



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AUDREY DE SOUZA MARQUEZ

**DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS IgG E IgE TOTAIS E
ESPECÍFICAS, PROTEÍNAS SÉRICAS, HDL COLESTEROL E
IMUNOCOMPLEXOS NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
AGUDA E CRÔNICA**

Londrina
2007

AUDREY DE SOUZA MARQUEZ

**DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS IgG E IgE TOTAIS E
ESPECÍFICAS, PROTEÍNAS SÉRICAS, HDL COLESTEROL E
IMUNOCOMPLEXOS NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
AGUDA E CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação,
em Microbiologia da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Londrina
2007

AUDREY DE SOUZA MARQUEZ

**DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS IgG E IgE TOTAIS E
ESPECÍFICAS, PROTEÍNAS SÉRICAS, HDL COLESTEROL E
IMUNOCOMPLEXOS NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
AGUDA E CRÔNICA**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nelson Figueiredo Mendes
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Emerson José Venâncio
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 14 de setembro de 2007.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Ciências Patológicas – CCB, Universidade Estadual de Londrina, sob orientação da Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano e contou com o apoio da FINEP, Fundação Araucária e Coordenadoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UEL.

Dedico

Com amor e gratidão, à Força Espiritual Infinita do Universo, que nos impulsiona a encontrar nossa verdadeira Essência, àqueles que amo profundamente e a todos os seres da natureza que contribuem para o meu crescimento.

Agradeço

Aos meus pais Carlos Marquez e Maria Regina de Souza Marquez por sua doação e intensa capacidade de me amar.

Ao meu esposo Ricardo Moita e à minha filha Lara Marquez Moita que com paciência e compreensão preencheram minha vida com amor e assim me ajudaram a chegar ao final deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Eiko Nakagawa Itano, que sempre disposta, amiga e solidária colaborou de maneira imprescindível para meu crescimento profissional;

À Mári Sumigawa Kaminami, Nilson de Jesus Carlos e Lucinei Maria de Oliveira Brunello pelo incentivo e auxílio técnico na fase experimental deste trabalho;

Aos meus amigos e colegas de laboratório Fernanda Akemi Nakanishi, Berenice Tomoko Tatibana, Kátia Key Oshiro, Luciene Airy Nagashima, Thiago Yuiti Castilho Masuda, Paula César Leonello, Thiago César Fugita, Welder Franzini Amaral Callera, Rosália Hernandes Fernandes Vivan, Franciele Ayumi Semencio Chiyoda pela amizade e solidariedade em diversos momentos;

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina que contribuíram com a minha formação;

Aos meus colegas de profissão docente Beatriz Schlatter Hasenack, Éryka Helena Trapp, Elaine Regina Delicato, Rosiley Lima Guilherme, Francis Bergonzi, José Luiz Ketzer de Souza, pelo incentivo e compreensão com que me apoiaram sempre que precisei;

Aos pacientes e doadores voluntários que contribuíram de maneira imprescindível para que este trabalho fosse desenvolvido;

Ao Professor Dr. Leonardo Sturion e Professora Dra. Tiemi Matsuo do Departamento de Matemática Aplicada pelos ensinamentos e auxílio na execução da análise estatística dos resultados deste trabalho.

MARQUEZ, Audrey S. **Dosagem de imunoglobulinas IgG e IgE totais e específicas, proteínas séricas, HDL colesterol e imunocomplexos na paracoccidiodomicose aguda e crônica.** 2007. 95f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

A Paracoccidiodomicose (PCM), causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, apresenta duas formas clínicas distintas: forma aguda (AF) e forma crônica (CF). A AF ocorre principalmente em indivíduos jovens e é mais grave e rara enquanto que a CF acomete, sobretudo, homens adultos e em geral de forma menos grave. Os casos de maior gravidade relacionam-se com a depressão da resposta imune celular, a ativação policlonal de células B e o desvio da resposta imune para Th2. Diversos componentes solúveis liberados pelo fungo, como a gp-43, assim como a presença de imuno complexos circulantes tem sido associados ao desvio de resposta e maior gravidade da PCM. O objetivo do presente trabalho foi determinar marcadores moleculares de diferenciação entre as duas formas da doença. Considerando as dificuldades em se estabelecer rotinas sorológicas simples, rápidas e com antígenos padronizados para o diagnóstico laboratorial ambulatorial da PCM e acompanhamento de tratamento, realizou-se inicialmente a correlação das alterações observadas nas frações de eletroforese de proteínas com a dosagem de IgG e IgE totais e HDL colesterol. Foram analisadas 30 amostras de soros de pacientes com CF PCM, 12 de AF PCM e 44 de doadores normais (NHS) por eletroforese e por ensaio imunoenzimático (ELISA). Na segunda etapa foram investigados os níveis séricos de IgG e IgE total e específicas, IC IgG-IgE e IC IgG-gp43 através de ELISA em soro de pacientes com CF PCM (22), AF PCM (12) e NHS (29). Os resultados demonstraram alterações nas frações de proteínas e que existem correlações positivas entre a fração beta e gama-globulinas ou alfa-1 globulinas, gama e alfa-1 globulinas e entre gama-globulinas e níveis de IgE total. Concluímos pelo trabalho que existem diferenças entre as duas formas por alterações nas frações alfa-1 e gama globulinas e que existe diferença na interpretação dos resultados de albumina quando analisados em porcentagem ou níveis absolutos e que o HDL colesterol não contribui para as elevações observadas na fração alfa-1 globulinas na PCM. Os resultados também confirmam que os níveis séricos elevados de IgG e IgE total e IgG e IgE específicas e IC IgG-gp43 estão associados com a forma mais grave da doença e este trabalho introduz pela primeira vez a presença de IgG-IgE IC diferenciando a forma aguda da PCM da crônica.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*. IgG. IgE. Imuno complexos. Perfil de proteínas.

MARQUEZ, Audrey S. **Determination of total and specific immunoglobulins IgG and IgE, serum proteins, HDL cholesterol and immune complexes in acute and chronic paracoccidioidomycosis.** 2007. 95p. Thesis (Doctor in Microbiology) – Londrina State University, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM), caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, presents two different clinical forms: acute form (AF) and chronic form (CF). The AF occurs particularly in young individuals and is more severe and rare while the CF involves, mainly, male adults and a more benign form, in general. The more severe cases are related to the depression of cellular immune response, polyclonal activation of B cells and to a Th2 cellular immunity deviation. Several soluble components are liberated by the fungus, as gp-43, as well as the presence of circulation immune complexes (IC) has been associated to the deviation of immune response and greater severity in PCM. The aim of this work was to determine differentiating molecular markers between the two forms of the disease. Considering the difficulties in establishing rapid and simple serological routines with padronized antigens for ambulatory laboratory diagnosis of PCM and treatment follow-up, it was initially analyzed possible correlations of alterations observed in fractions of serum proteins electrophoresis and the levels of total IgG and IgE and HDL cholesterol. Thirty serum from CF PCM patients, 12 from AF PCM and 44 from healthy donors (NHS) were analyzed by electrophoresis and enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA). Subsequently, it was investigated the seric levels of total and specific IgG and IgE, IgG-IgE IC and IgG-gp43 IC through ELISA in sera of CF PCM (22), AF PCM (12) and NHS (29). Results demonstrated alterations in protein fractions and that there are positive correlations between beta and gamma-globulins or alpha-1 globulins, gamma and alpha-1 globulins and between gamma-globulins and total IgE levels. Through this work we have concluded that there are differences between the two forms of PCM in regard of fractions alpha-1, alpha-2 and gamma-globulins and that there is difference in albumin results interpretation when analyzed in percentages or absolute levels and that HDL cholesterol do not contribute to the elevations observed in alpha-1 globulins fraction in PCM. The results also confirm that elevated seric levels of total and specific IgG and IgE and IgG-gp43 IC are associated with the more severe form of the disease and this work evidenced for the first time the presence of IgG-IgE IC differentiating between AF and CF PCM.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. IgG. IgE. Immune complexes. Serum protein profile.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figure 1** – Correlation between gamma and beta-globulins in AF PCM, CF PCM and NHS 68
- Figure 2** – Correlation between alpha-1 and beta-globulins in AF PCM, CF PCM and NHS 69
- Figure 3** – Correlation between alpha-1 and gamma-globulins in AF PCM, CF PCM and NHS..... 70
- Figure 4** – Correlation between gamma-globulins and total IgE in AF PCM, CF PCM and NHS..... 71
- Figure 5** – Medium values and standard deviation of gamma-globulins fraction in AF PCM, CF PCM and NHS. 72

ARTIGO 2

- Figure 1** – Mean levels of IgG-IgE IC and IgG-gp43 IC in sera of patients with CF PCM, AF PCM and NHS expressed in optical density (OD)..... 90
- Figure 2** – Mean levels of total IgG and total IgE in sera of patients with CF PCM, AF PCM and NHS expressed in optical density (OD)..... 91
- Figure 3** – Mean levels of specific IgG and IgE to *P. brasiliensis* antigens in sera of patients with CF PCM, AF PCM and NHS expressed in optical density (OD)..... 92
- Figure 4** – Pearson's correlation test for (A) total IgG and specific IgG anti-ExoAg and (B) total IgE and specific IgE anti-gp43..... 93

LISTA DE TABELAS

- Table 1** – Total IgG and total IgE by ELISA. Results are shown in optical density and mg/dL and ng/dL, respectively. The reference values for total IgG in adults is 751 to 1560 mg/dL and for total IgE is up to 33,6 ng/dL in individuals above 10 years old. AF PCM patients demonstrated both total IgG and IgE elevated and CF PCM patients demonstrated only total IgE above reference values..... 65
- Table 2** – Serum protein profile obtained in acetate-cellulose electrophoresis expressed in g/dL and percentages. Reference values from literature for each variable are: total proteins (6,0 – 8,0g/dL), albumin (3,5 – 4,9g/dL; 50 a 68%), α 1-globulins (0,1 – 0,4g/dL; 2 a 6%), α 2-globulins (0,4 – 0,8g/dL; 7 a 12%), β -globulins (0,6 – 1,0g/dL; 9 a 16%) and γ -globulins (0,8 – 1,4g/dL; 12 a 22%)..... 66
- Table 3** – Results of protein fractions in acetate cellulose membrane electrophoresis in chronic PCM patients sera..... 67

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
dL	Decilitros
µg	Microgramas
µL	Microlitros
mg	Miligramas
mL	Mililitros
nm	Nanômetros
AF-PCM	Paracoccidiodomicose aguda
Ag	Antígeno
ALT	Alanina aminotransferase
Anti-gp43	Anticorpo contra a gp43
AST	Aspartato aminotransferase
CD4	Conjunto de diferenciação CD4 (Linfócitos T CD4 ⁺)
CD8	Conjunto de diferenciação CD8 (Linfócitos T CD8 ⁺)
CFA	Antígeno livre de célula (<i>Cell Free Antigen</i>)
CF-PCM	Paracoccidiodomicose crônica
DNA	Ácido desoxiribonucléico
E2	17β-estradiol
PLE	Proteína ligadora de estrogênio
ELISA	Enzimaimunoensaio
ExoAg	Exoantígeno
γ-GT	Gama glutamiltransferase
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito-macrófago
gp43	Glicoproteína de 43 quilodaltons
gp70	Glicoproteína de 70 quilodaltons
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
IC	Imuno complexo
IgA	Imunoglobulina A
IgAs	Imunoglobulina A secretora
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse G1
IgG2	Imunoglobulina G subclasse G2

IgG3	Imunoglobulina G subclasse G3
IgG4	Imunoglobulina G subclasse G4
IgE	Imunoglobulina E
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IFN	Interferon
IFN-γ	Interferon gama
kDa	Quilodalton
KOH	Hidróxido de potássio
MM	Massa molecular
N	Normal
NaOH	Hidróxido de sódio
NHS	Soro Humano Normal
PBS	Tampão salina fosfato
PCM	Paracoccidiodomicose
PCRn	Reação em cadeia da polimerase do tipo <i>nested</i>
PMN	Neutrófilo polimorfonuclear
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS
Th1	Linfócito T “helper” (auxiliar) 1
Th2	Linfócito T “helper” (auxiliar) 2
TNF	Fator de necrose tumoral
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS E A PARACOCCIDIOIDOMICOSE	18
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS</i>	18
2.2 ASPECTOS GERAIS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE	19
2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS</i>	21
2.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO.....	23
2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	27
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4 REFERÊNCIAS	34
ARTIGO 1 – SERUM PROTEINS FRACTIONS PROFILE AND ITS CORRELATION WITH TOTAL IGG AND IGE IN ACUTE AND CHRONIC PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS	47
ABSTRACT	48
INTRODUCTION	50
MATERIAL AND METHODS	52
Serum samples.....	52
Elisa for total IgE.....	52
Elisa for total IgG	53
HDL quantification.....	54
Serum proteins electrophoresis.....	54
Statistical Analysis	54
RESULTS	55
Elisa for total IgE.....	55
Elisa for total IgG	55
HDL quantification.....	55
Serum proteins electrophoresis.....	56

DISCUSSION.....	57
REFERENCES.....	61

**ARTIGO 2 – POSSIBLE RELATION OF AUTOANTIBODIES AND IGG-
IGE IMMUNE COMPLEXES IN PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS 73**

ABSTRACT.....	74
INTRODUCTION.....	75
MATERIAL AND METHODS.....	77
Serum samples.....	77
Elisa for IgG-IgE IC.....	77
Elisa for IgG-gp43 IC.....	78
Elisa for total IgE.....	78
Elisa for total IgG.....	79
Elisa for IgE anti-gp43.....	79
Elisa for IgG anti-ExoAg.....	79
Statistical Analysis.....	80
RESULTS.....	81
Elisa for IgG-IgE IC.....	81
Elisa for IgG-gp43 IC.....	81
Elisa for total IgE.....	81
Elisa for total IgG.....	81
Elisa for IgE anti-gp43.....	82
Elisa for IgG anti-ExoAg.....	82
DISCUSSION.....	83
REFERENCES.....	85

5 CONCLUSÕES..... 94

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma das mais importantes micoses sistêmicas da América Latina (SAN BLAS, 1993; LACAZ, 1994), sendo apontada por COUTINHO *et al.* (2002) como a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva entre as patologias infecciosas ou parasitárias, e responsável pela mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. O agente etiológico da PCM é o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) e embora o habitat natural ainda não esteja totalmente definido, o fungo já foi isolado do solo e de animais selvagens e domésticos além do homem (De ALBORNOZ, 1971; BAGAGLI *et al.*, 2003; TERÇARIOLI *et al.*, 2005; CONTI DÍAZ, 2007).

