 37°C, ou como micélio (filamentoso) a 25°C, sendo restrito a América Latina, com áreas endêmicas no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina (BRUMMER *et al.*, 1993).

A doença afeta predominantemente trabalhadores rural sendo mais freqüente em homens, isto possivelmente se deve ao efeito protetor do estrógeno, hormônio feminino (ARISTIZABAL *et al.*, 2002).

Propágulos fúngicos aéreos iniciam a infecção e passam por conversão a fase leveduriforme, estágio infeccioso do *P. brasiliensis*, nos pulmões, progredindo secundariamente aos linfonodos e seguido de disseminação linfática ou hematogênica para o fígado, baço, pele e mucosa (McEWEN *et al.*, 1987).

A forma leveduriforme induz uma resposta no hospedeiro caracterizada pela formação de um granuloma (BRUMMER *et al.*, 1993; NEGRONI, 1993).

Nos pulmões ou nódulos linfáticos os granulomas podem permanecer dormentes por anos ou progredir para desencadear uma doença, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro. Formas distintas da doença (PCM) são descritas, variando desde formas agudas até formas crônicas, sendo que em ambos os casos a disseminação para outros órgãos pode ocorrer (BRUMMER *et al.*, 1993; NEGRONI, 1993).

A forma aguda é a mais grave e rara, afeta pacientes mais jovens de ambos os sexos, envolvendo principalmente o sistema reticuloendotelial (CASTRO & DEL NEGRO, 1976; MENDES, 1994), e representa somente 3 a 5% dos casos (BRUMMER *et al.*, 1993), enquanto que a forma crônica, mais freqüente, apresenta maior prevalência em homens adultos, com acometimento predominantemente do pulmão e tecidos mucocutâneos (CASTRO & DEL NEGRO, 1976; MENDES, 1994).

É relatada a existência de hospedeiros menos graves ao *P. brasiliensis* pela habilidade de desenvolver uma resposta imune celular, que pode ser caracterizada pela positividade do teste intradérmico com paracoccidioidina e formação do granuloma compacto e organizado (FRANCO, 1987).

Já pacientes com doença disseminada apresentam um teste negativo para a paracoccidioidina e reações granulomatosas fracamente definida (MONTENEGRO & FRANCO, 1994).

Pacientes com a forma unifocal da PCM usualmente apresentam baixos níveis de anticorpos específicos e resposta imune celular adequada, já os com a doença disseminada tipicamente mostram altos níveis de anticorpos específicos, ativação policlonal de células B, antigenemia e resposta imune celular debilitada (RESTREPO, 1988).

A infecção primária pode persistir em focos quiescentes por décadas como observado em alguns casos (MANNS *et al.*, 1996). Isto significa que durante este período os pacientes foram capazes de controlar a disseminação fúngica, porém permanecendo focos em estado de dormência, que poderão ao longo do tempo ou mesmo mediante situações de imunossupressão promover reativação com disseminação da doença.

Em virtude do aumento na proporção de doenças fúngicas, sobretudo acarretada pela reativação dos focos dormentes, convém à utilização de imunização terapêutica como tentativas para eliminar os organismos dormentes ou propriamente extinguir a infecção, especialmente em doenças cujo tratamento é longo e traumático, como o caso da paracoccidioidomicose, podendo em alguns casos provocar lesões hepatotóxicas (DIXON *et al.*, 1998).

Fatores relevantes nos mecanismos de resistência e suscetibilidade em humanos na PCM são ainda pouco conhecidos. Há poucos trabalhos que descrevem o papel de antígenos de *P. brasiliensis* na indução de uma resposta imunológica protetora em PCM experimental (IZACC *et al.*, 2001).

Até o momento a natureza química dos componentes do *P. brasiliensis* é pouco conhecida, sendo poucas as moléculas do patógeno isoladas e caracterizadas (DIEZ *et al.*, 2002).

Diversas glicoproteínas são excretadas/liberadas pelo *P. brasiliensis* para o ambiente extracelular, principalmente as glicoproteínas de 27-kDa (gp27), 43-kDa (gp43), 55-kDa (gp55), 70-kDa (gp70), 87 kDa (gp87) e gliconjugado polidisperso de alta massa molecular e glicolípídeos. Estes antígenos são observados no antígeno *cell free* (CFA) obtido da superfície do fungo, no sobrenadante de crescimento de *P. brasiliensis* em meio líquido designado exoantígeno (ExoaAg) ou no antígeno somático (AS) obtido por ruptura de *P. brasiliensis* (PUCCIA *et al.*, 1986; BLOTTA & CAMARGO, 1993; TOLEDO *et al.*, 1995; ORTIZ *et al.*, 1998; SALINA *et al.*, 1998). Alguns componentes de *P. brasiliensis* podem ser

importantes para a patogênese da PCM, sendo favorável ao *P. brasiliensis* ou ao desenvolvimento da resposta imune adequada do hospedeiro.

A gp43 promove uma resposta humoral imunodominante assim como resposta imune celular (TRAVASSOS *et al.*, 1994), funcionalmente atua como uma adesina (VICENTINI *et al.*, 1994).

Células T CD4 preferencialmente reagem com a gp43, *in vitro*, e sintetizam INF- γ em resposta. Sabe-se que esta citocina é muito importante para controlar a infecção em camundongos (DIXON *et al.*, 1998).

A produção sustentada de citocinas padrão TH1, tipo INF γ e IL-2 e níveis significativamente altos de IgG2a, são encontrados em camundongos resistentes a PCM (KASHINO *et al.*, 2000).

Dados preliminares indicam que imunizações estimulando a liberação de INF- γ e injeções de gp43 possam reduzir a concentração do Pb nos pulmões de camundongos inoculados intratraquealmente e reduzir a severidade da inflamação nos pulmões (DIXON *et al.*, 1998).

DINIZ e colaboradores (2004) mostraram que a imunização de camundongos com as frações F0, FII, FIII de *P. brasiliensis* 18 fracionadas por cromatografia aniônica no sistema FPLC (Fast protein liquid chromatography), estimularam a resposta imunológica celular, avaliada pela proliferação *in vitro* de células do baço estimuladas por estes antígenos. Nos camundongos imunizados com F0 e FII a alta produção de IFN- γ foi capaz de prevenir a disseminação da infecção para outros órgãos com a formação de granulomas organizados e compactados, contendo poucas células fúngicas. Embora a FIII induzisse a produção de INF- γ , ela não desencadeou uma resposta protetora, pois a resposta adaptativa celular para o antígeno FIII não está associada com proteção.

MARQUEZ e colaboradores (2005), observaram altos níveis de IgG e não de IgE contra o componente de alta massa molecular (hMM) de aproximadamente 386 kDa de *P. brasiliensis* no soro de pacientes com PCM na forma crônica mas não na forma aguda da doença, sugerindo a não indução da resposta Th2. Considerando a possibilidade da resposta imune à fração hMM ser benéfica ao hospedeiro, PAVANELLI e colaboradores (2007) analisaram a atividade protetora da fração de hMM de *P. brasiliensis* em camundongos BALB/c, evidenciando que ocorre imunidade protetora parcial, com diminuição de crescimento de colônias (CFU) e diminuição de antígenos circulantes.

Portanto, se faz necessário avaliar a resposta imune a sub-frações da fração de alta massa molecular de 380 kDa (hMM) do Pb, e assim identificar um antígeno menos complexo do AghMM do *P. brasiliensis* para investigação futura da sua ação imunomoduladora.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Obter a sub-fração do componente de alta massa molecular obtida por digestão com tripsina na paracoccidiodomicose experimental e avaliar a Resposta Imune Humoral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter frações do componente de alta massa molecular (hMM) de *P. brasiliensis* por cromatografia em Coluna Sephadex G - 200.
- Analisar efeito do tempo de incubação do componente hMM com a tripsina.
- Obter sub-frações de hMM tratadas com enzima tripsina por cromatografia em Coluna Sephadex G 100-120.
- Determinar a massa molecular da F17- II.
- Determinar o nível de IgG anti-F17- II, IgG anti-hMM, IgG anti- gp 43 na paracoccidiodomicose experimental.
- Comparar o nível de IgG anti-F17- II com o nível de IgG anti-hMM e IgG anti-gp43.
- Determinar o nível de antígeno gp43 circulante na PCM experimental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Camundongos machos adultos BALB/c de 6 a 8 semanas foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina alimentados *ad libitum* com ração peletizada e esterilizada.

3.2 MICROORGANISMOS

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* cepa Pb18 (cedido pelo Prof. Dr. Zoilo P. de Camargo - UNIFESP), foi mantido a 35 °C cultivado em ágar saboraud 4% (Biobrás) e repicado a cada cinco dias.

3.3 OBTENÇÃO DE ANTÍGENO *CELL FREE* (CAMARGO *ET AL.*, 1991)

O antígeno *cell free* (CFA) foi obtido de *P. brasiliensis* cepa 18 (Pb18), cultivado em Ágar Sabourand por 5 dias a 35°C. Após cultivo, foi colocado em solução fosfato-salina tamponada (PBS 0,15M e pH 7,4), com inibidor de protease PMSF a 2,5 mM (Sigma) e solução de thimerosol a 0,02%. Foi homogeneizado em vórtex durante 10 minutos e a seguir centrifugado a 12.000 rpm a 4°C. A concentração de proteína foi determinada pela Técnica de Folin (LOWRY *et al.*, 1951).

3.4 Cromatografia em coluna de Sephadex G-200

Amostra de 10 ml de CFA Pb18 (4 mg/ml) foi aplicada em Coluna de Sephadex G-200 seguida de eluição em PBS 0,15 M pH 7,4. As frações obtidas pelo coletor automático de frações, foram analisadas em espectrofotômetro (Spectrum SP-2000UV) a 280 nm. A concentração de proteína foi determinada pela Técnica de Folin (LOWRY *et al.*, 1951).

3.5 DIGESTÃO DA FRAÇÃO DE hMM COM A ENZIMA TRIPSINA

Amostra de 200 µl da solução de tripsina (Sigma) e HCl 0,001 M (1 mg/ml, pH 3,0) foi adicionada em 4 ml de fração de hMM (100 µg/ml) com pH 8,5 . Para determinar o melhor tempo de digestão da molécula de hMM, foram realizadas três incubações a 37°C por: 60', 120', 150'.

3.6 CROMATOLOGRAFIA EM COLUNA SEPHADEX G 100-120

As amostras de fração de hMM (100 µg/ml) em tampão bicarbonato de sódio 1 M pH 8,5 incubadas em diferentes intervalos de tempo com a enzima tripsina foram aplicadas em Coluna Sephadex G 100 – 120, seguida de eluição em PBS 0,15 M pH 7,4. As sub-frações obtidas pelo coletor automático de amostras, foram analisadas em espectrofotômetro (Spectrum SP-2000UV) a 280 nm. A concentração de proteína foi determinada pela Técnica de Folin (LOWRY *et al.*, 1951).

3.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS (SDS-PAGE)

A amostra sub-fração F17-II (1 mg/ml) e padrão de proteína de MM (Invitrogen 1078-010), foram submetidas à eletroforese de poliacrilamida 7,5%. Após corrida,

em tampão tris glicina 1 M (Sigma) pH 8,2 a 100V, o gel foi colocado em solução de TCA (ácido tricloroacético - Sigma) a 10% por 30 minutos. Foi realizada lavagens de 10 minutos com solução de etanol 10% (Vetec, Rio de Janeiro/RJ-Brasil) com ácido acético 5% (Nuclear, Diadema/SP-Brasil). Em seguida por 5 minutos em solução oxidante contendo ácido nítrico 3,2 mM (Sigma Co., USA) e dicromato de potássio 3,4 mM (Chemco, Campinas/SP-Brasil). Foram lavadas novamente com água destilada por 5 minutos. Foi adicionado solução de nitrato de prata 12 mM (Nuclear/Diadema/SP-Brasil) por 20 minutos. Em seguida, foi lavado com água destilada e a revelação do gel foi realizada com solução de carbonato de sódio 280 mM (Nuclear, Diadema/SP-Brasil) e formaldeído 0,019% (Sigma), e o bloqueio com solução de ácido acético 5%, realizado após a detecção das bandas.

3.8 INFECÇÃO E IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C

Camundongos BALB/c foram divididos em 5 grupos (n=5): a) controle sem infecção (normal), b) infectado, c) imunizados com 100 µg da sub-fração F17-II e infectados, d) imunizados com 100 µg da sub-fração F17-II sem infecção, e) inoculados com Adjuvante de Freund e infectados. Os camundongos imunizados e inoculados com AF receberam respectivamente, três doses da sub-fração de hMM ou de AF, sendo a primeira com adjuvante completo de Freund (ACF) e mais 2 doses com intervalos de 15 dias, com adjuvante incompleto de Freund, e após este período de imunização (45 dias) foram infectados com 1×10^6 células de leveduras de *P. brasiliensis*, por via endovenosa. Os animais controle e infectado receberam, respectivamente PBS estéril ou 1×10^6 células de leveduras de *P. brasiliensis*. Os animais foram sacrificados após 56 dias da infecção incluindo 5 animais normais e 5 imunizados que foram sacrificados após 28 dias .