Propágulos aéreos constituídos de fragmentos de hifa iniciam a infecção e passam por conversão à fase leveduriforme, estágio infeccioso de *P. brasiliensis*, nos pulmões, progredindo posteriormente aos linfonodos e disseminação linfática ou hematogênica para o fígado, baço, pele, mucosa e sistema nervoso central (McWEEN *et al.*, 1987; FAGUNDES-PEREYRA *et al.*, 2006). A maioria dos indivíduos expostos desenvolve infecção assintomática (infecção primária da PCM). Estudos epidemiológicos utilizando-se teste intradérmico com paracoccidioidina para a detecção de contato prévio com *P. brasiliensis* (FAVA; NETTO, 1998; MANGIATERRA *et al.*, 1999) ou pelo uso de teste imunoenzimático (ELISA), detectando anticorpos IgG específicos (BOTTEON *et al.*, 2002) revelam que a exposição resultante em infecção subclínica é alta em populações adultas saudáveis, principalmente em áreas rurais (BOTTEON *et al.*, 2002; WANKE; LONDERO, 1994). Esta infecção primária da PCM pode persistir em focos quiescentes por décadas como observado em casos importados (MANNIS *et al.*, 1996).

Clinicamente existem duas formas distintas da doença: a forma aguda e a forma crônica (FRANCO *et al.*, 1987b). A forma aguda é mais grave e rara, acomete principalmente indivíduos jovens em igual proporção entre o sexo masculino e feminino, e é caracterizada por uma rápida evolução, com envolvimento do sistema reticuloendotelial, causando linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. A forma crônica ocorre mais freqüentemente em trabalhadores rurais do sexo masculino (BRUMMER *et al.*, 1993; FRANCO *et al.*, 1987b) e pode se apresentar de forma lenta e localizada (unifocal), com acometimento predominantemente em pulmões e tecidos mucocutâneos, até casos mais severos e disseminados (multifocal), dependendo da competência da imunidade celular do

indivíduo (FRANCO *et al.*, 1987a e b; BRUMMER *et al.*, 1993). Aqueles com a forma multifocal podem manifestar uma evolução da doença que se compare em gravidade com a forma aguda (BENARD *et al.*, 1995).

O fato da maioria dos indivíduos expostos ao *P. brasiliensis* não desenvolver a doença indica que os infectados foram capazes de controlar a disseminação fúngica. A resposta imune celular é considerada a mais importante forma de defesa do organismo contra este fungo (BURGER *et al.*, 1996; MARQUES, 2003), como sugerido pelo fato de pacientes com infecção disseminada apresentar teste intradérmico com paracoccidiodina negativo e reações granulomatosas fracamente definidas (MONTENEGRO; FRANCO, 1994). A resposta imune humoral é considerada não protetora, uma vez que a intensa resposta humoral é correlacionada com a gravidade da doença (SINGER-VERMES *et al.*, 1993; POLONELLI *et al.*, 2000; MELLO *et al.*, 2002).

A depressão da imunidade celular na PCM disseminada pode estar associada à resposta mediada por células T-helper-2 (Th2), baseada na classe ou subclasses de imunoglobulina G (IgG) e no padrão de citocinas produzidas (SINGER-VERMES *et al.*, 1993; BAIDA *et al.*, 1999). Na PCM disseminada pode ser observado alto nível sérico de imunoglobulina E (IgE), IgG4, IgE e IgG específicos para a glicoproteína de 43-kDa (gp43) ou para o antígeno de alta massa molecular de *P. brasiliensis*, além de níveis elevados de interleucina 4 (IL-4) e IL-5 (ARANGO; YARZÁBAL, 1982; BAIDA *et al.*, 1999; BISELLI *et al.*, 2001; MELLO *et al.*, 2002; MARQUEZ *et al.*, 2005). Altos níveis de IgG e IgE anti-gp43 estão correlacionados com PCM grave (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1989; MAMONI *et al.*, 2001). A idéia de que *P. brasiliensis* ou seus componentes como gp43 e gp70 contribuem para a imunossupressão específica tem sido discutida e apoiada pelo fato dos níveis destes antígenos circulantes diminuírem com a terapia adequada (BENARD *et al.*, 1997; POPI *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2004).

Além disto, a presença de imuno complexos (IC) circulantes também tem sido relacionada à depressão da imunidade celular e patogênese da PCM (CHEQUER-BOU-HABIB *et al.*, 1989 e 1992). Unterkircher *et al.* (1996) relataram a presença de IC constituídos principalmente de IgG e IgM associados a glicoproteínas de 62-kDa, 43-kDa e diversos outros antígenos irrelevantes como actina, mioglobina, DNA TNP-ovoalbumina em níveis mais elevados em soros de pacientes com PCM aguda ou crônica. Outros estudos demonstraram que ocorre a elevação de IC IgG-gp43 em soros de pacientes com a forma crônica da PCM ou em modelo animal, mas esta elevação não é observada na saliva humana ou em urina de animal experimental infectado (MIURA *et al.*, 2001; RAMOS *et al.*, 2005). A

produção de auto anticorpos anti-IgE formando imunocomplexos tem sido avaliada (BOLUDA; BERRENS, 1995) e imuno-complexos contendo anticorpo-antígeno ou autoanticorpos IgG anti-IgE têm sido relacionados à modulação da biosíntese de IgE e do equilíbrio entre Th1 e Th2, à remoção de IC circulantes via receptor CR1 de hemácias e à patogênese de outras doenças como malária e artrite reumatóide (MILLAUER *et al.*, 1999; APPLEQUIST *et al.*, 2000; MAENO *et al.*, 2000; NYAKERIGA *et al.*, 2003)

O diagnóstico laboratorial de rotina da PCM ainda consiste basicamente na pesquisa direta do fungo ou biópsia dos materiais biológicos já que técnicas sorológicas mais sensíveis como ELISA apresentam fatores limitantes dentre os quais se pode citar a falta de padronização dos antígenos utilizados (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; CORREA *et al.*, 2006). Sendo assim, a avaliação prognóstica e de acompanhamento terapêutico da PCM acaba se baseando, na maioria das vezes, em exames complementares como a eletroforese de proteínas, hemograma e provas bioquímicas para o acompanhamento hepático e renal (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2006).

Considerando a inexistência de dados correlacionando IC contendo IgG e IgE e sua possível relação com IgG e IgE totais e específicas na PCM aguda e crônica, neste trabalho foram investigados os níveis séricos de IgG e IgE total e específicas, IC IgE-IgG e IC IgG-gp43 em soro de pacientes com PCM nas formas aguda e crônica. Além disto, já que ainda existem dificuldades em se estabelecer rotinas sorológicas simples, rápidas e com antígenos padronizados para o diagnóstico laboratorial da PCM, realizou-se a correlação das alterações observadas na eletroforese de proteínas de pacientes com PCM aguda e crônica com a dosagem de IgG e IgE totais a fim de se observar a possível viabilidade deste exame fornecer um indicativo mais preciso a respeito do prognóstico do paciente com PCM.

2 PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS E A PARACOCCIDIOIDOMICOSE

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

O fungo *P. brasiliensis* apresenta dimorfismo, manifestando-se na fase leveduriforme no hospedeiro e em culturas a 37°C, e na forma filamentosa no meio ambiente. As colônias leveduriformes são ligeiramente cremosas ou secas, rugosas e de cor branca a creme. Estas colônias são compostas por células leveduriformes de diferentes tamanhos (4 a 30µm), que se reproduzem por múltiplas gemulações em aspecto “roda de leme”. A fase filamentosa produz colônias brancas a amareladas, pequenas e irregulares, com pouco micélio aéreo. Alguns isolados produzem um pigmento marrom difuso. Microscopicamente as hifas são finas e septadas, e clamidosporos são as únicas estruturas adicionais possíveis de serem observadas nos meios de isolamento usuais (LACAZ *et al.*, 1991). A cultura de alguns isolados em condições de deficiência nutricional faz com que eles produzam artroconídeos e conídeos unicelulares pedunculados. Estes conídeos uninucleados apresentam dimorfismo térmico e dão origem a colônias leveduriformes a 37°C e micelianas a 26°C (RESTREPO *et al.*, 1988). As leveduras de *P. brasiliensis* são muito ativas metabolicamente, e várias enzimas (fosfatases, esterases, dehidrogenases e trifosfatases) são produzidas durante o crescimento fúngico (PUCCIA *et al.*, 1998 e 1999). A transformação de conídeo para levedura se inicia a 28°C, mas as múltiplas gemulações são mais notáveis a 37°C (BRUMMER *et al.*, 1993). De acordo com SAN-BLAS (1991) esta transformação requer um estrito controle da síntese de glucana e, *in vivo*, a α -glucana é o principal polissacarídeo da parede da levedura, enquanto que os polímeros de β -glucanas são as únicas glucanas presentes na parede das estruturas micelianas.

Embora seja aceito que o habitat natural de *P. brasiliensis* é de origem exógena, o nicho ecológico preciso ainda não está totalmente esclarecido (RESTREPO, 1985). Apesar de já ter sido isolado do solo (De ALBORNOZ, 1971), outras tentativas desta natureza falharam. Porém, as características ecológicas de áreas endêmicas e dados laboratoriais sugerem que o microambiente do fungo seja úmido. Baseado no fato de que a maioria dos pacientes uruguaios com PCM são lenhadores em florestas nativas, levantou-se a hipótese de que animais aquáticos heterotérmicos fossem reservatórios e aves que se

alimentassem destes animais tivessem disseminado o fungo na natureza por excreção ou regurgitação (CONTI DÍAZ; RILLA, 1989). De qualquer maneira, os indivíduos que apresentam prevalência da doença são aqueles envolvidos com atividades rurais (BRUMMER *et al.*, 1993). Além disto, o fungo já foi evidenciado por cultura ou levantamentos sorológicos em animais selvagens ou domésticos como tatus e cães. Portanto, acredita-se que o microhabitat do *P. brasiliensis* possa ser solo úmido, próximo a rios, lagos e pântanos. (BAGAGLI *et al.*, 2003; TERÇARIOLI *et al.*, 2005; CONTI DÍAZ, 2007).

2.2 ASPECTOS GERAIS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A PCM é uma micose sistêmica, geograficamente restrita a regiões tropicais e subtropicais da América do Sul e América Central, sendo considerada uma doença endêmica em algumas regiões do Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina (SAN BLAS, 1993; BLOTTA *et al.*, 1999). A apresentação clínica e desenvolvimento da doença variam de paciente para paciente, podendo-se observar desde uma infecção subclínica até casos fatais (FRANCO *et al.*, 1987b). A infecção tem início com a inalação de propágulos miceliais, que rapidamente passam à fase leveduriforme nos pulmões. Em indivíduos imunocompetentes, pode ocorrer a infecção subclínica, onde lesões parcialmente calcificadas ou residuais são observadas ou o foco primário desaparece totalmente, apesar de permanecer a “memória” imunológica do hospedeiro (FRANCO *et al.*, 1987a; BRUMMER *et al.*, 1993; MARQUES, 2003). A doença pulmonar inicial também pode disseminar-se via linfática ou hematogênica, atingindo outros órgãos, principalmente mucosas, pele, linfonodos, fígado, baço e glândulas adrenais. Apesar de o acometimento ocorrer principalmente nos órgãos anteriormente citados, outros podem ser atingidos, incluindo o sistema nervoso periférico, fato apresentado especialmente em pacientes imunossuprimidos pelo vírus HIV (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1995; MARQUES, 2003; FAGUNDES-PEREYRA *et al.*, 2006).

Existem duas formas clínicas da doença reconhecidas pelo Comitê Internacional de PCM: uma forma aguda ou subaguda e outra crônica uni ou multifocal. A forma aguda ou subaguda afeta pacientes mais jovens de ambos os sexos, envolvendo principalmente o sistema reticuloendotelial (CASTRO; DEL NEGRO, 1976; MENDES, 1994), e representa somente três a cinco por cento dos casos (BRUMMER *et al.*, 1993), enquanto que a forma crônica apresenta maior prevalência em homens adultos, com

acometimento predominantemente em pulmões e tecidos mucocutâneos (CASTRO; DEL NEGRO, 1976; MENDES, 1994). É importante ressaltar que a forma aguda é mais grave, e os pacientes geralmente apresentam a imunidade celular deprimida, levando a um prognóstico ruim. Ocorre hipertrofia de baço, fígado e linfonodos, além de disfunção da medula óssea, sendo facilmente confundida com uma doença linfoproliferativa em disseminações graves. A análise de biópsias mostra um grande número de leveduras gemulantes sem a formação de granulomas (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Nesta forma da doença, os pulmões dificilmente contêm o foco primário da infecção ou apresentam manifestações clínicas e radiológicas, apesar das secreções pulmonares resultarem em diagnóstico positivo para a presença do fungo, indicando que também estão envolvidos (BRUMMER *et al.*, 1993; BENARD *et al.*, 1995).

Noventa por cento dos pacientes com PCM manifestam a forma crônica. Esta doença possui progressão lenta e pode demorar meses ou anos para estabelecer-se totalmente. Nesta forma, 90% dos pacientes possuem manifestações clínicas pulmonares evidentes, e em aproximadamente 25% dos casos os pulmões constituem os únicos órgãos clinicamente acometidos, sendo considerados unifocais. Contudo, muitas vezes o envolvimento pulmonar é silencioso, e clinicamente o paciente apresenta lesões extrapulmonares multifocais (FRANCO *et al.*, 1987b; MANNIS *et al.*, 1996). As manifestações clínicas incluem tosse, expectoração, falta de ar, perda de peso, febre e anorexia. Exames radiográficos pulmonares revelam lesões nodulares, infiltrativas, fibróticas ou cavitárias, geralmente bilaterais, no centro ou nas porções inferiores dos pulmões. Estas manifestações assemelham-se àquelas provocadas pela tuberculose, e em 10% dos casos as duas infecções coexistem (LONDERO; RAMOS, 1990). Na forma crônica multifocal os sintomas variam de acordo com o órgão ou sistema acometido. Nestas situações, as lesões mais comuns ocorrem na mucosa naso-faríngea, pele, linfonodos e glândulas adrenais e, menos freqüentemente, verifica-se o envolvimento ocular, do sistema nervoso central, ósseo, vascular e genital (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2006). Dependendo das condições gerais do paciente e de seu estado imunológico, a doença crônica pode ser leve, moderada ou grave. Independentemente do órgão acometido, a cura da PCM evolui para fibrose, e esta seqüela pode interferir no funcionamento do órgão de forma permanente. Sessenta a 80% dos pacientes ficam com dispnéia e restrições cardiopulmonares. Disfonia e estenose de glote e traquéia associadas a disfonia também são comuns (BRUMMER *et al.*, 1993; LACAZ, 1994; TOBÓN *et al.*, 2003).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *P. BRASILIENSIS*

Os principais fatores de virulência envolvidos na PCM estão relacionados a uma proteína ligadora de estrogênio (PLE), constituintes α -1,3-glucana e β -glucana da parede celular, e o antígeno extracelular, a glicoproteína específica gp43 (HOGAN *et al.*, 1996).

A PCM, na forma crônica, é 13 a 87 vezes mais comum em homens do que em mulheres, apesar dos testes cutâneos em áreas endêmicas comprovarem uma equivalência de contato com o fungo entre os sexos (STEVENS, 1989 apud HOGAN *et al.*, 1996). Com a evidência de que a doença ocorre com a mesma frequência entre os sexos antes da puberdade, investigações a respeito do efeito hormonal de hospedeiros mamíferos sobre a patogenicidade de *P. brasiliensis* levou à evidência de que o hormônio 17β -estradiol (E2) inibe a transição da fase filamentosa para a fase leveduriforme do fungo sem, porém, afetar a transição inversa ou o crescimento e gemulação leveduriformes. Também foi reportada a existência de uma PLE de alta afinidade, presente no citosol da fase leveduriforme do fungo. Os sítios de alta-afinidade são sensíveis a temperaturas acima de 37°C e uma atividade de afinidade de ligação ligeiramente menor é encontrada no citosol da forma filamentosa, assim como um segundo sítio de baixa-afinidade de ligação ao estrogênio. A atividade da PLE do citosol miceliano demonstra uma afinidade muito maior a um análogo do estrogênio, o dietilestilbestrol (DES), quando comparada com a PLE do citosol leveduriforme. Apesar de o DES inibir a transição filamentosa-leveduriforme assim como o faz o E2, ele possui somente de 1 a 2% da potência de inibição da PLE (LOOSE *et al.*, 1983 apud HOGAN *et al.*, 1996). Esta inibição demonstrada pelo E2 é mediada em parte pela alteração da síntese protéica e em parte pela alteração da utilização de metionina (STOVER *et al.*, 1986 apud HOGAN *et al.*, 1996). Desta maneira, acredita-se que o hormônio E2 circulante em mulheres adultas retarda ou inibe a transição de partículas infectantes à forma parasitária leveduriforme e a PLE age como um fator “negativo” de virulência, desde que a sua presença altera profundamente o surgimento da infecção em uma população de mulheres adultas relativamente resistentes (HOGAN *et al.*, 1996).

Os constituintes de parede fúngica α -1,3-glucana e β -1,3-glucana também estão associados à regulação da transição dimórfica de *P. brasiliensis*. Sabe-se que uma quantidade reduzida de α -1,3-glucana na parede celular da fase leveduriforme está frequentemente relacionada a uma baixa virulência, apesar de alguns mutantes avirulentos

ainda apresentarem níveis de α -1,3-glucana comparáveis aos de isolados selvagens. Culturas seriadas *in vitro* de isolados virulentos de *P. brasiliensis* resultam em uma diminuição da quantidade de α -1,3-glucana da parede, de paredes celulares mais finas e de perda da virulência em vários modelos animais (HOGAN *et al.*, 1996). Estas características são readquiridas, ao se realizar a passagem da cepa por animais ou promover o seu crescimento *in vitro* com meio enriquecido com soro bovino fetal. Pelo fato da α -1,3-glucana ser encontrada na região externa da parede celular, especulou-se a hipótese dele desempenhar um papel de proteção contra a defesa do hospedeiro. O baixo conteúdo de α -1,3-glucana pode servir para revelar a β -glucana na parede celular ou pode alterar a proporção relativa dos polissacarídeos da parede. As β -glucanas são consideradas um importante imunomodulador da resposta inflamatória do hospedeiro (SAN-BLAS; SAN-BLAS, 1977 apud HOGAN *et al.*, 1996). A injeção intraperitoneal de frações contendo β -glucana tanto de isolados virulentos como avirulentos induz influxo celular dose-dependente, assim como a injeção de β -glucana purificada de ambos os isolados resulta em uma curva de indução de produção de fator de necrose tumoral (TNF) idênticas. Desta forma, evidencia-se que a β -glucana, assim como outros componentes da parede celular fúngica, desempenham, no hospedeiro, papéis de modulação das citocinas e da resposta inflamatória característica, que é observada na PCM (HOGAN *et al.*, 1996).

Além dos componentes fúngicos citados anteriormente, diversos componentes extracelulares e metabólitos liberados por células leveduriformes de *P. brasiliensis* como as já citadas gp43, gp55, gp72 e o glicoconjugado de alta-MM podem estar envolvidos na patogênese da infecção fúngica (PUCCIA *et al.*, 1986; SUGIZAKI *et al.*, 1999; MARQUEZ *et al.*, 2005). Dentre estes, a gp43 é considerada um importante fator de virulência de *P. brasiliensis*. Esta glicoproteína pode ser purificada a partir do sobrenadante de cultura do fungo, apresenta atividade de proteinase em pH ácido (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991) e a expressão desta glicoproteína depende do isolado analisado, sendo algumas vezes restrita à fase leveduriforme (MATTAR-FILHO *et al.*, 1997).

STRAUS *et al.* (1996), demonstraram que a gp43 é encontrada na superfície celular e extracelular do fungo e estocada dentro de vesículas densas, que se difundem através da membrana plasmática e passam da membrana celular para a parede celular, sendo finalmente secretadas no espaço extracelular como material denso e livre de membrana. A gp43 age como um receptor de laminina, o que propõe ser responsável pela adesão das leveduras de *P. brasiliensis* às células da membrana basal do hospedeiro e conseqüentemente

pela invasão de células hospedeiras que expressam receptores de laminina (VICENTINI *et al.*, 1994). Além disto, existem evidências de que a gp43 possa estar relacionada a um mecanismo de escape do fungo para a instalação da infecção primária, já que promove a inibição da função de fagocitose de macrófagos (POPI *et al.*, 2002). Esta glicoproteína tem sido utilizada no diagnóstico de PCM, sendo reconhecida por 100% dos pacientes testados por *immunoblotting* (CAMARGO *et al.*, 1989; TABORDA; CAMARGO, 1993 e 1994). Uma proteína de 38-kDa é obtida como resultado da deglicosilação da gp43 com ácido trifluorometanosulfônico. Esta proteína mantém a reatividade a anticorpos monoclonais direcionados contra a gp43 de *P. brasiliensis* (PUCCIA; TRAVASOS, 1991).

2.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO

A despeito de qualquer tipo de infecção, a imunidade humoral e celular de um indivíduo, quando equilibrada, garante uma resposta adequada à grande variedade de patógenos com os quais se pode entrar em contato. Dependendo do tipo de microorganismo infectante, a imunidade humoral pode desempenhar um papel mais marcante na defesa do hospedeiro do que a imunidade celular e vice-versa. Na PCM, estudos epidemiológicos desenvolvidos através de testes intradérmicos com paracoccidioidina (FRANCO *et al.*, 1987a) ou reações imunológicas para detecção de IgG específica em humanos e cães (ONO *et al.*, 2001; BOTTEON *et al.*, 2002) mostram que a exposição ao fungo resultante em infecção subclínica é alta na população adulta, variando de 11,2% a 87%, sendo que a maioria dos indivíduos infectados encontram-se em regiões rurais (WANKE; LONDERO, 1994). Contudo, a maioria destes indivíduos não desenvolve a PCM doença (FRANCO *et al.*, 1987a). Nesta patologia, assim como em outras micoses profundas que causam doença pulmonar e apresentam parasitismo intracelular (HANNA *et al.*, 2000), a resistência à infecção depende principalmente da imunidade celular do indivíduo (BURGER *et al.*, 1996; CALICH *et al.*, 1998; POLONELLI *et al.*, 2000). De maneira geral, as funções da imunidade celular estão preservadas em casos menos graves e a imunidade humoral também está preservada nos pacientes com PCM (BRUMMER *et al.*, 1993). No entanto, a disseminação da infecção e casos mais severos está relacionada com a disfunção ou supressão da resposta celular e ativação policlonal de linfócitos B (ARANGO; YARZÁBAL, 1982; SINGER-VERMES *et al.*, 1993; BENARD *et al.*, 1995; MELLO *et al.*, 2002).

Como a depressão da imunidade celular é um achado comum em pacientes com PCM e possui forte correlação com a forma aguda progressiva da doença, foi levantada a hipótese de que esta imunossupressão fosse causada pela própria infecção, contribuindo para o sucesso do patógeno no processo infeccioso (BENARD *et al.*, 1995; BURGER *et al.*, 1996; SUGIZAKI *et al.*, 1999). Um poderoso argumento em defesa desta hipótese é que o desajuste na imunidade celular é reversível quando a terapia específica demonstra sucesso. Este desequilíbrio imunológico pode ser decorrente de fatores inibitórios e imunocomplexos não identificados no plasma do paciente até inadequação no desempenho dos linfócitos T (CHEQUER-BOU-HABIB *et al.*, 1989; BRUMMER *et al.*, 1993; SUGIZAKI *et al.*, 1999).

O efeito de células polimorfonucleares neutrófilos (PMN) inflamatórias ou ativadas na digestão de *P. brasiliensis* ainda não está totalmente determinado. Monócitos e macrófagos permitem a replicação de *P. brasiliensis* fagocitados, mas quando os macrófagos são ativados por interferon gama (IFN- γ), ocorre uma inibição significativa (65 a 95%) da replicação intracelular de partículas fagocitadas (BRUMMER *et al.*, 1993; CANO *et al.*, 1998; KURITA *et al.*, 1999; PINA *et al.*, 2006). Isto sugere que o IFN- γ tem um importante papel na resistência humana à PCM. Diversas citocinas e sua relação com o curso desta doença têm sido estudadas. O IFN- γ e o fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF) estão relacionados com a proteção contra a infecção. As interleucinas-4 e 5 (IL-4 e IL-5) com a disfunção da resposta imune celular para padrão de resposta Th2 e a IL-10 com a inibição da ativação de células T (KURITA *et al.*, 2000; McBRIDE *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2007).

Segundo Mota *et al.* (1988) existe uma possível relação entre a redução da relação CD4/CD8 e a depressão na imunidade celular de indivíduos com PCM. Na forma aguda, esta diminuição na relação CD4/CD8 foi clara (média 1,2; variando entre 0,7 a 1,5) quando comparada com as relações de indivíduos saudáveis (média 1,9; variando entre 1,5 a 2,4). Na forma crônica da doença não está bem clara a associação com a relação CD4/CD8. Em estudos feitos por Tapia *et al.* (1991) e Bava *et al.* (1991), células mononucleares de pacientes com PCM estimuladas por interleucina-2 (IL-2) produziram IFN abaixo do normal. Esta constatação sugere que em pacientes com PCM existem alterações tanto nas subpopulações de linfócitos quanto na sua capacidade de produzir citocinas regulatórias (BRUMMER *et al.*, 1993).

Na PCM, a produção específica de anticorpos durante o curso da doença está diretamente relacionada à gravidade da mesma (BIAGIONI *et al.*, 1984). Em pacientes sem

tratamento, o nível de IgG tende a estar elevado e o nível de imunoglobulina M (IgM) tende a estar normal. Observa-se uma elevação no nível de IgE em pacientes que apresentam depressão da imunidade celular (BISELLI *et al.*, 2001). Comparando-se os níveis séricos de IgG contra a gp43, em pacientes com PCM, observa-se que aqueles manifestando a forma aguda apresentam níveis mais elevados do que pacientes com a forma crônica (BAIDA *et al.*, 1999). Contudo, os níveis da subclasse IgG1 são comparáveis entre as duas formas clínicas. O isotipo IgG4, regulado pela IL-4, é detectado em todos os pacientes com a forma aguda, que demonstram níveis mais baixos da subclasse IgG2 quando comparados aos níveis desta classe de IgG em pacientes crônicos. Somente 12% dos pacientes com forma aguda apresentam valores elevados de IgG2. Em contrapartida, somente 12% dos pacientes com a PCM crônica, apresentam baixos níveis de IgG4, em contraste aos altos níveis de IgG2, que foi observada elevada em 41% dos pacientes manifestando esta forma da doença. A subclasse IgG3 é detectada em baixos níveis ou não é detectada em ambas as formas clínicas da PCM. Embora dados sobre alterações no nível sérico de imunoglobulina A (IgA) não sejam conclusivos, esta classe de imunoglobulina é evidenciada alterada principalmente na forma adulta crônica, possivelmente como um resultado do estímulo antigênico crônico nas mucosas, que é característico desta forma clínica (BARBOSA *et al.*, 1981; BAIDA *et al.*, 1999). A análise de IgA secretora (IgAs) em salivas de pacientes com PCM, comparada a doadores saudáveis, demonstra alto nível de IgAs no primeiro grupo sugerindo que esta imunoglobulina possa desempenhar um papel protetor ao neutralizar antígenos na superfície das mucosas (MIURA *et al.*, 2001).

Em decorrência da ativação policlonal de linfócitos B e conseqüente hipergamaglobulinemia, a produção de IgE em micoses profundas foi investigada, e tem sido relacionada com a gravidade da doença (ARANGO; YARZÁBAL, 1982; HOSTETLER *et al.*, 1993; MAMONI *et al.*, 2001; BISELLI *et al.*, 2001). A elevação da concentração de IgE tem sido associada ao predomínio de células Th2 e produção de IL-4 (BISELI *et al.*, 2001) ao invés da prevalência de células T-helper 1 (Th1) e secreção de IFN- γ . Evidências experimentais sugerem que a resistência ou susceptibilidade à PCM, em humanos, possa estar associada a um padrão Th1 ou Th2 de citocinas, respectivamente (CALICH; KASHINO, 1998; CANO *et al.*, 1998). Pacientes com a forma aguda apresentaram níveis significativamente mais elevados de IgE se comparados aos níveis encontrados em pacientes crônicos (MAMONI *et al.*, 2001), sustentando a evidência de que a produção de IgE está relacionada à maior gravidade da doença. Hosteler *et al.* (1993), ao estudar o efeito da IL-4, IFN- γ e um antifúngico triazólico (SCH) na PCM e suas correlações com os níveis de IgE,

observaram que no modelo animal apresentando quadro subagudo ocorreu a produção inicial de IL-4 e IFN- γ pelas células dos linfonodos; no modelo de infecção progressiva aguda, IL-4 foi secretada, mas não IFN- γ , e no modelo crônico, no qual a eficácia do SCH contra *P. brasiliensis* é comprovada, existiu um possível sinergismo entre a imunomodulação (IFN- γ) e a terapia antifúngica com SCH. Os mesmos observaram que o tratamento com anti-IL-4 na fase aguda resulta em um aumento da resistência do hospedeiro à infecção, que é correlacionada ao decréscimo dos níveis séricos de IgE.