Os camundongos foram manipulados conforme normas e autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina.

3.9 ELISA PARA DETECÇÃO DE IGG ANTI-HMM, IGG ANTI-F17-II, IGG ANTI- GP43 EM SORO DE CAMUNDONGOS BALB/C

Immunoplasmas (TPP, Switzerland), foram sensibilizadas com 100 µl/orifício contendo respectivamente, 30 µg/ml de hMM, de sub-fração F17-II e de gp43, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,0, e incubadas por 1 hora a 37°C e 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com tampão de lavagem (leite em pó desnatado 0,5% com Tween 20 em PBS 0,15 M) e bloqueadas com tampão de bloqueio (leite em pó desnatado 5% com Tween 20 em solução PBS 0,15 M), por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas, sendo então adicionado 100 µl/orifício de amostra de soro de camundongos, diluídas 1:10 em tampão de diluição (PBS, leite em pó desnatado) e incubadas por 1 hora a 37°C. Após lavagens, foram adicionados 100 µl/orifício de conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (Sigma A8924), diluído em tampão de diluição a 1:12000 e em seguida foi feita a incubação por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem foram adicionados 100 µl/orifício da solução reveladora (tampão citrato, O-phenylenediamine Dihydrochloride - Sigma, peróxido de hidrogênio) e a reação foi interrompida após 15 minutos, com 50 µl/orifício de ácido sulfúrico 3 N seguida de leitura das placas em aparelho Multiscan a 492 nm.

3.10 ELISA CAPTURA PARA DETECÇÃO DE GP43 SOLÚVEL EM SORO DE CAMUNDONGOS BALB/C

Immunoplasmas (TPP, Switzerland), foram sensibilizadas com 100 µl/orifício de IgG de coelho anti-gp43, na concentração de 12 µg/ml, diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0, sendo incubadas por 1 hora a 37°C e 18 horas a 4°C. Em seguida as placas foram lavadas com tampão de lavagem (leite em pó desnatado 0,5% com Tween 20 em PBS 0,15 M) e bloqueadas com tampão de bloqueio (leite em pó desnatado 5% com Tween 20 em solução PBS 0,15 M), por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas, sendo então adicionado em duplicata 100 µl/orifício de amostra de soro de camundongos, diluídas 1:10 em tampão de diluição (PBS, leite em pó desnatado) e incubadas por 1 hora a 37°C. Após 4 lavagens, foi adicionado 100 µl/orifício de anticorpo

monoclonal de camundongo anti-gp43, na concentração de 30 µg/ml e novamente incubados por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem, e adição de 100 µl/orifício de conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (Sigma A8924), diluído em tampão de diluição a 1:12000, a placa foi incubada novamente por 1 hora a 37°C. Após adição de 100 µl da solução reveladora (tampão citrato, OPD, peróxido de hidrogênio). A reação foi interrompida em 15 minutos, com 50 µl de ácido sulfúrico 3 N seguida de leitura das placas em aparelho Multiscan a 492 nm.

3.11 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após o sacrifício dos animais parte do fígado foi removido e fixado em solução de formalina tamponada (0,05M NaH₂PO₄, 0,05M Na₂HPO₄, água destilada e 10% de formol 37%, pH 7,0). Os órgãos foram fixados por pelo menos 24 horas e submetidos à desidratação em álcool 70%, 90% e absoluto por 30 minutos cada, e 3 passagens de 15 minutos por xilol. A seguir, submetidos a 3 banhos de 30 minutos em parafina. Secções de 5 µm, fixadas em lâminas de microscopia, foram coradas pela técnica de Grocott (methenamina). Após hidratadas em água, as lâminas foram oxidadas em ácido crômico 5%, por 1 hora, e lavadas em água corrente por 10 minutos. Depois de tratadas em bissulfito de sódio 1%, durante 1 minuto, as lâminas foram novamente lavadas e incubadas em solução de nitrato de prata (5% nitrato de prata, 3% hexamine), à 60°C. Após nova lavagem, as lâminas foram tratadas com 0,1% de cloreto de ouro, por 5 minutos. Os resíduos não oxidados foram removidos com 2% de tiosulfato de sódio, por 2 minutos, e a coloração de fundo foi realizada com *Light Green stain*.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise de variância (ANOVA) teste de Tukey. Os valores foram descritos pela média ± desvio padrão, e os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CROMATOGRAFIA DE CFA Pb18 EM COLUNA DE SEPHADEX G-200

O perfil espectrofotométrico das frações de CFA Pb18 em Coluna Sephadex G200, a 280 nm está mostrado na figura 1. O primeiro pico (tubo 17) foi considerada fração de hMM, denominada de F17 (~380 KDa), de acordo com Marquez *et al.*, 2005.

4.2 RE-FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO F17 TRATADA COM TRIPSINA NA COLUNA SEPHADEX G100-120

As amostras incubadas com tripsina foram aplicadas em coluna G 100 - 120. Os perfis espectrofotométricos estão apresentados na Figura 2. A amostra de hMM tratada por 60 min gerou somente 1 pico. O tratamento de 60 min, resultou em 2 picos. As incubações da fração de hMM por, 120', 150', geraram 3 picos indicando uma ação enzimática mais eficaz da tripsina sobre o componente de alta massa molecular. As sub-frações geradas na incubação do componente de hMM por 120', foram misturadas formando Pools I e II: F17-I (tubos 17 a 21) e F17-II (Tubos 23 a 28), mostrados na Figura 3.

4.3 ANÁLISE DA SUB – FRAÇÃO F17- II POR SDS – PAGE

O resultado da análise da amostra F17-II por SDS-PAGE utilizando gel de poliacrilamida 7,5% demonstrou a presença de uma banda com massa molecular aproximada de 43 KDa com migração eletroforética difusa (Figura 4).

4.4 NÍVEL DE IGG ANTI-F17-II

Os resultados obtidos na Figura 5 mostram que os grupos de camundongos imunizados e sacrificados após 28 e 56 dias apresentaram, aumento estatisticamente significativo quando relacionados respectivamente ao grupo dos animais normais de 28 e 56 dias. ($p < 0,001$)

4.5 NÍVEL DE IGG ANTI-HMM, IGG ANTI- GP43 E DE GP43 EM SORO DE CAMUNDONGOS

Na Figura 6, observamos que os grupos Imunizado ($p < 0,05$), Imunizado/Infectado, AF/Infectado e Infectado apresentaram um aumento significativo nos níveis de IgG anti – hMM ($p < 0,001$), em relação aos animais normais, não observando diferença entre os demais grupos. ($p > 0,05$)

Com relação aos anticorpos anti - gp43, observamos que os animais dos grupos Imunizado/Infectado ($p < 0,01$), AF/Infectado ($p < 0,05$) e Infectado ($p < 0,01$), apresentaram aumento significativo nos níveis de IgGs comparado ao grupo imunizado como apresentado na figura 7. E a presença de nível significativo de gp43 solúvel circulante nos grupos Imunizado/Infectado, AF/Infectado e Infectado, está demonstrada na Figura 8.