Assim como o desequilíbrio da imunidade celular na PCM tem sido associado à ativação policlonal de linfócitos B e ao aumento dos níveis de IgE, também pode estar associado à presença de IC circulantes. A composição destes IC é, em sua maioria de IgG e IgM, com baixa afinidade à vários antígenos irrelevantes como actina, mioglobina, DNA e TNP-ovoalbumina. Dois polipeptídeos (43 e 62-kDa) são observados nestes imunocomplexos (UNTERKIRCHER *et al.*, 1996). Como a gp43 é uma glicoproteína encontrada livre no soro, urina, líquido cerebrospinal e lavado broncoalveolar de pacientes com PCM (MIURA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004a) e é considerado um antígeno imunodominante nesta patologia, é esperado que ela participe da formação destes IC. Já a molécula de 62-kDa, também derivada do fungo, pode apresentar epítomos comuns aos da molécula de 43-kDa, sendo portanto, reconhecida pelos anticorpos monoclonais. Além dessas evidências, sugere-se que os IC encontrados na PCM variem em tamanho, composição ou na natureza de antígenos e anticorpos constituintes (UNTERKIRCHER *et al.*, 1996). Embora ainda não muito abordado em PCM, a relação de IC com a regulação e modulação da resposta imune tem sido investigada em outras patologias como o lupus, a artrite reumatóide, doenças atópica, malária e hepatites virais (DE CLERCK *et al.*, 1989; SANG AE KIM *et al.*, 1990; CARINI *et al.*, 1991; MILLAUER *et al.*, 1999; NYAKERIGA *et al.*, 2003; ARORA *et al.*, 2007). Um dos principais mecanismos para a retirada de IC da circulação se baseia na ligação destes imunocomplexos ao receptor CR1 de eritrócitos, impedindo que os IC se depositem nos tecidos ou facilitem a ativação inadequada de leucócitos na circulação (LINDORFER *et al.*, 2001; BIRMINGHAM; HEBERT, 2001). Teixeira *et al.* (2001) demonstraram que em pacientes com PCM ativa ou que receberam tratamento por períodos diminuídos apresentavam um aumento nos níveis de IC no soro, diminuição da relação de células T CD4/CD8 e níveis reduzidos de CR1 eritrocitários e, que estas alterações eram reversíveis após tratamento adequado, sugerindo que a redução de CR1 eritrocitário nestes pacientes faz parte da patogênese da PCM.

Além de complexo imune Ig-Ag, em algumas patologias pode se observar a produção de IgG anti-IgE formando complexo IgG-IgE (DAËRON et al. 1995, MACGLASHAN et al. 1997, VASSELLA et al., 1990). A presença deste complexo pode ou não afetar a dosagem de IgE (VASSELLA et al., 1990, TWENA et al., 1989) bem como interferir na síntese de IgE ((DAËRON et al. 1995, MACGLASHAN et al. 1997). Assim, considerando a sua importância e a inexistência de dados sobre CI IgG-IgE na PCM, no presente trabalho foi introduzida a análise de nível deste complexo na PCM aguda e crônica.

2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Apesar das manifestações clínicas, o diagnóstico definitivo da PCM é obtido por procedimentos laboratoriais. Para estes fins, pode-se realizar desde a pesquisa direta do fungo até a pesquisa de antígenos ou anticorpos por diversas metodologias, que irão apresentar sensibilidade e especificidade variáveis (BRUMMER *et al.*, 1993). Amostras de escarro, lavado broncoalveolar, material da base de lesões granulomatosas ou dos bordos das úlceras, pus drenados de linfonodos, fluido cerebrospinal ou amostras de biópsia de tecidos podem ser utilizados para a pesquisa direta, isolamento e identificação de *P. brasiliensis*. A microscopia direta é o meio mais rápido de detectar elementos fúngicos nos espécimes clínicos, que se apresentarão na forma característica de leveduras globosas com múltiplas gemulações em base estreita. Uma variedade de procedimentos e colorações (KOH, calcofluor e imunofluorescência) pode ser utilizada com este propósito. Exames histopatológicos corados por hematoxilina-eosina, Papanicolau, ácido periódico de Schiff ou imunofluorescência indireta também podem ser aplicados para revelar processos granulomatosos em tecidos infectados (BRUMMER *et al.*, 1993; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

P. brasiliensis foi isolado pela primeira vez em cultura por Lutz (1908). A cultura do fungo a partir de amostras biológicas é mais eficaz se for utilizado meio de isolamento (Sabouraud) acrescido de inibidores de fungos saprófitas e agentes antibacterianos, já que normalmente estes materiais clínicos são bastante contaminados por microbiota não patogênica, que interfere e compete com o crescimento de *P. brasiliensis*. O crescimento é lento (20 a 30 dias) e resulta em colônias micelianas à temperatura ambiente (25°C), que podem demonstrar uma variedade de características, sendo indistinguíveis de

outros fungos saprófitas. A comprovação do dimorfismo é essencial para identificar o fungo, que à 37°C se apresenta na fase leveduriforme característica.

A reação de fixação de complemento foi um dos primeiros imunodiagnósticos utilizados em micoses profundas (MOSES, 1916 apud BRUMMER *et al.*, 1993). A partir de então, vários estudos sobre o uso de métodos imunológicos para o diagnóstico da PCM têm sido publicados. Apesar da variedade de metodologias disponíveis, os dados mostram que testes diferentes nem sempre demonstram os mesmos resultados para o mesmo soro. Conseqüentemente, aconselha-se empregar mais do que um teste para o diagnóstico laboratorial sorológico. Como a imunidade humoral dos pacientes com PCM não se apresenta deficiente, a produção de anticorpos específicos é observada em 90% dos pacientes com a doença clínica no momento do diagnóstico. Além disto, o acompanhamento dos níveis de anticorpos por testes sorológicos também auxiliam na análise prognóstica da PCM (BRUMMER *et al.*, 1993).

Apesar dos testes de imunodifusão em ágar e contraímuno eletroforese serem amplamente empregados devido a sua simplicidade, confiabilidade e versatilidade, uma pequena porcentagem de pacientes pode apresentar níveis baixos ou ausência de anticorpos detectáveis por estas técnicas (DEL NEGRO *et al.*, 1991 e 1995). Este teste pode ser utilizado tanto para triagem quanto para diagnóstico. Seus valores de sensibilidade variam entre 89 e 91% e apresenta 100% de especificidade, o que resulta em 100% de valor preditivo positivo. Contudo, sua sensibilidade para a detecção de antígenos circulantes chega a ser 1000 a 100 vezes menor do que àquela de ensaios imunoradiométricos (BRUMMER *et al.*, 1993).

Em estudo comparando metodologias como imunofluorescência, fixação de complemento, contraímuno eletroforese e ELISA, a maior eficiência foi encontrada em ELISA IgG e IgA anti-gp43 (BUENO *et al.*, 1997). Os ensaios imunoenzimáticos apresentam valores variáveis, mas de alta sensibilidade. Contudo, as diferentes preparações antigênicas empregadas (parcialmente purificadas ou extratos totais) tornam difícil a comparação de resultados. Vários antígenos como gp27, gp87, glicolipídeos já foram testados, sendo que a gp43 ainda persiste como o principal e mais eficiente antígeno para detecção de IgG específica da PCM (BLOTTA; CAMARGO, 1993; TOLEDO *et al.*, 1995; ORTIZ *et al.*, 1998). Díez *et al.* (2003) sugere que o uso combinado de diferentes antígenos de *P. brasiliensis* pode melhorar a performance do diagnóstico laboratorial da PCM. Além disto, as reações cruzadas têm sido observadas, principalmente com histoplasmose e lobomicose. Em alguns dos estudos realizados, a adsorção prévia do soro com extratos de *H. capsulatum* melhoraram a especificidade (BRUMMER *et al.*, 1993). Contudo, em outro estudo realizado por

Albuquerque *et al.* (2005) foi evidenciado que o tratamento de gp-43 com metaperiodato de sódio, a absorção do soro com antígenos de *Candida albicans* ou *Histoplasma capsulatum* e a diluição do soro em galactose (o maior epítipo comum entre fungos patogênicos) não foram eficientes em eliminar todas as possíveis reações cruzadas para a obtenção de um ELISA mais específico para o diagnóstico de PCM. A detecção de IgE específica pode ser uma importante ferramenta no diagnóstico da PCM, especialmente para pacientes com a forma aguda da doença. Porém, existe certa dificuldade em se detectar anticorpos IgE específicos por técnicas simples e sensíveis. Muitas vezes, a presença de grande quantidade de IgG específica leva à uma inibição competitiva da ligação de IgE a determinantes antigênicos em ensaios como o ELISA indireto. Isto pode ser resolvido com o uso de ELISA de captura para IgE que apresenta maior sensibilidade diagnóstica do que ELISA indireto para este propósito (MAMONI *et al.*, 2001).

O uso de “Western-blotting” tem sido incorporado a estudos referentes à PCM. Esta técnica possibilita analisar a resposta imunológica humoral contra misturas complexas de antígenos de *P. brasiliensis*, e constitui um procedimento auxiliar no diagnóstico da PCM (ORTEGA, *et al.*, 1992). A técnica de “Western blotting” revela a heterogeneidade nas respostas imunológicas dos pacientes com PCM. Segundo Casotto (1990), a detecção concomitante dos antígenos de 58, 57 e 45-kDa de *P. brasiliensis* confirmaram o diagnóstico de PCM em 87% dos casos por ele estudados. CAMARGO *et al.* (1989) demonstraram, com esta técnica, que os principais componentes extracelulares do isolado B-339 são antígenos com 70, 52, 43 e 20-kDa. Nesta metodologia, os componentes celulares do fungo que são detectados podem ser obtidos por processos variados: Antígeno CFA (CAMARGO *et al.*, 1991), ExoAg (CAMARGO *et al.*, 1988) ou Antígeno Somático (BURGOS *et al.*, 1985). O principal antígeno derivado de preparações de cultura do fungo na fase leveduriforme é a glicoproteína de 43-kDa (gp43). Esta proteína é reconhecida em reações de *Western-Blotting* por 100% dos pacientes com PCM, seguida do reconhecimento de uma glicoproteína de 70-kDa (96% dos pacientes) (BRUMMER *et al.*, 1993). Blotta e Camargo (1993) demonstraram, também através de *Western blotting*, 100% de reatividade de IgG ao antígeno de 43-kDa e 45% ao antígeno de 70-kDa em pacientes com PCM aguda (AF-PCM), enquanto que os pacientes com PCM crônica (CF-PCM) demonstraram reatividade de 100% ao componente de 43-kDa e 35% ao de 70-kDa. Os anticorpos IgM de soros de pacientes com AF-PCM reagiram preferencialmente a componentes com massa molecular (MM) acima de 50-kDa (70% reage ao componente de 70-kDa).

Tentativas de detecção de antígenos circulantes em amostras clínicas de pacientes com PCM têm sido feitas no sentido de auxiliar no diagnóstico e acompanhamento terapêutico desta doença especialmente quando a resposta imune humoral está prejudicada como no caso de pacientes imunossuprimidos (GÓMEZ *et al.*, 1997). Várias técnicas de diferentes sensibilidades têm sido experimentadas: imunoeletrodifusão, inibição da hemaglutinação passiva, *immunoblotting* e ensaios radiométricos e enzimáticos (BRUMMER *et al.*, 1993). Estudos mostram que é possível determinar a presença de gp43 circulante no soro (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1989) e antígenos circulantes na urina de pacientes com PCM pré e pós-tratamento, por *immunoblotting* e ELISA de competição, sendo que é observada uma boa eficiência quando o *immunoblotting* é empregado (91,7%) e os antígenos gp43 e gp70 são detectados (SALINA *et al.*, 1998). Estudos que investigam a detecção de antígenos de 43-kDa, 70-kDa e 87-kDa por ELISA de inibição em soro e outros materiais clínicos como líquido cerebrospinal e lavado brocoalveolar pode funcionar como um importante marcador de acompanhamento terapêutico da doença (GOMEZ *et al.*, 1998; SILVIA *et al.*, 2004a, 2004b, 2005 e 2006).

A identificação de *P. brasiliensis* por biologia molecular através da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) com objetivos diagnósticos será um importante instrumento de rotina laboratorial a ser utilizado na PCM. Desde os relatos de Goldani *et al.* (1995) e Goldani e Sugar (1998) incluindo seqüências do gene da β -actina, outros estudos que envolvem técnicas de biologia molecular têm sido desenvolvidos na intenção de melhorar a precocidade do diagnóstico da PCM doença. O potencial uso de primers de seqüência de DNA de genes ribossomais (5.8S e 28S) foi estudado por Motoyama *et al.* (2000) e Imai *et al.* (2000) demonstrando alta sensibilidade e sugeriram que o uso de PCR duplo fosse mais eficaz para a identificação específica de *P. brasiliensis* utilizando um primer de cada gene ribossomal. Gomes *et al.* (2000) desenvolveram primers derivados da seqüência do gene codificador da gp-43 para a detecção do fungo no escarro e em um trabalho realizado por Bialek *et al.* (2000), a detecção de *P. brasiliensis* em amostras teciduais por *nested* PCR (PCRn) foi altamente sensível e específica (100%). Em estudo experimental em sangue de camundongos utilizando-se PCR para detecção do gene da gp43 foi demonstrada a positividade tanto em plasma como nos elementos figurados do sangue, sendo a maior freqüência observada no último caso (ITANO *et al.*, 2002). Apesar de esta metodologia oferecer maior sensibilidade diagnóstica do que métodos histológicos utilizados na rotina laboratorial, o polimorfismo no código genético da *gp43*, cuja seqüência tem sido analisada como uma provável região específica para amplificação, pode implicar em diminuição na

especificidade desta metodologia (MORAIS *et al.*, 2000; SAN-BLAS *et al.*, 2002). Mais recentemente, San-Blas *et al.* (2005) estudaram o diagnóstico molecular da PCM em escarro e líquido cefalorraquidiano empregando diversos primers no fragmento de 0.72-kb comum e específico a todas as cepas de *P. brasiliensis*, que por sua vez é gerado por PCR utilizando-se o primer aleatório OPG18 (Operon Biotechnologies). Neste estudo, o diagnóstico de reativação da doença precedeu o diagnóstico clínico, microbiológico e sorológico em uma ou mais semanas. Além disto, neste estudo também foi possível realizar o diagnóstico em líquido cefalorraquidiano de um paciente com acometimento do sistema nervoso central em uso de antifúngico cujos exames sorológicos e microbiológicos eram negativos.

Para a avaliação do estado geral e acompanhamento da evolução clínica são utilizados principalmente os seguintes testes laboratoriais complementares: hemograma completo, eletroforese de proteínas séricas e provas bioquímicas hepáticas e renais como a AST, ALT, γ GT, fosfatase alcalina, creatinina, Na e K (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). A eletroforese de proteínas consiste em um dos mais utilizados exames auxiliares e tem sido demonstrado que apesar dos níveis de proteínas totais persistirem dentro dos valores de referência normal, o simples fracionamento das proteínas séricas permite evidenciar uma diminuição nos níveis de albumina e aumento das frações alfa-1, alfa-2 e gama-globulinas enquanto que em alguns pacientes a fração de beta-globulinas pode estar reduzida. Geralmente, as alterações no perfil eletroforético de proteínas séricas correlacionam com a gravidade da doença, sendo freqüentemente mais elevados os valores de fração alfa-1, alfa-2 e gama-globulinas em pacientes com a forma aguda da PCM (MARTINEZ, 1994). Os níveis séricos de albumina e globulinas tendem a normalizar após aproximadamente seis meses de tratamento (RESTREPO *et al.*, 1978). Nogueira *et al.* (2006) verificaram que 70% das crianças com PCM avaliadas em seu estudo apresentaram inversão da relação albumina/globulinas, sendo que a diminuição nos níveis de globulinas já foi observada até o terceiro mês de tratamento e a normalização nos níveis de albumina até o sexto mês.

Portanto, a partir do que relata a literatura, estudos envolvendo IC e sua provável influência na patogênese e regulação da resposta imune do hospedeiro devem ser realizados para aprofundar esta área do conhecimento na PCM. Considerando a inexistência de dados correlacionando IC contendo IgG e IgE e sua possível relação com IgG e IgE totais e específicas na PCM aguda e crônica, neste trabalho, foram investigados os níveis séricos de IgG e IgE total e específicas, IC IgE-IgG e IC IgG-gp43 em soro de pacientes com PCM nas formas aguda e crônica. Além disto, para melhorar o auxílio diagnóstico da eletroforese de proteínas e, já que ainda existem dificuldades em se estabelecer rotinas sorológicas simples,

rápidas e com antígenos padronizados para o diagnóstico laboratorial da PCM, realizou-se a correlação das alterações observadas neste exame em pacientes com PCM aguda e crônica com a dosagem de IgG e IgE totais a fim de se observar a possibilidade de seu resultado fornecer um indicativo mais preciso a respeito do prognóstico do paciente ou da gravidade da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o padrão de resposta imune de imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina E (IgE) totais e específicas, assim como a presença de IC e o perfil eletroforético de proteínas séricas em pacientes com PCM aguda e crônica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Analisar o perfil eletroforético de proteínas séricas em pacientes com PCM aguda e crônica;

3.2.2 Analisar o nível sérico de IgG e IgE total por ELISA em soros de pacientes com PCM aguda e crônica;

3.2.3 Correlacionar os níveis séricos de IgG e IgE total com as frações do perfil eletroforético de proteínas séricas na PCM aguda e crônica;

3.2.4 Analisar nível sérico de IgG anti-ExoAg de *P. brasiliensis* em soros de pacientes com PCM na forma aguda e crônica por ELISA;

3.2.5 Analisar nível sérico de IgE anti-gp43 de *P. brasiliensis* em soros de pacientes com PCM na forma aguda e crônica por ELISA;

3.2.6 Analisar o nível sérico de IC IgG-IgE em soros de pacientes com PCM aguda e crônica por ELISA;

3.2.7 Analisar o nível sérico de IC IgG-gp43 em soros de pacientes com PCM aguda e crônica por ELISA;

3.2.8 Correlacionar os resultados de IgG e IgE total e específicos com os níveis séricos de IC IgG-IgE e IgG-gp43 em soros de pacientes com PCM aguda e crônica.

4 REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE C. F.; SILVA, S. H. M.; CAMARGO, Z. P. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington DC, v.43, n.4, p.1944-1946, 2005.
- APPLEQUIST S. E. *et al.* Antibody production in mice deficient for complement receptors 1 and 2 can be induced by IgG/Ag and IgE/Ag, but not IgM/Ag complexes. *J. Immunol.*, Baltimore, v.165, p.2398-2403, 2000.
- ARANGO, M.; YARZÁBAL, L. T-cell dysfunctional and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, Netherlands, v.79, p.115-124, 1982.
- ARORA, V. *et al.* Modulation of CR1 transcript in systemic lupus erythematosus (SLE) by IFN-gamma and immune complex. *Mol Immunol*, Oxford, v.44, n.7, p.1722-1728, 2007.
- BAGAGLI, E. *et al.* High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol*, Oxford, v.41, n.3, p.217-223, 2003.
- BAIDA, H. *et al.* Differential antibody isotype expression to major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infec.*, Paris, v.1, p.273-278, 1999.
- BARBOSA *et al.* Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioides brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.41, p.121-126, 1981.
- BAVA, A. J. *et al.* Lymphocyte subpopulations and citokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol. Immunol.*, Tokyo, v.35, p.167-174, 1991.
- BENARD, G. *et al.* Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 175, p. 1263-1267, 1997.
- _____; *et al.* Severe juvenile paracoccidioidomycosis in an adult. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.33, p.67-71, 1995.

BIAGIONI, L. *et al.* Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.78, p.617-621, 1984.

BIALEK, R. *et al.* Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.38, p.2940-2942, 2000.

BIRMINGHAM, D. J.; HEBERT, L. A. CR1 and CR1-like: the primate immune adherence receptors. *Immunol Rev*, Copenhagen, v.180, p.100-111, 2001.

BISELLI, P. J. C. *et al.* IgE antibody response to the main antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in patients with paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.*, Oxford, v.39, p.475-478, 2001.

BLOTTA, M. H. S. L.; CAMARGO, Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.31, n.3, p.671-676, 1993.

BLOTTA, M.H.S.L. *et al.* Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am. J. Trop. Hyg.*, Baltimore, v.61, n.3, p.390-394, 1999.

BOLUDA L. & BERRENS L. Do IgE-IgG complexes occur in the circulation? *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.100, p.145-150, 1995.

BOTTEON, F. A. G. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*- reactive antibodies in Brazilian blood donors. *Med. Mycol.*, Oxford, v.40, p.387-391, 2002.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington DC, v.6, n.2, p.89-117, 1993.

BUENO, J. P. *et al.* IgG, IgM and IgA antibody response for diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.35, p.213-217, 1997.

BURGER, E. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.55, p.391-398, 1996.

BURGOS, L. C.; CANO, L. E.; RESTREPO, A. Purification of somatic antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: Preliminary study. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.27, n.2, p.76-81, 1985.

CALICH, V. L.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, São Paulo, v.31, p.615-623, 1998.

_____; VAZ, C. A. C.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Res. Immunol.*, Amsterdam, v.149, n. 4-5, p.407-417, 1998.

CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C.; TRAVASSOS, L.R. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.27, p.407-412, 1989.

_____; *et al.* Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.26, p.2147-2151, 1988.

_____; *et al.* The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.29, p.31-38, 1991.

CANO, L. E. *et al.* Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.*, Bethesda, v.66, p.800-806, 1998.

CARINI, C.; FRATAZZI, C.; AIUTI, F. Evidence for IgE immune complexes and distribution of IgG subclasses with anti-IgE activity in patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*, Oxford, v.21, n.4, p.481-487, 1991.

CASOTTO, M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.28, n.6, p.1188-1193, 1990.

CASTRO, R. M.; DEL NEGRO, G. Particularidades clínicas da paracoccidioidomicose na criança. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.*, São Paulo, v.31, p.194-198, 1976.

CHEQUER-BOU-HABIB, D.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; GALVÃO-CASTRO, B. Immunossuppressive effect of paracoccidioidomycosis sera on the proliferative response of normal mononuclear cells. Identification of a *Paracoccidioides brasiliensis* 34-kDa polypeptide in circulating immune complexes. *Mycopathologia*, Netherlands, v.119, n.2, p.65-71, 1992.

_____; *et al.* The possible role of circulating immune complexes in the deficiency of cell-mediated immunity in paracoccidioidomycosis. *Braz J Med Biol Res*, São Paulo, v.22, n.2, p.205-212, 1989.

CONTI DÍAZ, I. A. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*. Our hypothesis of 1989: present status and perspectives. *Rev. Inst. Bras. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.49, n.2, p.131-134, 2007.

_____ & RILLA, F. D. Hipótesis sobre el nicho ecológico de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Med. Uruguay*, Montevideo, v.5, p.97-103, 1989.

CORREA M. M. *et al.* Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. *Mycoses*, Berlin, v.50, p.41-47, 2006.

COSTA, D. L. *et al.* Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated humans neutrophils. *Microbiol. Immunol.*, Tokyo, v. 51, n.1, p.73-80, 2007.

COUTINHO, Z. F. *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública.*, São Paulo, v.18(5), p.1441-1454, 2002.

DAËRON, M. *et al.* Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J Clin Invest*, New Haven, v.95, n.2, p.577-585, 1995.

DE ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia*, Edinbrugh, v.9, n.3, p.248-253, 1971.

DE CLERCK, L. S. *et al.* Humoral immunity and composition of immune complexes in patients with rheumatoid arthritis, with especial reference to IgE-containing immune complexes. *Clin Exp Rheumatol*, Pisa, v.7, n.5, p.485-492, 1989.

DEL NEGRO, G. M. B. *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.*, Abingdon, v.33, p.113-116, 1995.

_____; *et al.* The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.33, p.277-280, 1991.

DÍEZ, S. *et al.* Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington DC, v.41, n.4, p.1536-1542, 2003.

DIXON, D. M. *et al.* Development of vaccines and their use in the prevention of fungal infections. *Med. Mycol.*, Oxford, v.36, suppl. I, p.57-67, 1998.

FAGUNDES-PEREYRA W. J. *et al.* Paracoccidioidomicose do sistema nervoso central. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v.64, n.2-A, p.269-276, 2006.

FAVA, S. di C. & NETTO, C. F. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.40, n.3, p.155-164, 1998.

FRANCO, M. *et al.* Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.25, p.5-18, 1987a.

_____; *et al.* Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.20, p.129-132, 1987b.

GOLDANI, L. Z.; MAIA, A. L.; SUGAR, A. M. Cloning and sequence of a specific DNA fragment from *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.33, p.1652-1654, 1995.

GOLDANI, L. Z. & SUGAR, A. M. Use of a polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.58, p.152-153, 1998.

GOMES, G. M. *et al.* PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington DC, v.38, n.9, p.3478-3480, 2000.

GÓMEZ, B. L. *et al.* Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87-kilodalton determinant during and after antifungal therapy. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.36, p.3309-3336, 1998.

_____; *et al.* Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.35, p.3278-3283, 1997.

HANNA, S. A.; SILVA, J. L. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect.*, Paris, v.2, n.8, p.877-884, 2000.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington DC, v.9, n.4, p.469-488, 1996.

HOSTETLER, J. S. *et al.* Effect of anti-IL-4, interferon-gamma and an antifungal triazole (SCH 42427) in paracoccidioidomycosis: correlation of IgE levels with outcome. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.94, p.11-16, 1993.

IMAI T *et al.* A new PCR primer for the identification of *Paracoccidioides brasiliensis* based on rRNA sequences coding the internal transcribed spacers (ITS) and 5 x 8S regions. *Med. Mycol.*, Oxford, v.38, n.4, p.323-326, 2000.

ITANO, E. N. *et al.* Detection of the gp43 gene and (1→3)-β-D-glucan of *Paracoccidioides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice. *Jpn. J. Med. Mycol.*, Tokyo, v.43, p.29-35, 2002.

KIM, S. A. *et al.* Circulating immune complexes and cell-mediated immunity in patients with hepatitis B virus associated liver disease. *Yonsei Med. J.*, Seoul, v.31, n.4, p.347-357, 1990.

KURITA, N. *et al.* Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.*, Oxford, v.37, p.261-267, 1999.

_____; *et al.* Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.*, Oxford, v.38, p.177-182, 2000.

LACAZ, C. S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M. *et al.* *Paracoccidioidomycosis*. 1. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994. p.1-11.

_____; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Paracoccidioidomycose. In: *Micologia Médica*. 8. ed. São Paulo: Sarvier Editora, 1991. p.248-261.

LINDORFER, M. A. *et al.* Heteropolymer-mediated clearance of immune complexes via erythrocyte CR1: mechanisms and applications. *Immunol Rev*, Copenhagen, v.183, p.10-24, 2001.

LONDERO, A. T. & RAMOS, C. D. Paracoccidioidomicose: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. *J. Pneumol.*, Ribeirão Preto, v. 16, p.129-132, 1990.

LOOSE *et al*, 1983 apud HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington DC, v.9, n.4, p.469-488, 1996.

LUTZ, A. Uma micose pseudococcidia localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. *Bras. Med.*, Rio de Janeiro, v.22, p.121-124, 1908.

MACGLASHAN, D. W. JR. *et al*. Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J Immunol*, Baltimore, v.158, n.3, p.1438-1445, 1997.

MAENO, Y. *et al*. IgE deposition in brain microvessels and on parasitized erythrocytes from cerebral malaria patients. *Am. J. Med. Trop. Hyg.*, Baltimore, v.63, p.128-132, 2000.

MAMONI, R. L *et al*. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.65, n.3, p.237-241, 2001.

MANGIATERRA, M. L. *et al*. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in a subtropical region with important environmental changes. *Buul. Soc. Pathol. Exot.*, Paris, v.92, n.3, p.173-176, 1999.

MANNS, B. J. *et al*. Paracoccidioidomycosis: case report and review. *Clin. Infec. Dis.*, Chicago, v.23, p.1026-1032, 1996.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *An. Bras.Dermatol.*, Rio de Janeiro, v.78, n.2, p.135-150, 2003.

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.*, New York, v.19, p.199-204, 2005.

MARTINEZ R. Other laboratory tests: hematologic and biochemical changes. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del-Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. 1st ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 109-120, 1994.

MATTAR-FILHO, R. *et al.* Expression of glycoprotein gp43 in stage-specific forms and during dimorphic differentiation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.35, p.341-345, 1997.

McBRIDE, J. M. *et al.* IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell. Immun.*, New York, v.215, p.162-172, 2002.

McWEEN, J. G. *et al.* Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.25, p.165-175, 1987.

MELLO, L. M.; SILVA-VERGARA, M. L.; RODRIGUES JUNIOR, V. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high Interleukin-4 and Interleukin-5 production. *Human Immunol.*, New York, v.63, p.149-154, 2002.

MENDES, R. P. The gamut of clinical manifestations. In: FRANCO, M. *et al.* *Paracoccidioidomycosis*. 1. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994. p.230-259.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. *et al.* Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.27, p.2842-2845, 1989.

MILLAUER N. *et al.* High IgE in rheumatoid arthritis (RA) patients is complexed with anti-IgE autoantibodies. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.115, p.183-188, 1999.

MIURA, C. S. N. *et al.* Levels of specific antigen (gp43), specific antibodies and antigen-antibody complexes in saliva and serum of paracoccidioidomycosis patients. *Med. Mycol.*, Oxford, v.39, p.423-428, 2001.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M. *et al.* *Paracoccidioidomycosis*. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.131-142.

MORAIS F.V. *et al.* Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.*, Washington DC, v.38, p.3960-3966, 2000.

MOSES, 1916 apud BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington DC, v.6, n.2, p.89-117, 1993.

MOTA, N. G. *et al.* Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.26, n.2, p.105-111, 1988.

MOTOYAMA A. B. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.*, Washington DC, v.38, n.8, p.3106-3109, 2000.

NOGUEIRA A. G. S. *et al.* Aspectos laboratoriais evolutivos de crianças em tratamento da paracoccidioidomicose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.39, n.5, p.478-483, 2006.

NYAKERIGA M. A. *et al.* Immunoglobulin E (IgE) containing complexes induce IL-4 production in human basophils: effect on Th1-Th2 balance in malaria. *Act. Trop.*, Amsterdam, v.86, p.55-62, 2003.

ONO, M. A. *et al.* Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med. Mycol.*, Oxford, v.39, p.277-282, 2001.

ORTEGA, G. *et al.* Caracterizacion de antígenos *Paracoccidioides brasiliensis* inmunodiagnostico serologico mediante Western blotting. *Acta Cient. Venez.*, Caracas, v.43, p.355-359, 1992.