4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Granulomas bem organizados com vários fungos ou partes de fungos foram observados no fígado de camundongos aos 56 dias pós-infecção (Figura 9). Não foi observada diferença entre os animais infectados, animais que foram inoculados com adjuvantes e infectados dos animais que foram imunizados com a fração F17-II e infectados.

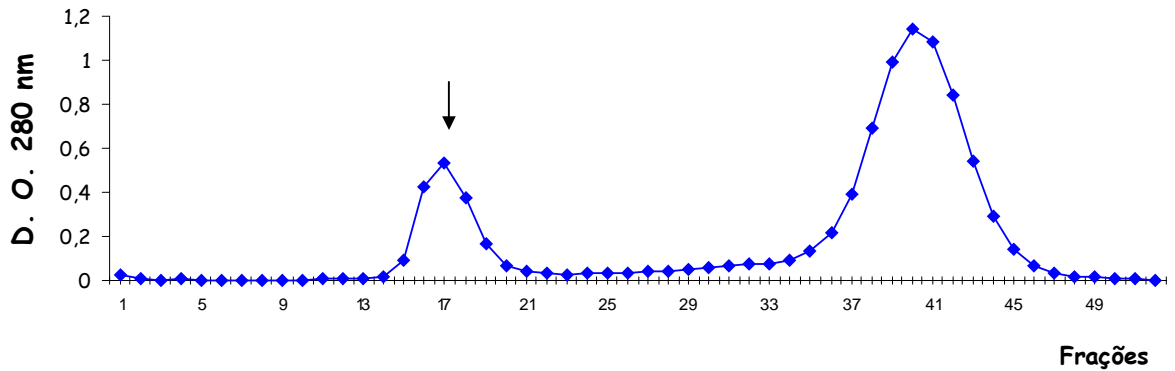


Figura 1 – Perfil espectrofotométrico a 280 nm de CFA de Pb18 por cromatografia em Coluna Sephadex G-200. () Fração 17 correspondente ao antígeno de hMM, denominado F17.

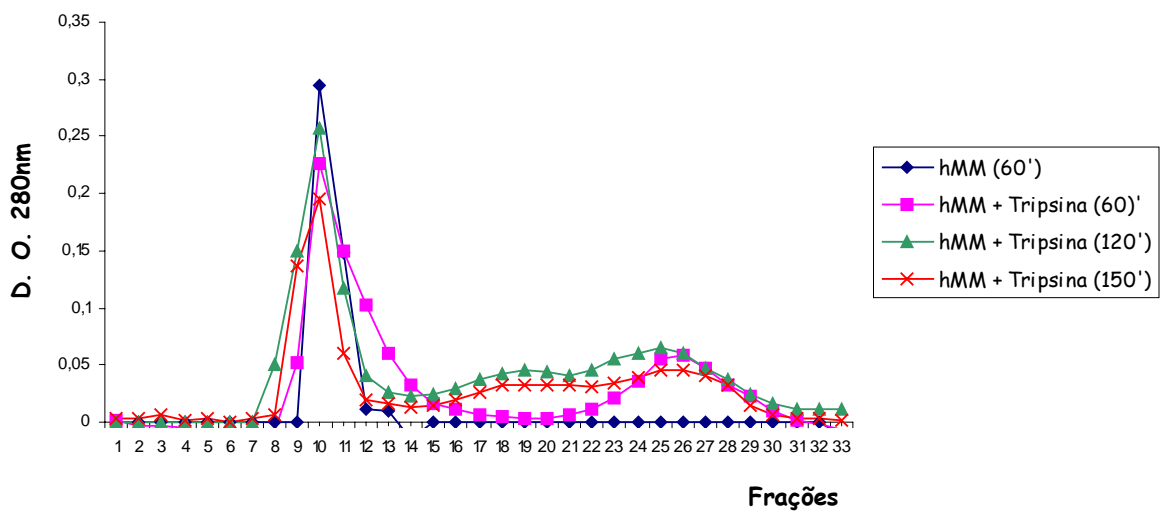


Figura 2 – Perfil espectrofotométrico a 280 nm da fração de hMM (F17) tratada por 60', 120' e 150' com a tripsina a 37°C e refractionada em Coluna Sephadex G 100-120. Padrão: hMM incubada por 60' e refractionada em Coluna Sephadex G 100-120.

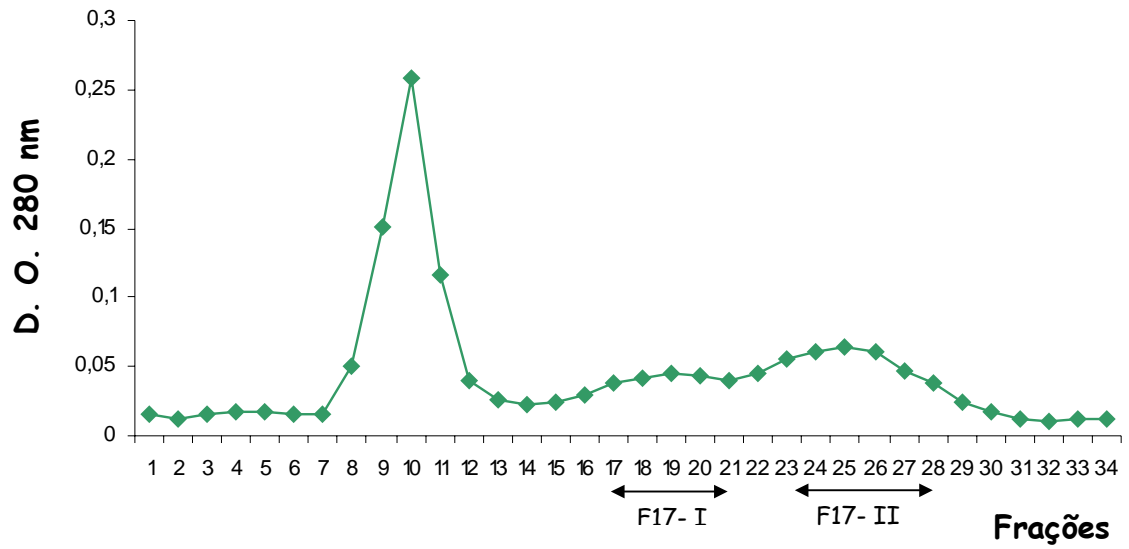


Figura 3 – Perfil espectrofotométrico a 280 nm da fração de hMM (F17) tratada por 120' com a tripsina a 37°C e refractionada em Coluna Sephadex G 100-120. A sub-fração F17- II (tubos 23 a 28) foi utilizada na imunização dos animais.