ORTIZ, B. L. *et al.* Use of the 27- Kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, Washington DC, v.5, p.826-830, 1998.

PEREIRA, R. M.; GUERRA-JÚNIOR, G.; TRESOLDI, A. T. Adrenal function in 23 children with paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Bras. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.48, n.6, p.333-336, 2006.

PINA, A. *et al.* Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J. Leucoc. Biol.*, New York, v.79, p.1202-1213, 2006.

POLONELLI L. *et al.* The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections. *Med. Mycol.*, Oxford, v.38, p.281-292, 2000.

POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophages functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell. Immunol.*, New York, v.218, p.87-94, 2002.

PUCCIA, R. *et al.* Detection of the basement membrane-degrading proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis* after SDS-PAGE using agarose overlays containing Abz-MKALTLQ-EDDnp. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, São Paulo, v.32, p.645-649, 1999.

_____; *et al.* Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. *Med. Mycol.*, Oxford, v.36, p.345-348, 1998.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. The 43kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.289, p.298-302, 1991.

_____; *et al.* Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect. Immun.*, Bethesda Md., v.53, p.199-206, 1986.

RAMOS, S. P. *et al.* Antigenuria and antigenemia in experimental murine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*, Oxford, v.43, n.7, p.631-636, 2005.

RESTREPO, A.; McWEEN, J. G.; SALAZAR, M. E. The mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Proc. X ISHAM Congress, 1988, Barcelona, Spain. *J. R. Prous. Science*, Barcelona, 1988. p.143-148.

_____; CANO, L. E.; OCHOA, M. T. A yeast-derived antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* useful for serological testing. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.23, p.23-29, 1985.

_____. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.23, p.323-334, 1985.

_____. *et al.* immune responses in paracoccidioidomycosis. A controlled study of 16 patients before and after treatment. *Sabouraudia*, Edinburgh, v.16, n.2, p.151-163, 1978.

SALINA, M. A. *et al.* Detection of circulate *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *J. Clin. Microb.*, Washington, v.36, p.1723-1728, 1998.

SAN-BLAS, G. Molecular aspects of dimorphism. In: ARORA, D. K.; AJELLO, A.; MUKERJI, K. G. *Handbook of applied mycology: humans, animals and insect. Fungi pathogenic to humans*. 1. ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1991. p.459-475.

_____. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.*, Oxford, v.31, p.99-113, 1993.

_____; SAN-BLASS, 1977 apud HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington DC, v.9, n.4, p.469-488, 1996.

_____; NINO-VEJA, G.; ITURRIAGA T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med. Mycol.*, Oxford, v.40, n.3, p.225-242, 2002.

_____ *et al.* Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.43, n.8, p.4255-4257, 2005.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Paracoccidioidomycosis in a renal transplant recipient. *J. Med. Vet. Mycol.*, Oxford, v.33, p.411-414, 1995.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Consenso em Paracoccidioidomicose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.39, n.3, p.297-310, 2006.

SILVA, S. H. M. *et al.* Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington DC, v. 41, n.8, p.3675-3680, 2003.

_____; *et al.* Monitoring gp43 antigenemia in paracoccidioidomycosis patients during therapy. *J. Clin. Microbiol.*, Washington DC, v. 42, n.6, p.2419-2424, 2004a.

_____; *et al.* Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. *J. Clin. Microbiol.*, Washington DC, v. 42, n.10, p.4480-4486, 2004b.

_____; *et al.* Diagnosis of neuroparacoccidioidomycosis by detection of circulating antigen and antibody in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.*, Washington DC, v.43, n.9, p.4680-4683, 2005.

_____; *et al.* Diagnosis of paracoccidioidomycosis by detection of antigen and antibody in bronchoalveolar lavage fluids. *Clin. Vaccine Immunol.*, Washington DC, v.13, n.12, p.1363-1366, 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.*, Oxford, v.94, p.75-79, 1993.

STEVENS, 1989 apud HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.9, n.4, p.469-488, 1996.

STOVER *et al.* 1986 apud HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.9, n.4, p.469-488, 1996.

STRAUS, A. H. *et al.* Immunochemical and sub cellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.34, p.181-186, 1996.

SUGIZAKI, M.F. *et al.* Correlation between antigenemia of *Paracoccidioides brasiliensis* and inhibiting effects of plasma inpatients with paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.*, Oxford, v.37, p.277-284, 1999.

TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunoblotting assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.32, n.2, p.554-556, 1994.

_____; _____. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen gp43. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.31, n.2, p.155-160, 1993.

TAPIA, F. J. *et al.* Leukocyte immunophenotypes in broncoalveolar lavage fluid and peripheral blood of paracoccidioidomycosis, sarcoidosis and silicosis. *Histol. Histopathol.*, Murcia, v.6, p.395-402, 1991.

TEIXEIRA, J. E. *et al.* Expression of complement receptor type 1 (CR1) on erythrocytes of paracoccidioidomycosis patients. *Mycopathologia*, Netherlands, v.152, n.3, p.125-133, 2001.

TERÇARIOLI, G. R. *et al.* Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: culture and molecular detection. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, São Paulo, v.47, suppl.14, p.63, 2005.

TWENA, D.M. *et al.* A survey of nonatopic and atopic children and adults for the presence of anti-IgE autoantibodies. *Clin Immunol Immunopathol*, New York, v.53, n.1, p.40-51, 1989.

TOBÓN, A. M. *et al.* Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after itraconazole therapy. *Clin. Infect. Dis.*, Philadelphia, v.37, p.898-904, 2003.

TOLEDO, M. S. *et al.* Glycolipids from *Paracoccidioides brasiliensis*. Isolation of a galactofuranose-containing glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.33, p.247-251, 1995.

UNTERKIRCHER, C. S. *et al.* Specific components found in circulating immune complexes (CIC) in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.34, p.273-277, 1996.

VASELLA, C. C.; DE WECK, A. L.; STADLER, B. M. Natural anti-IgE autoantibodies interfere with diagnostic IgE determination. *Clin Exp Allergy*, Oxford, v. 20, p.295-303, 1990.

VICENTINI, A. P. *et al.* Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect. Immun.*, Bethesda Md., v.62, p.1465-1469, 1994.

WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO, M. *et al.* *Paracoccidioidomycosis*. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.109-120.

**SERUM PROTEIN FRACTIONS PROFILE AND ITS CORRELATION WITH
TOTAL IgG AND IgE IN ACUTE AND CHRONIC PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS**

**PERFIL DAS FRAÇÕES DE PROTEÍNAS E SUA CORRELAÇÃO COM IgG E IgE
TOTAIS NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE AGUDA E CRÔNICA**

Audrey de Souza Marquez¹, Adriana Pardini Vicentini² & Eiko Nakagawa Itano³

¹ Department of Microbiology, Microbiology Doctorate Course, State University of Londrina – UEL, Campus Universitário, CEP 86051-970, Londrina, PR, Brazil.

² Immunology Section, Institute Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, 11º andar, CEP 012406-902, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brazil.

³ Department of Pathology Sciences, CCB, State University of Londrina, Campus Universitário, CEP 86051-970, Londrina, PR, Brazil.

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

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most important systemic mycosis in Latin America and is caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Altered plasma protein fractions profile and total IgG and IgE levels is observed in PCM disease. This work evaluated the serum protein fractions and its possible correlations with total IgG and IgE in acute and chronic PCM patients. Serum samples of 30 chronic (CF), 12 acute PCM patients' (AF) and 44 normal donors (NHS) were quantified by cellulose-acetate electrophoresis and total IgG and IgE were analyzed by ELISA. Additionally, high density lipoproteins (HDL) levels were analyzed by direct ultra-sensible enzymatic reaction. According to expected and described in the literature a low level of albumin in percentage results was observed in PCM. However, when albumin levels were analyzed in g/dL, normal levels were observed and HDL levels were slightly below normal limits. The increased levels of total IgG and IgE, more evident in AF than CF ($p < 0.05$) and also increased levels of alpha-2 and gamma-globulin fractions were observed in PCM in relation to NHS ($p < 0.05$). Pearson's correlation test revealed a more strong correlation between alpha-1 and beta or gamma-globulins ($r = 0.83065$ and $r = 0.82889$, respectively) in AF PCM. A weak correlation was observed between IgE and gamma-globulins fraction ($r = 0.6025$) and alpha-2 and beta globulins ($r = 0.64411$) in AF patients and between beta and gamma-globulins ($r = 0.6505$ and $r = 0.71424$, respectively) in both AF and CF groups. These findings reaffirm that plasma protein fractions profiles alters in PCM and demonstrate that there are positive correlations amongst globulin fractions and between gamma-globulins and total IgE levels. We have also concluded that there are differences in albumin results interpretation when expressed in percentages and absolute levels and that HDL probably does not contribute to alterations observed in alpha-1 globulins fraction in PCM patients. Both alterations on plasma electrophoretic profile and total IgG and IgE levels can be important markers for prognostic or even treatment follow-up in PCM,

especially electrophoresis for being a simple routine laboratory method that can be applied in regions where specific PCM serology is not easily available.

Keywords: serum protein electrophoresis profile, IgG, IgE, paracoccidioidomycosis.

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*¹. It is considered the most common systemic mycosis in Latin America and Brazil holds the major number of cases where it is regarded the eightieth cause of mortality by chronic illness and presents the highest mortality rate among the systemic mycosis². PCM disease presents two clinically distinguished forms: the acute or juvenile form (AF) and chronic or adult form (CF)³. The AF represents 3 to 5% of the cases and is characterized by a rapid clinical evolution with the presence of adenomegaly, hepatosplenomegaly, digestive disorders, osteo-articular involvement and cutaneous lesions. The CF attempts for more than 90% of the patients, especially males above 30 years old. The disease progresses slowly and silently for years and unifocal pulmonary affection is responsible for about 25% of the cases. The multifocal CF is more severe and involves skin, mucosa, pulmonary and ganglions manifestations⁴.

Serum protein electrophoresis is a simple laboratory exam that helps physicians to monitor the patient in the course of PCM. It has been already demonstrated that besides total serum proteins may persist in normal levels, the fractionation of the serum shows a decrease in albumin levels and an increase in alpha-1, alpha-2 and gamma-globulins fractions. The variations in these parameters are also more prominent in patients with the acute than the chronic form of the disease⁵.

Various studies have described that a Th1 immune response is related to protection against intracellular pathogens and fungi as *P. brasiliensis* whereas the prevalence of a Th2 response correlates with lower production of IFN- γ and more susceptibility to the fungus generating more severe PCM manifestations^{6, 7, 8}. The analysis of antibody isotype expression in AF and CF PCM demonstrated that the hypergammaglobulinemia in CF patients is due predominantly by the increase of total IgG and IgG2 subclass, IgG to h-MM *P. barsiliensis*

antigen and specific immunoglobulin A (IgA) to gp43, the major antigen of *P. brasiliensis*^{9, 10, 11}, while in the AF it occurs mainly by the presence of total IgG, IgG4 subclass and IgE^{9, 12, 13}. High levels of total IgE and IgE anti-gp43 have been correlated with polyclonal B lymphocyte activation and a more intense impairment of cellular immunity which is observed in the AF of the disease^{14, 15}. Cellulose-acetate electrophoresis is a simple procedure still used in clinical laboratory routine and there is a lack of recent literature concerning this information in PCM. Thus, in this study we have evaluated the levels and possible correlations amongst plasma protein fractions, HDL and total IgG and IgE in sera of acute and chronic PCM patients.

Material and methods

Serum samples

Serum samples were obtained from 30 chronic PCM patients (unifocal and multifocal disease) attended at Londrina State University Clinical Hospital (Londrina, Paraná [PR], Brazil) and 12 acute PCM patients (from the Mycosis Immunodiagnostic Laboratory of Institute Adolfo Lutz Immunology Section, São Paulo, São Paulo [SP], Brazil); 44 samples from healthy blood donors were selected and tested for previous contact with *P. brasiliensis* through specific ELISA and Radial Immunodiffusion Test (IDR) prior to their use as negative controls (NHS). All serum specimens analyzed were previously divided into aliquots and stored at -20°C until the moment of use. Informed consent was obtained from all subjects participating in this study, which was approved by the Internal Scientific Commission and the Committee of Bioethics in Research of Londrina State University (Londrina, PR, Brazil).

ELISA for total IgE

ELISA immunoplates were sensitized (100µL/well) with goat immunoglobulin fraction anti-human IgE (Sigma I-0632 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) at 16µg/mL in carbonate buffer, pH 9.6, for 1h at 37°C and then overnight at 4°C. After the plates were blocked with 5%-skim milk 0.5%-Tween PBS buffer and washed four times using 0.5%-skim milk 0.05%-Tween PBS washing solution, serum samples diluted 1:4 in 0.5%-skim milk PBS were added (100µL/well) and incubated for 2h at 37°C. The plates were washed with the same washing solution four times and incubated with goat alkaline-phosphatase anti-human IgE (Sigma A-3525 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted 1:500 (100µL/well) for 1h 30min at 37°C, followed by washing (four times) and the addition of mass/volume p-

nitrophenylphosphate in dietanolamine buffer, pH 9.8 (100 μ L/well). Following 30 min. incubation, the reaction was stopped with 50 μ L/well of NaOH 3M and the absorbance read at 405nm in a Multiskan EX reader (Labsystems, Helsinki, Finland). No significant background was observed in reaction controls. A standad curve was performed using different dilutions of a serum sample of known concentration in ng/dL.

ELISA for total IgG

ELISA immunoplates were sensitized (100 μ L/well) with rabbit immunoglobulin fraction anti-human IgG, dialyzed and purified in Sepharose-G protein column, at 40 μ g/mL in carbonate buffer, pH 9.6, for 1h at 37°C and then overnight at 4°C. After the plates were blocked with 5%-skim milk 0.5%-Tween PBS buffer and washed four times using 0.5%-skim milk 0.05%-Tween PBS washing solution, serum samples diluted 1:4 in 0.5%-skim milk PBS were added (100 μ L/well) and incubated for 2h at 37°C. The plates were washed with the same washing solution four times and goat anti-human IgG peroxidase conjugate (Sigma A-8775 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted 1:4000 (100 μ L/well) was added and incubated for 1h 30min at 37°C, followed by washing (six times) and the addition of 10mg OPD (orthophenylenediamine) in 25mL phosphate citrate buffer, pH 5.0, plus 10 μ L H₂O₂ 30% (100 μ L/well). Following 15 min. incubation, the reaction was stopped with 50 μ L/well of H₂SO₄ 4N and the absorbance read at 492nm in a Multiskan EX reader (Labsystems, Helsinki, Finland). Background interference evaluated through reaction controls was discounted in all absorbance results. A standad curve was performed using different dilutions of a serum sample of known concentration in mg/dL.

HDL quantification

Serum samples were analyzed by a commercial kit (Ebram Laboratory Products Ltda) using a direct ultra-sensitive colorimetric reaction with cholesterol oxidase in an automated equipment (Selectra E, Bayer SA).

Serum proteins electrophoresis

Serum samples were applied to cellulose acetate strips and the electrophoresis performed in Veronal-Sodic buffer, pH 8.6-8.8, for 25 minutes, followed by 10 min incubation in Ponceau S stain and discoloration in 5% Acetic Acid. All strips were dehydrated for 1 min in methanol PA and clarified for 3 min in 85% methanol-15% acetic acid solution, dried at 80°C for 2 min, read and digitalized by the computer program Glob-Al Scan II (Dynaware). The quantification of total proteins was performed by Biuret method and read in spectrophotometer at 545 nm.

Statistical Analysis

To statistical analysis, all variables were calculated in LOG10 values, except total IgE which was calculated in SQRT values and Pearson's correlation test was applied. Significance was defined as $p \leq 0.050$ and correlation by $r \geq 0.50$ though strong correlation should be considered when $r \geq 0.85$. For gamma-globulins fraction analysis amongst groups, a box-plot graphic was also performed in Bioestat statistical program.

Results

ELISA for total IgE

The results of ELISA for total IgE, expressed as optical densities (OD) and also in ng/dL, were 0.600 ± 0.123 / 72.45 ± 17.02 ng/dL in AF PCM patients, 0.369 ± 0.127 / 40.38 ± 17.63 ng/dL in CF PCM patients and 0.154 ± 0.073 / 10.64 ± 10.17 ng/dL in NHS. In the literature, reference values for total IgE in individuals above 10 years old is from zero to 33.6 ng/dL. Statistical analysis showed significant differences amongst all groups, $p < 0.05$ (Table 1).

ELISA for total IgG

The results of ELISA for total IgG, expressed as optical densities (OD) and also in mg/dL, were significantly higher in AF PCM (0.424 ± 0.122 / 1704 ± 255 mg/dL) than in CF PCM (0.298 ± 0.210 / 1440 ± 439 mg/dL) and NHS (0.243 ± 0.086 / 1325 ± 179 mg/dL), $p < 0.05$ (Table 1). Statistical analysis did not demonstrate significant difference between CF PCM and NHS groups for total IgG.

HDL quantification

The mean values for HDL in acute and chronic form PCM and NHS were 28.2 ± 7.89 mg/dL, 29.6 ± 10.45 mg/dL and 30.8 ± 8.52 mg/dL, respectively. In PCM patients sera mean results were slightly below reference normal limits (30 to 70 mg/dL). It was not observed any correlation between HDL and plasma proteins fractions in this study.

Serum proteins electrophoresis

The results of protein fractions, expressed in g/dL and resumed in Table 2, shows that the medium values for alpha-2 (1.03 ± 0.238) and gamma-globulins (1.70 ± 0.492) are elevated in CF PCM and total proteins (8.61 ± 1.228), alpha-1 (0.44 ± 0.192), alpha-2 (0.93 ± 0.128) and gamma-globulins (2.49 ± 0.785) are elevated in AF PCM patients' sera. When results were expressed in percentages, it was observed a decrease of albumin in both CF ($47.9\% \pm 6.66$) and AF PCM ($46.85\% \pm 8.11$), but it was not observed an increase in alpha-2 globulins ($10.9\% \pm 1.07$) in the AF PCM. The Albumin/Globulins ratio is lower in AF PCM (0.864) than in CF PCM (0.919) and NHS (1.359) (Table 2). The analysis of CF PCM patients classified according to the results of IDR demonstrated that only when IDR was greater or equal to 1/16, albumin fraction was diminished. Gamma-globulins results distributed in a box-plot graphic (Fig. 5) demonstrated that medium values (2.08 g/dL) for AF PCM patients' sera were significantly higher than CF PCM (1.18 g/dL) and NHS (1.00 g/dL). For AF PCM, Pearson's correlation test demonstrated stronger coefficients between alpha-1 and beta-globulins ($r = 0.8307$) and between alpha-1 and gamma-globulins ($r = 0.8289$), which was not observed in CF PCM or in NHS groups (Figures 1 and 2, respectively); and demonstrated a weak correlation between beta and gamma-globulins fractions ($r = 0.7142$), gamma-globulins and total IgE ($r = 0.6026$) as shown in figures 3 and 4, respectively. In CF PCM, it was obtained only a weak correlation between beta and gamma-globulins fractions ($r = 0.6506$) (Fig. 3).

Discussion

Most patients with active PCM demonstrate plasma proteins alterations which are revealed by a simple serum protein electrophoresis exam⁵. This laboratory test is usually used by physicians as an initial evaluation marker of the patient and to follow up treatment evolution and efficacy as its parameters tend to normalize after three to six months of treatment^{16, 17}. Studies concerning serum proteins profile in PCM patients evidence a decrease in albumin and an increase in alpha-1, alpha-2 and gamma-globulins fractions as well as reduced beta-lipoproteins in some patients and correlate these variations with PCM severity^{5, 16}. Our results demonstrated an increase of alpha-2 and gamma-globulins in CF PCM while alpha-1, alpha-2 and gamma-globulins were elevated in AF PCM, being gamma-globulins levels more elevated in the AF than CF PCM. Although gamma-globulins fraction was more increased in CF PCM than NHS, this difference was not statistically significant. In order to attempt to establish a cut off value for gamma-globulins that could indicate disease severity, the box-plot graphic analysis revealed that above 2,0g/dL it can be suggested the patient is developing the AF PCM (Fig. 5). The CF PCM patient who exhibited the extrapolated value of 3,38g/dL of gamma-globulin could be due to a possible multifocal disease that can be comparable in severity with the acute form of PCM. Albumin/globulin ratio was significantly different between AF or CF PCM and NHS according to expected and described in literature⁵. Albumin levels analyzed in g/dL were observed to be into the normal reference values in both forms of the disease. However, when the analysis of albumin results was performed in percentages it was verified low levels of albumin in CF PCM (47,9%) and even lower levels in AF PCM (46,85%) as shown in Table 2. When CF PCM patients were grouped according to IDR results in non reagent, reagent 1:1 and 1:2, reagent 1:4 and 1:8 or reagent 1:16 and 1:32, both alpha-2 and gamma-globulins were elevated in all groups and albumin was slightly reduced in patients group with IDR 1:16 and 1:32 (Table 3). These reduced values of albumin

in the group of patients exhibiting higher levels of antibodies in IDR may be explained in theory by its correlation with a more prominent inflammatory response and severe state of the disease. Other studies considering different infectious diseases and patients with different types of cancer showed both a decrease in albumin levels and an increase in alpha-2 and gamma-globulins or alpha-1, alpha-2 and gamma-globulins, respectively, and that alpha-1, total protein and albumin/globulin ratio were the best parameters to distinguish between malignant and healthy states^{22, 23}. It has also been proposed that the main reason for reduced albumin levels is related to the synthesis of acute-phase proteins in the liver that occurs in expense of albumin, transthyretin and transferrin production and is induced mainly by IL-6²⁴. Considering that alpha-1 globulins elevation was observed in AF PCM and not CF PCM group, we have investigated the possible role of HDL in the elevation of this parameter. Great part of α -lipoproteins, represented mainly by HDL cholesterol, migrates in alpha-1 globulins region and is a major contributor to this protein fraction by capillary zone electrophoresis^{25, 26}. Even so, our results showed that there was no significant difference between HDL levels in AF and CF PCM and NHS groups demonstrating that HDL should not influence in alpha-1 globulins fraction elevation in PCM.

Pearson's correlation test demonstrated that gamma-globulins increase was associated with beta-globulins in both forms of PCM, though it was more evident in the acute form of the disease (Fig. 1). This correlation could be due to the fact that great part of immunoglobulin A (IgA) migrates in beta-globulins fraction by acetate cellulose electrophoresis²⁵. Some investigations had already shown that IgA as well as IgG levels tend to be increased in PCM patients and that these elevations are even higher in AF PCM^{3, 5}. Nevertheless, in AF PCM strong correlations were also observed between alpha-1 and beta or gamma-globulins (Fig. 2 and Fig. 3) as well as a weak correlation between beta and alpha-2 globulins. The correlation between alpha-1 and gamma-globulins is easily explained and yet

expected once it is considered that acute phase proteins as alpha-1 acid glycoprotein, alpha-1 antitrypsin and that C-reactive protein, fibrinogen and immunoglobulins migrates mainly in these fractions, respectively²⁵. The main component of beta-globulins is transferrin, a liver produced protein that transports ferric ions from intracellular or mucosal ferritin stores to bone marrow. As previously cited, it is expected a reduction of this protein levels in serum due to liver production of acute-phase proteins which could reflect in diminished beta-globulins fractions. However, our results demonstrated that beta-globulins fractions were within normal levels when analyzed in g/dL and slightly decreased in AF PCM when analyzed in percentages. Some studies have associated the fungus survival in macrophages with iron dependence and the capacity of holotransferrin in reverse the inhibitory effect of macrophages on intracellular conidium-to-yeast transformation of *P. brasiliensis*^{27, 28}. The positive correlation between beta and alpha-1 and alpha-2 globulins observed only in AF PCM patients, the more severe form of the disease, could be related to the more important iron metabolism changes in these patients than in those with CF PCM.

The use of serological methods to detect specific antibodies is also an important tool in PCM diagnosis, but still remains a problem of antigens standardization that turns difficult the comparison of results from different laboratories as well as the access to these methodologies by every clinical diagnosis laboratory^{18, 19, 20}. Thus, this study intended to establish a more precise correlation of total IgG and IgE elevations and the extent of its influence in the serum proteins profile of PCM patients so that it could be an easier and more accessible exam to indicate the disease outcome. Our results showed that total IgG is significantly higher in AF PCM compared to CF and NHS groups, but that CF PCM is not statistically different from NHS in this parameter. Moreover, total IgE levels are significantly higher in AF PCM than CF PCM and NHS groups. Other works have demonstrated that in active PCM, different grades of cellular immunity depression are undertaken and correlated with a polyclonal B

lymphocytes activation that leads the patient to more severe forms of the illness. The increase in total IgG can be explained by B cells polyclonal activation and is more prominent in AF PCM than in CF PCM^{9, 15}. It has also been studied the prevalence of a Th2 pattern of immune response in AF and multifocal CF PCM resulting in high production of total and specific IgE^{7, 12, 21}. However, in this study it could be observed a significant correlation only between gamma-globulins and total IgE in AF PCM patients (Fig. 4). From these results it could be confirmed that plasma proteins fractions profile alters in PCM and there are positive correlations between some plasma proteins fractions and between gamma-globulins with total IgE levels. We have also concluded that there are differences in albumin results interpretation when expressed in percentages and absolute levels and that HDL probably does not contributes to alterations observed in alpha-1 globulins fraction in PCM patients. Both alterations on plasma electrophoretic profile and total IgG and IgE levels can be important markers for prognostic or even treatment follow-up in PCM, especially electrophoresis for being a simple routine laboratory method that can be applied in regions where specific PCM serology is not easily available.

Acknowledgements

The authors thank Mari S. Kaminami and Nilson de Jesus Carlos for their excellent technical assistance and Dr. Leonardo Sturion for his help in statistical analysis.

References

1. San Blas G. Paracoccidioidomycosis and its etiological agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 31: 99-113, 1993.
2. Coutinho ZF, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza P C and Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980 – 1995). *Cad. Saude Publica* 18(5): 1441-1454, 2002.
3. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an Update. *Clin. Microbiol Rev* 2: 89-117, 1993.
4. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML nad Group of Consulters in Paracoccidioidomycosis. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Bras Med Tropical* 39(3): 297-310, 2006.
5. Martinez R. Other laboratory tests: hematologic and biochemical changes. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del-Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. 1st ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 109-120, 1994.
6. Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CA, Burger E, Singer LM, Calich VL. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res* 20(1): 89-97, 2000.
7. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioidomycosis brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol* 156(5): 1811-1820, 2000.

8. Mello LM, Silva-Vergara ML, Rodrigues Junior V. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high Interleukin-4 and Interleukin-5 production. *Human Immunol* 63: 149-154, 2002.
9. Baida H, Biselli PJC, Juvenale M, Del Negro GMB, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. Differential antibody isotype expression to major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infec* 1: 273-278, 1999.
10. Marquez AS, Vicentini AP, Ono MA, Watanabe MAE, Camargo ZP, Itano EN. Reactivity of antibodies from patients with acute and chronic paracoccidioidomycosis to a high molecular mass antigen from *Paracoccidioides barsiliensis*. *J Clin Lab Anal* 19(5): 199-204, 2005.
11. Blotta MHSL and Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 31(3): 671-676, 1993.
12. Arango M and Yarzabal L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 79: 115-124, 1982.
13. Hostetler JS, Brummer E, Coffman RL, Stevens DA. Effect of anti-IL-4, interferon-gamma and antifungal triazole (SCH 42427) in paracoccidioidomycosis: correlation of IgE levels with outcome. *Clin Exp Immunol* 94: 11-16, 1993.
14. Biselli PJ C, Juvenale M, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. IgE antibody response to the main antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in patients with paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol* 39: 475-478, 2001.

15. Chequer-Bou-Habib D, Daniel-Ribeiro C, Banic DM, da Valle ACF, Galvão-Castro B. Polyclonal B cell activation in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 108: 89-93, 1989.
16. Hildebrand TM, Filho NAR, Filho FQT, Costa O, Miasaki N, Mira JGS, Miyaki M. Paracoccidioidomicose na criança. Aspectos clínicos e laboratoriais em 25 casos. *J Pediatría* 63: 92-97, 1987.
17. Nogueira MGS, Andrade GMQ, Tonelli E, Diniz SN, Goes AM, Cisalpino PS. Laboratory evolutive aspects of children under paracoccidioidomycosis treatment. *Rev Soc Bras Med Tropical* 39(5): 478-483, 2006.
18. Cano LE & Restrepo A. Predictive value of serologic tests in the serodiagnosis and follow up of patients with paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 29: 276-283, 1987.
19. Mendes-Giannini MJS, Del Negro GB, Siqueira AM. Serodiagnosis. In Franco M, Lacaz CS, Restrepo A and Del Negro G (ed.), Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Inc., Boca Raton Fla, p.354-363, 1994.
20. Díez S, Gómez BL, McEwen RJ, Restrepo A, Hay RJ, Hamilton AJ. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 41(4): 1536-1542, 2003.
21. Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MH. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 65: 237-241, 2001.

22. Angelopoulos B, Karalis D, Tsoukantas A, Eleftheriadou A, Danopoulos E. Eletrophoretic analysis of serum proteins, glucoproteins and lipoproteins in acute infectious diseases in infants and children. *Med Pharmacol* 14: 517-527, 1966.
23. Rasouli M, Okhovatian A, Enderami A. Serum proteins profile as an indicator of malignancy: multivariate logistic regression and ROC analysis. *Clin Chem Lab Med* 43(9): 913-918, 2005.
24. Hedlund JU, Hansson LO, Orqvist AB. Hypoalbuminemia in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med* 155: 1438-1442, 1995.
25. McPherson RA. Specific proteins. *In: Henry JB (19ed.) Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* WB Saunders Company, Philadelphia, p.237-252, 1996.
26. Luraschi P, Pagani A, Infusino I, Moraschinelli I, Franzini C. High-density lipoproteins contribute to the α -1-globulin zone in capillary electrophoresis of human serum proteins. *Electrophoresis* 25: 1551-1554, 2004.
27. Gonzales A, Restrepo A, Cano LE. Role of iron in the nitric-oxide mediated fungicidal mechanism of IFN- γ activated murine macrophages against *Paracoccidioides barsiliensis* conidia. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 49(1): 11-16, 2007.
28. Cano LE, Gomez B, Brummer E, Restrepo A, Stevens DA. Inhibitory effect of deferoxamina or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides barsiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. *Infect Immun* 62(4): 1494-1496, 1994.