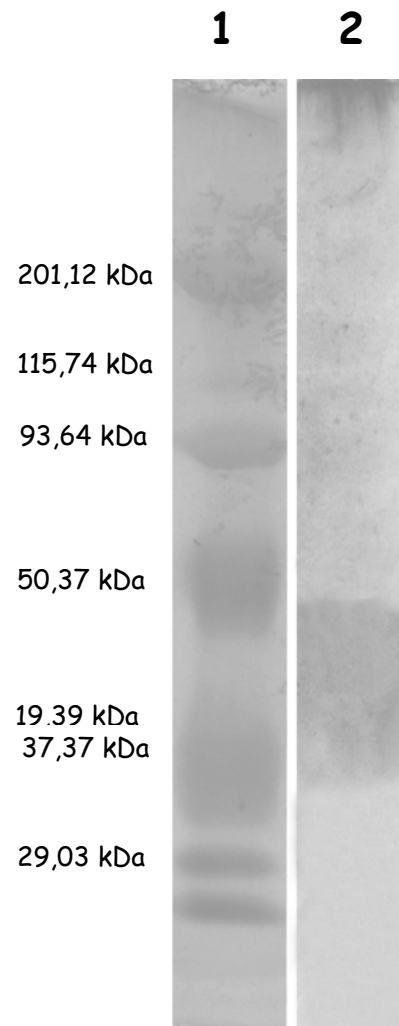


Figura 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%. 1) Padrão de proteína de MM, 2) Sub-fração F17-II (1 mg/ml) apresentando uma banda com massa molecular aproximada de 43kDa com migração eletroforética difusa.

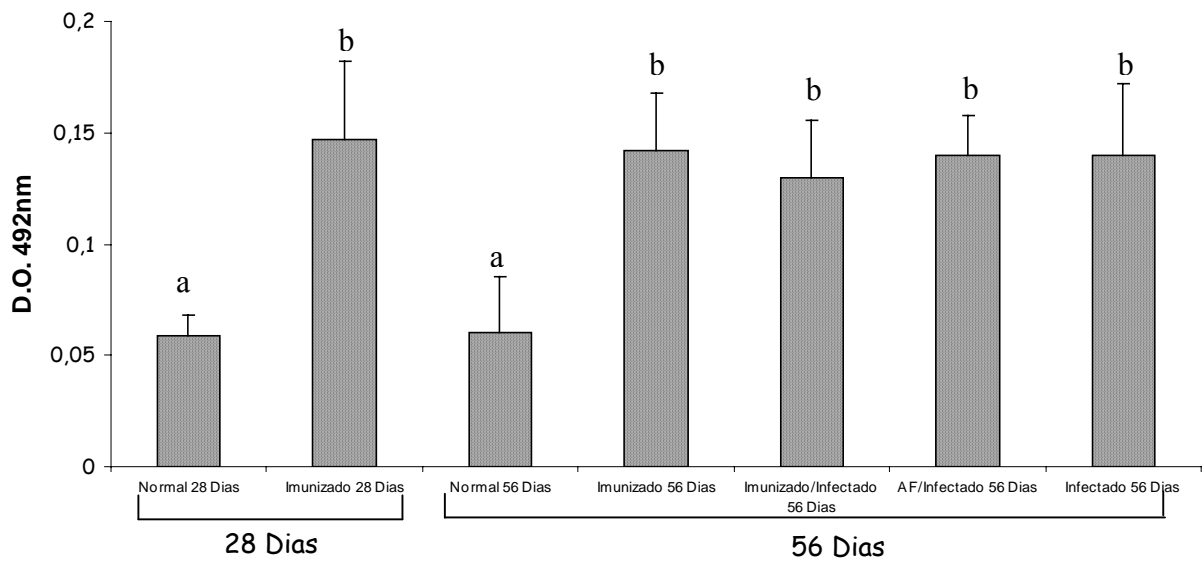


Figura 5 – Nível de IgG anti – F17- II em soro de camundongos Normal (28 e 56 dias), Imunizado (28 e 56 dias), Imunizado/Infectado (56 Dias), AF/Infectado (56 Dias) e Infectado (56 Dias), determinados por ELISA. Dados são informados como densidade óptica (D.O.) a 492nm, sendo a diluição do soro 1:10. Valores significativos quando $p < 0,001$, sendo obtidos quando animais imunizados do grupo de 28 dias e 56 dias foram relacionados respectivamente com o grupo normal de 28 dias e 56 dias.

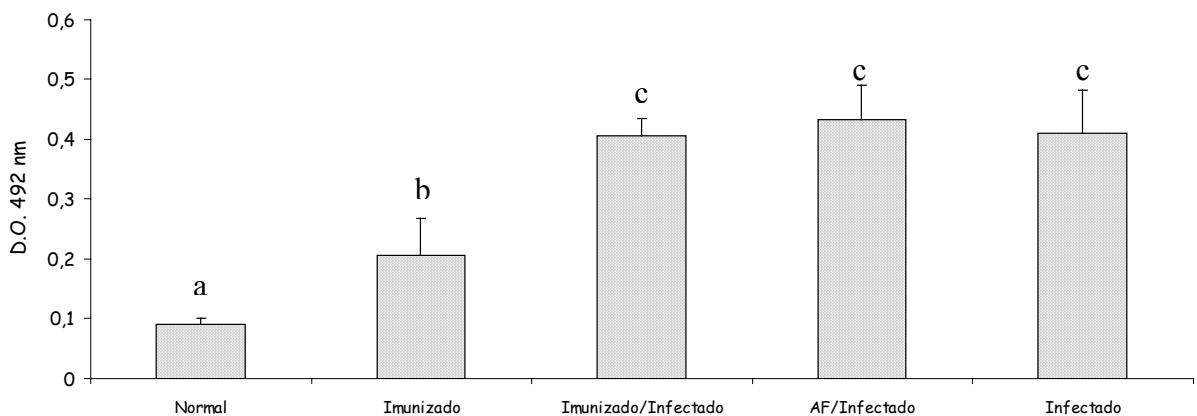


Figura 6 – Nível de IgG anti- fração de hMM de *P. brasiliensis* por ELISA no grupo de camundongos Normal, Imunizado, Imunizado/Infectado, AF/Infectado e Infectado, determinados por ELISA. Dados expressos em densidade óptica (D.O.) a 492 nm, sendo a diluição do soro 1:10. Valores significativos sendo obtidos quando os animais Imunizados ($p < 0,05$) foram comparados aos normais, ou quando Imunizado/Infectado, AF/Infectado e Infectado ($p < 0,001$) foram comparados em relação aos animais imunizados e normais, não observando diferença entre os demais grupos ($p > 0,05$).

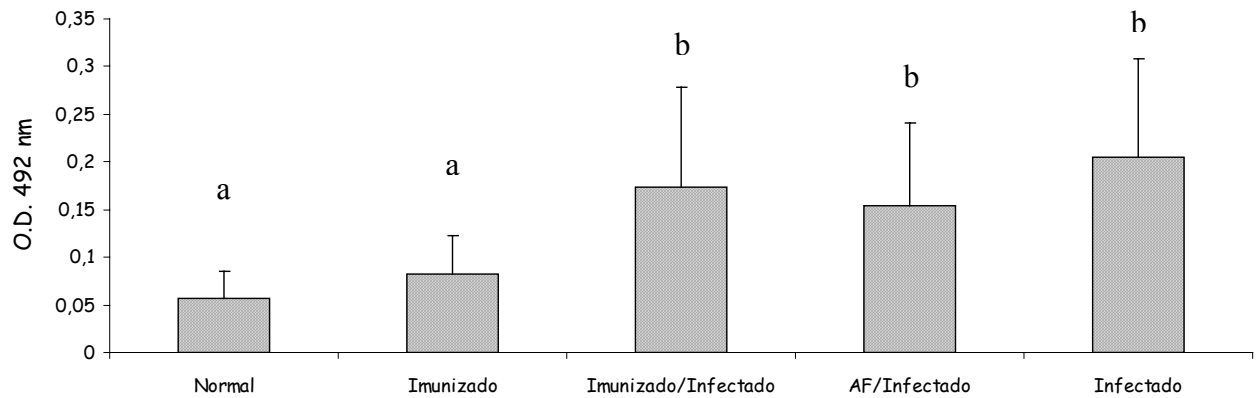


Figura 7 – Nível de IgG anti – gp43 em soro de camundongos Normal, Imunizado, Imunizado/Infectado, AF/Infectado e Infectado, determinados por ELISA. Dados são informados como densidade óptica (D.O.) a 492 nm, sendo a diluição do soro 1:10. Valores significativos quando os animais dos grupos Imunizado/Infectado ($p < 0,01$), AF/Infectado ($p < 0,05$) e Infectado ($p < 0,01$), foram comparado aos animais normais e imunizados.

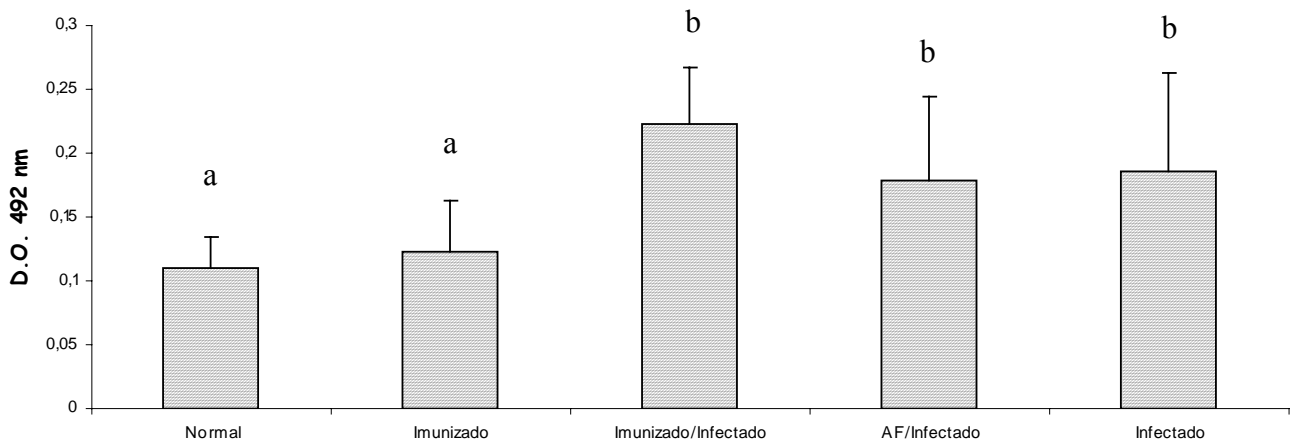


Figura 8 – Detecção de gp43 solúvel em soro de camundongos Normal, Imunizado, Imunizado/Infectado, AF/Infectado e Infectado, determinados por ELISA. Dados são informados como densidade óptica (D.O.) a 492nm, sendo a diluição do soro 1:10. Valores significativos ($p < 0,05$) obtidos quando animais Imunizados/ Infectedos, AF/Infectedos e Infectedos foram comparados em relação aos normais e imunizados.

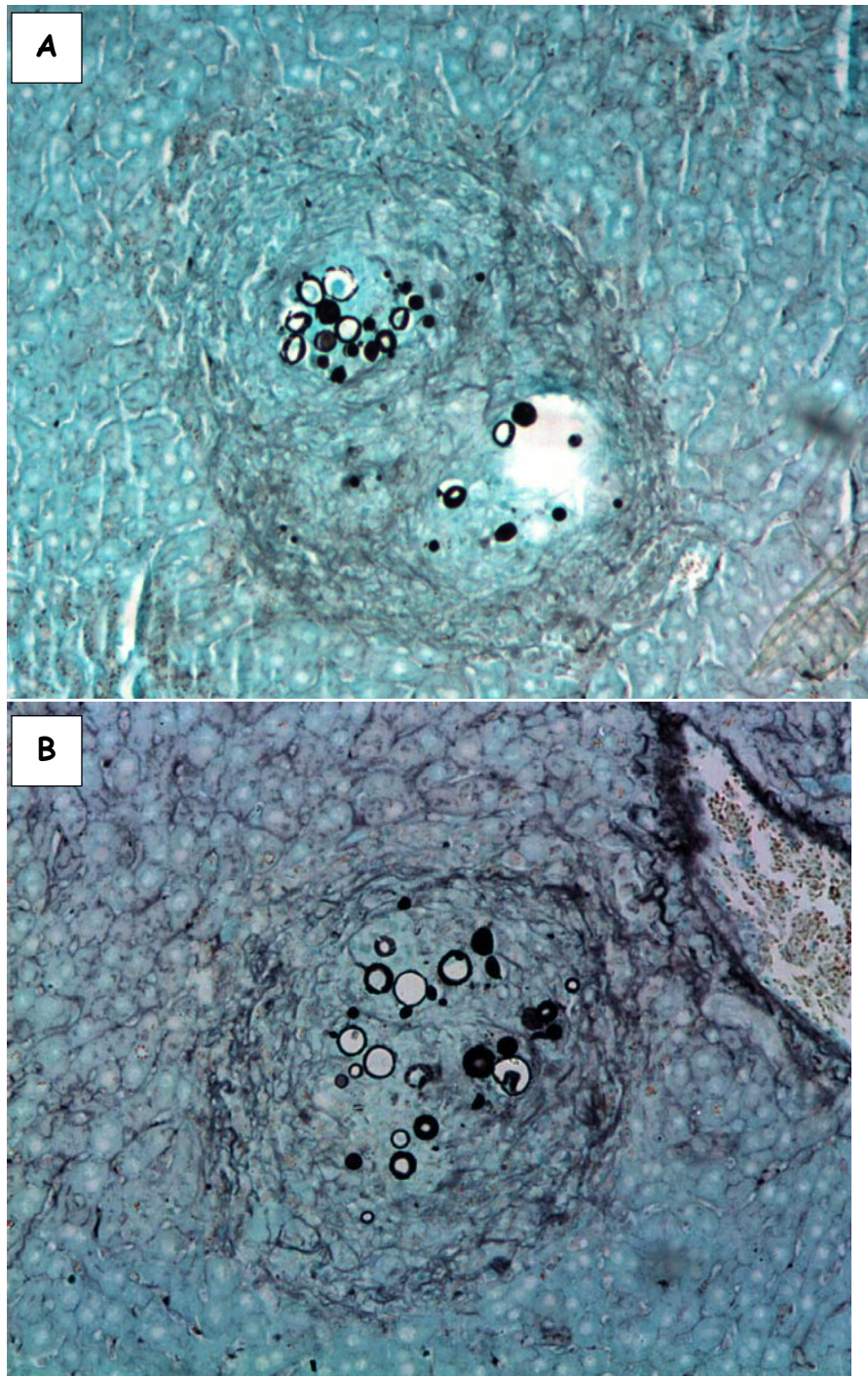


Figura 9 – Lesões histopatológicas de fígado nos grupos (A) imunizado/infectado (10x) e (B) Infectado (20x), mostrando granulomas epitelióides com muitas células de leveduras viáveis e uma destruição extensa do tecido.

5 DISCUSSÃO

Dentre diversos antígenos presentes no preparado CFA reconhecidos pelos soros de pacientes com PCM, o componente de alta massa molecular de migração eletroforética ampla é o antígeno menos investigado. Segundo PAVANELLI e colaboradores (2007), a fração é semipurificada e constituída de dois antígenos de MM distintas sendo um de aproximadamente 380 kDa e outro com MM superior porém próximo de 380 kDa, embora MARQUEZ e colaboradores (2005) tenham demonstrado apenas um Ag de MM de ~380 kDa por Western blotting. Segundo PAVANELLI e colaboradores (2007) a hMM apresenta atividade protetora na PCM experimental.

Considerando a importância da fração hMM, o presente trabalho teve como objetivo inicial de melhor caracteriza-la, avaliando a ação da tripsina sobre a fração hMM. Utilizando diversos tempos de incubação foi verificada que a ação da tripsina sobre a fração hMM resulta na geração de duas sub-frações denominadas de F17-I e F17-II. Esta suscetibilidade foi verificada pela análise do perfil cromatográfico a 280 nm de eluatos oriundos de cromatografia por gel de filtração. Esta suscetibilidade foi parcial como pode ser observado pela discreta diminuição do primeiro pico da Sephadex G-200 que corresponde ao primeiro pico da Sephadex-G100.

A resistência à digestão com tripsina possivelmente se deve a presença de carboidratos (CH), pois PUCCIA e colaboradores (1986), demonstraram que os glicoconjugados de alta MM são ricos em carboidratos. A proteção conferida por CH tem sido observada com a diferença na proteólise entre a gp43 e a p38 (gp43 sem CH) pela ação de papaína e pronase. (TRAVASSOS *et al.*, 1994).

Possivelmente o processo de deglicosilação da fração hMM poderia favorecer a sua digestão pela tripsina como também por outras enzimas.

A manutenção do componente de alta massa molecular também foi observada pela ação da papaína (KAMINAMI, 2006).

A sub-Fração gerada com menor tempo de incubação e maior valor de absorbância a 280 nm, F17-II, foi selecionada para avaliação de imunogenicidade. Os resultados obtidos demonstraram um aumento no nível de IgG específica em camundongos previamente imunizados com a referida sub-fração. Este aumento significativo foi observado após 28 dias e após 56 dias pós-imunização.

Com objetivo de verificar o efeito da imunização na infecção com *P. brasiliensis* foi avaliado o nível de IgG a F17-II, IgG anti-hMM e à gp43 em camundongos imunizados/infectados e somente infectados durante 56 dias. Os resultados obtidos demonstram aumento significativo de IgG anti-hMM e anti-gp43 em soro de camundongos apenas infectados, não observando diferença com o grupo imunizado/infectado, indicando que a sub-fração F17-II não potencializa a resposta imune humoral, o que sugere uma baixa indução de células de memória. A análise histopatológica de fígado demonstrou a presença de fungo *P. brasiliensis* e, portanto com a presença de antígeno que poderia estar estimulando o sistema imune e no grupo com a imunização prévia poderia estar induzindo uma resposta muito mais evidente. No entanto mesmo nível de IgG a sub-fração F17-II foi observado no grupo imunizado/infectado e grupo infectado.

Embora a fração F17-II seja parte integrante da fração hMM, possivelmente se trata de uma sub-fração de hMM que por si só não contribui com a imunogenicidade da fração hMM.

Considerando que no processo de imunização com a F17- II foi utilizado Adjuvante de Freund (AF), como controle foi utilizado camundongo tratado apenas com AF e infectado. Os resultados obtidos demonstraram que o adjuvante freund não interfere na produção de IgG específicas.

Embora a MM da sub-fração F17-II seja similar da gp43, os resultados de nível de IgG anti-gp43 sugere que a sub-fração não se trata de gp43. Além disso, a gp43 apresenta uma banda estreita e compacta de migração eletroforética (KAMINAMI, 2006) enquanto que a sub-fração F17-II se apresenta de forma difusa.

A determinação do nível circulante de gp43 solúvel tem sido, utilizado tanto como meio de diagnóstico (CAMARGO *et al.*, 1991) bem como parâmetro de severidade da doença (SILVA *et al.*, 2004). Como esperado, o resultado de análise de nível sérico de gp43 solúvel no grupo infectado foi significativamente maior que no grupo normal, concordando com os dados de RAMOS e colaboradores (2005) e PAVANELLI e colaboradores (2007). No entanto, não foi observado diferença entre o grupo imunizado/infectado e infectado, sugerindo que a fração F17-II não apresenta atividade protetora. Porém, para afirmar esta hipótese são necessários estudos adicionais com diferentes doses de fração F17-II adicionados a diferentes períodos pós - imunização e pós – infecção.

6 CONCLUSÕES

- 1) A fração hMM de *P. brasiliensis* apresenta suscetibilidade parcial à ação da enzima tripsina, gerando uma ou duas frações em função do tempo de incubação.
- 2) A sub-fração F17-II apresenta antigenicidade e massa molecular de aproximadamente 43kDa com ampla migração eletroforética.
- 3) A Imunização prévia com a F17-II não potencializa Resposta Imune Humoral específica na PCM experimental em camundongos.

REFERÊNCIAS

- ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; COCK, A.M.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med. Mycol.*, v.40 (2), p. 169-178, 2002.
- 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(3), p.671-676, 1993.
- BRUMMER, E.; CASTANHEDA E.; RESTREPO A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol.*, v.6, p. 89-117, 1993.
- CAMARGO, Z.P.; BERZAGHI, R.; AMARAL, C.C.; SILVA, S.H. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. *Med. Mycol.*, v. 41 (6), p. 539-542, 2003.
- CAMARGO, Z.P.; TABORDA, C.P.; RODRIGUES, E.G; TRAVASSOS, L.R. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J. Med. Vet Mycol.*, v. 29 (1) p. 31-38, 1991.
- CASTRO, R. M.; DEL NEGRO, G. Particularidades clínicas da paracoccidioidomicose na criança. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.*, v.31 (3), p. 194-198, 1976.
- DIEZ, S.; GOMEZ, F. J.; RESTREPO, A.; HAY, R. J.; HAMILTON A.J.; *Paracoccidioides brasiliensis* 87 – Kilodaltons antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, p. 359-365, 2002.
- DINIZ, S.N.; REIS, B.S.; GOES, T.S.; ZOUAIN, C.S.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine*, v. 2; 22 (3-4), p. 485-92, 2004.
- DIXON, D. M; CASADEVALL, A.; KLEIN, B. S.; MENDOZA, L.; TRAVASSOS, L.; DEEPE, G. S. Jr. Development of vaccines in their use in the prevention of fungal infections in Brazil. *Med. Mycol.*, v. 36 (1), p. 57-67 1998.
- FRANCO, M. Host- parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet Mycol.*, v.25 (1), p. 5 - 18, 1987.

IZACC, S. M.; GOMEZ, F. J.; JESUINO, R. S.; FONSECA, C. A.; FELIPE, M. S.; DEEPE, G.S. Molecular cloning characterization and expression of heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.*, v. 39, p. 445-455, 2001.

KAMINAMI, M. S. *Caracterização Bioquímica e Imunológica de sub-frações de antígeno de alta massa molecular de Paracoccidioides brasiliensis*. 2006. 40 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, C; MELONI-BRUNERI, L.H.; BURGER, E.; VAZ, C.A.; SINGER, L. M.; CALICH, V. L. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence or INF- gamma production. *J. interf and cytok Res.*, v. 20 (1), p. 89-97, 2000.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193 (1), p. 265-275, 1951.

MARQUEZ, A. S.; VICENTINI, A. P.; ONO, M. A., WATANABE, M. A. E.; CAMARGO, Z. P.; ITANO, E. N. Reactivity of antibodies from patients with acute and chronic Paracoccidioidomycosis to a High Molecular Mass Antigen from *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. clin labor. Analy.*, v. 19, p. 199-204, 2005.

MANNS, B.J.; BAYLIS, B.W.; URBANSKI, S.J.; GIBB, A.P.; RABIN, H.R. Paracoccidioidomycosis: case report and review. *Clin. Infec. Dis.*, v. 23 (5), p. 1026-1032, 1996.

McEWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PATINO, M.M.; SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. *J. Med Vet Mycol.*, v. 25 (3), p. 165-175, 1987.

MENDES, R. P. The gamut of clinical manifestations. In: FRANCO, M. ET AL., Paracoccidioidomycosis. 1. ed Boca Raton, Flórida: 1994. p. 230-259.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: 1. ed. Boca Raton: CRC Press, p. 131-142, 1994.
NEGRONI, R. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis, Lutz's mycosis). *Int. J. Dermatol.*, v. 32 (12), p. 847-859, 1993.

ORTIZ, B.L.; DIEZ, S.; URAN, M.E.; RIVAS, J.M.; ROMERO, M.; CAICEDO, V.; RESTREPO, A.; McEWEN, J.G. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 5(6), p. 826-30, 1998.

PAVANELLI, W. R.; KAMINAMI, M.S.; GEREZ, J.R.; SANO, A, ONO M. A., CAMARGO, I.C.C; AND ITANO, E. N. Protection induced in BALB/c mice by the High-Molecular-Mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides brasiliensis* . *Mycopathology*, 2007. "in press".

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A J.; TRAVASSOS, L.R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect. Immun.*, v. 53(1), p.199-206, 1986.

RAMOS, S. P.; ITANO, E. N.; SANO, A.; LOPES, J. D.; ONO, M. A., CAMARGO, Z. P. Antigenuria and antigenemia in experimental murine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.*, v. 43 (7), p. 631-636, 2005.

RESTREPO. A. Immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. In: McGinnis MR (Editor), *Med Mycol.*, v. 2, p. 239-275, 1988.

SALINA, M. A.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MENDES, R.P., BARRAVIERA, B.; MENDES GIANNINI, M.J. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *J. Clin. Microbiol.*, v.36(6), p. 1723-1728, 1998.

SILVA, H. M. S.; TELLES, F. Q.; COLOMBO, A. L.; BLOTTA, M. H. S. L.; LOPES, J. D.; CAMARGO M. A. Monitoring gp43 Antigenemia em Paracoccidioidomycosis patients during Therapy. *J. Clin. Microbiol.*, p. 2419-2424, 2004.

TOLEDO, M.S.; SUZUKI, E.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K. Glycolipids from *Paracoccidioides brasiliensis*. Isolation of a galactofuranose-containing glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* V.33 (4) , p. 247-251, 1995.

TRAVASSOS, L.R.; PUCCIA, R.; CISALPINO, P., TABORDA, G. RODRIGUES, G.E., RODRIGUES, M.; SILVEIRA, J. F.; ALMEIDA, I.C. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* . *Arch. Med. Res.*, v. 26, p297-304, 1994.

VICENTINI, A. P.; GESZTESI, J.L.; FRANCO, F. M.; SOUZA, W de, MORAES, J. Z. de TRAVASSOS, R. T.; LOPES, J. D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin though surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect. Immunol.*, v. 62, p. 1455-1459,1994.