Table 1 – Total IgG and total IgE by ELISA. Results are shown in optical density and mg/dL and ng/dL, respectively. The reference values for total IgG in adults is 751 to 1560 mg/dL and for total IgE is up to 33.6 ng/dL in individuals above 10 years old. AF PCM patients demonstrated both total IgG and IgE elevated and CF PCM patients demonstrated only total IgE above reference values.

Group (n)	Total IgG		Total IgE	
	OD	mg/dL	OD	ng/dL
(1) CF PCM (30)	0.298 ± 0.210●	1440 ± 439●	0.369 ± 0.127*◆	40.38 ± 17.63*◆
(2) AF PCM (12)	0.424 ± 0.122**	1704 ± 255**	0.600 ± 0.123*	72.45 ± 17.02*
(3) NHS (44)	0.243 ± 0.086	1325 ± 179	0.154 ± 0.073	10.64 ± 10.17

**Total IgG 2x3; ● Total IgG 1x2, * Total IgE 1x3, 2x3; ◆ Total IgE 1x2, p<0.050.

Table 2 – Serum protein profile obtained in acetate-cellulose electrophoresis expressed in g/dL and percentages. Reference values from literature for each variable are: total proteins (6,0 – 8,0g/dL), albumin (3,5 – 4,9g/dL; 50 a 68%), α 1-globulins (0,1 – 0,4g/dL; 2 a 6%), α 2-globulins (0,4 – 0,8g/dL; 7 a 12%), β -globulins (0,6 – 1,0g/dL; 9 a 16%) and γ -globulins (0,8 – 1,4g/dL; 12 a 22%).

	(1) CF PCM (30)		(2) AF PCM (12)		(3) NHS (44)	
	g/dL	%	g/dL	%	g/dL	%
Total Proteins	7.60 ± 1.303	100	8.61 ± 1.228*	100	7.43 ± 1.275	100
Albumin	3.64 ± 0.779*	47.9 ± 6.66●	3.99 ± 0.738	46.85 ± 8.11●	4.28 ± 0.876	57.4 ± 4.25
α 1-globulins	0.31 ± 0.115*	4.11 ± 1.46	0.44 ± 0.192*	5.00 ± 1.75	0.28 ± 0.113	3.80 ± 1.31
α 2-globulins	1.03 ± 0.238*	13.62 ± 2.52	0.93 ± 0.128*	10.91 ± 1.07	0.74 ± 0.180	10.01 ± 2.03
β -globulins	0.92 ± 0.296*	12.06 ± 2.76	0.74 ± 0.172	8.59 ± 1.30	0.76 ± 0.173	10.23 ± 1.91
γ -globulins	1.70 ± 0.492*◆	22.26 ± 4.16	2.49 ± 0.785*	28.65 ± 6.26	1.37 ± 0.289	18.54 ± 1.36
Albumin/Globulin	0.919*	---	0.864*	---	1.359	---

* Total proteins 2x3; * albumin 1x3; ● albumin 1x3, 2x3; * α 1-globulins 1x2, 2x3; * α 2-globulins 1x3, 2x3; *◆ β -globulins 1x3; γ -globulins 1x3, 2x3, 1x2, * albumin/globulin ratio 1x3, 2x3, p<0,050.

Table 3 – Results of protein fractions in acetate cellulose membrane electrophoresis in chronic PCM patients sera. Patients were grouped according to immunodiffusion test (IDR) results to fractions variations analysis. These results demonstrated a slight decrease in albumin medium value only in the group with higher titers of specific antibodies by IDR while γ -globulins fraction was elevated in all groups.

Protein fraction	IDR Results			
	Non Reagent	1:1 e 1:2	1:4 e 1:8	1:16 e 1:32
Albumina	3.62 ± 0.57	3.51 ± 1.06	3.66 ± 0.78	3.36 ± 1.06 •
α -1 globulinas	0.32 ± 0.11	0.27 ± 0.16	0.27 ± 0.10	0.36 ± 0.12
α -2 globulinas	1.02 ± 0.19	0.91 ± 0.35	1.00 ± 0.25	1.14 ± 0.12
β -globulinas	0.91 ± 0.38	0.92 ± 0.35	0.83 ± 0.13	1.13 ± 0.18
γ -globulinas	1.79 ± 0.64 ♦	1.69 ± 0.40 ♦	1.41 ± 0.29 ♦	1.90 ± 0.30 ♦

• Medium value below normal reference limits; ♦ Medium value above normal reference limits.

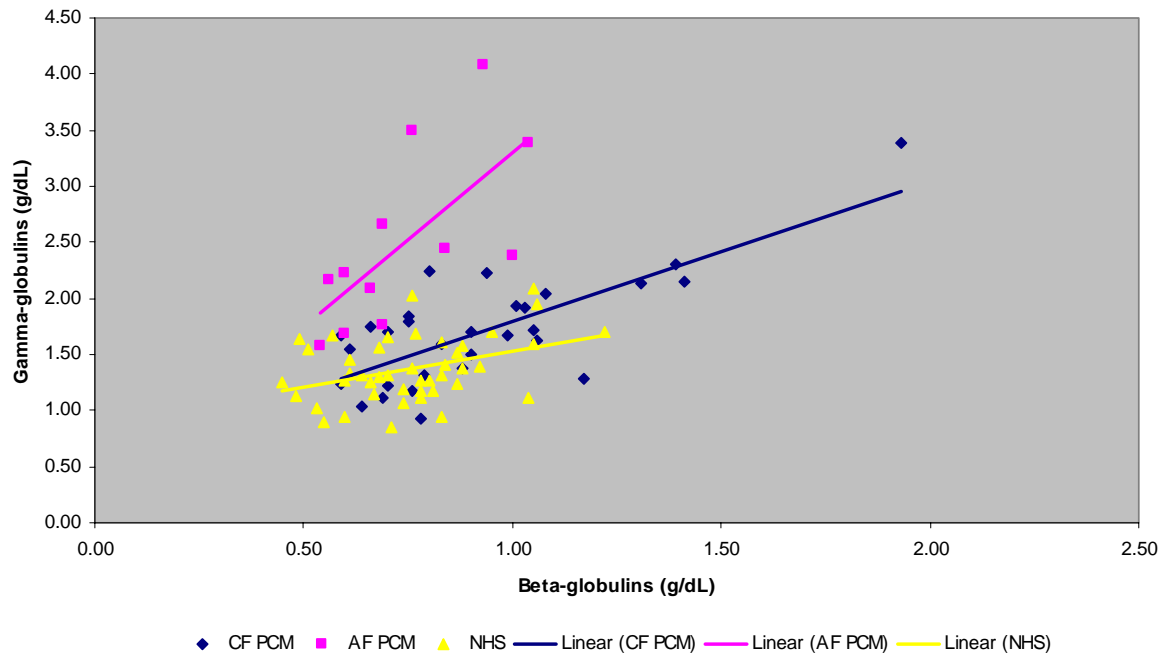


Figure 1 – Correlation between gamma and beta-globulins in AF PCM ($r = 0.7142$), CF PCM ($r = 0.6506$) and NHS ($r = 0.3369$).

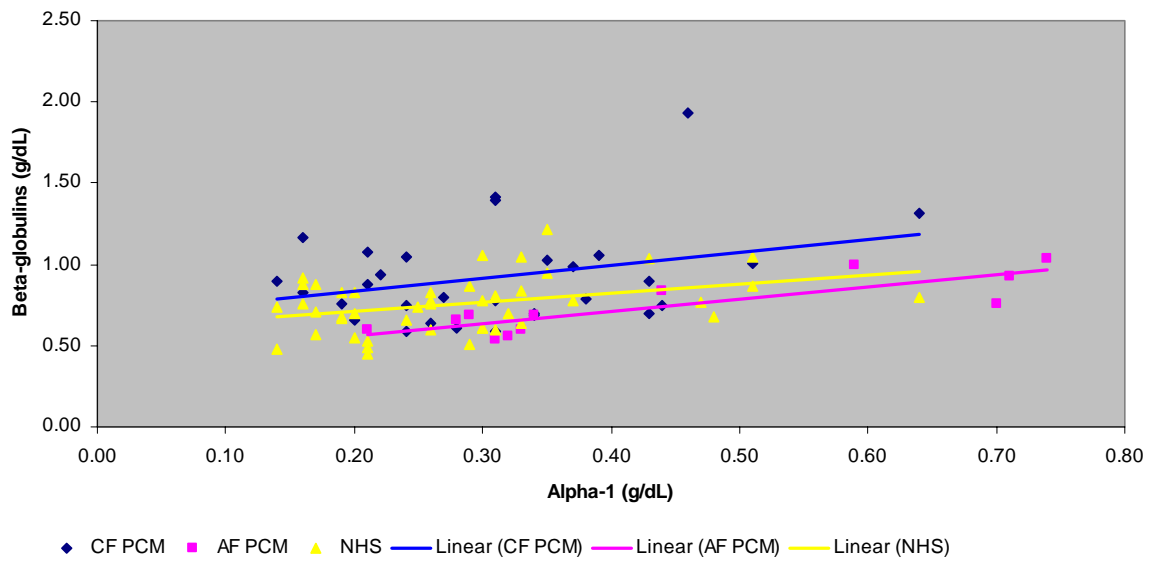


Figure 2 – Correlation between alpha-1 and beta-globulins in AF PCM ($r = 0.8306$), CF PCM ($r = 0.2303$) and NHS ($r = 0.3521$).

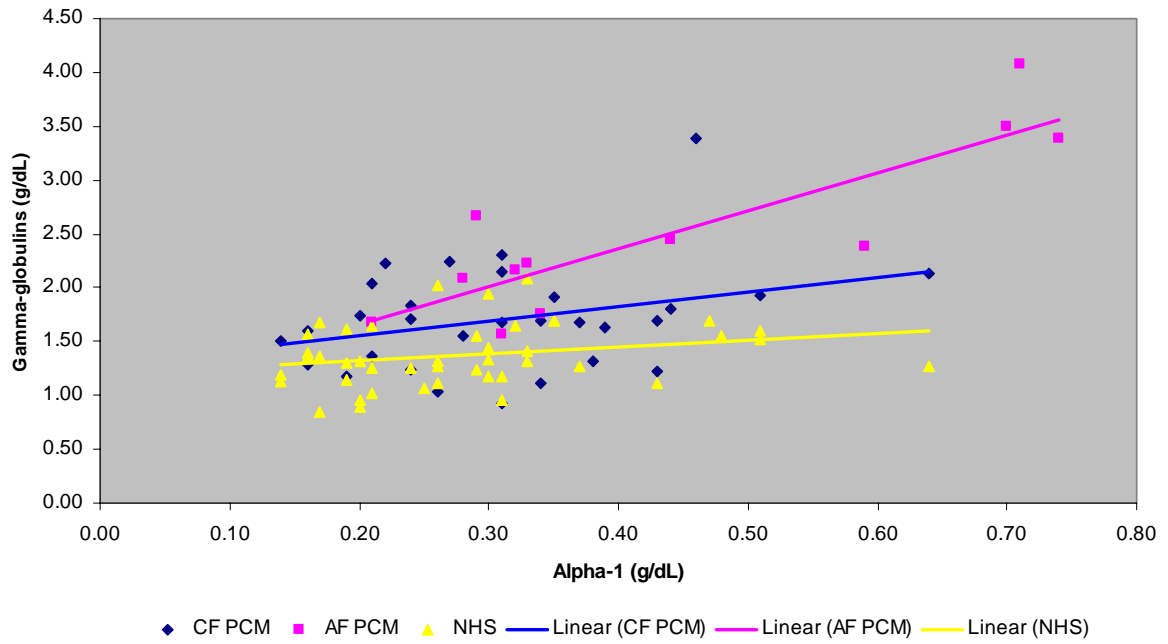


Figure 3 – Correlation between alpha-1 and gamma-globulins in AF PCM ($r = 0.8289$), CF PCM ($r = 0.2685$) and NHS ($r = 0.2790$).

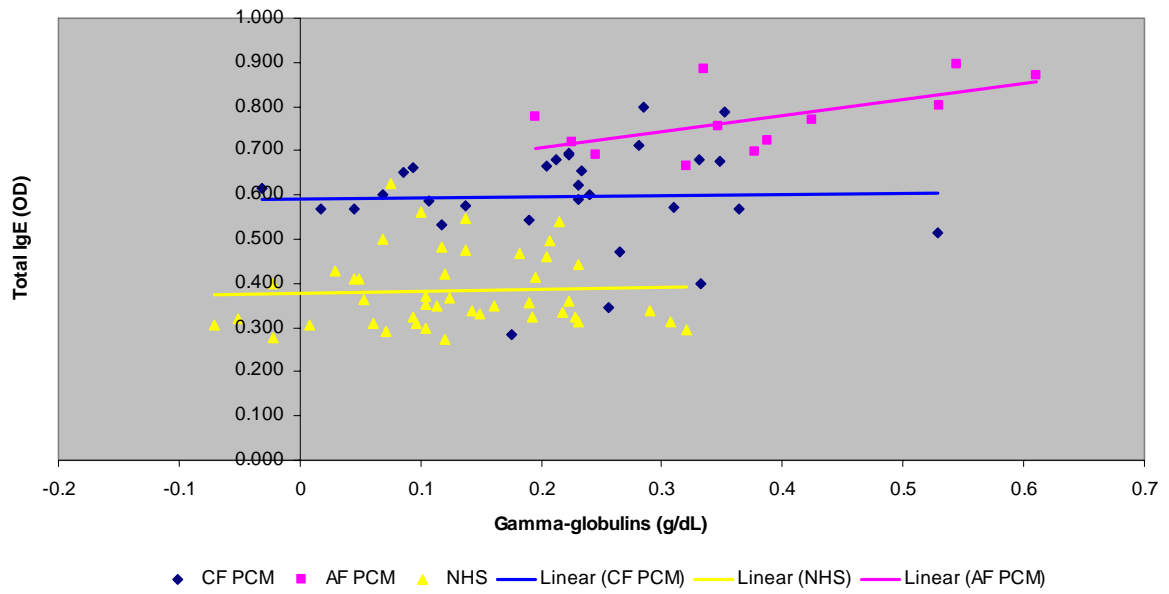


Figure 4 – Correlation between gamma-globulins and total IgE in AF PCM ($r = 0.6026$), CF PCM ($r = 0.0284$) and NHS ($r = 0.0426$).

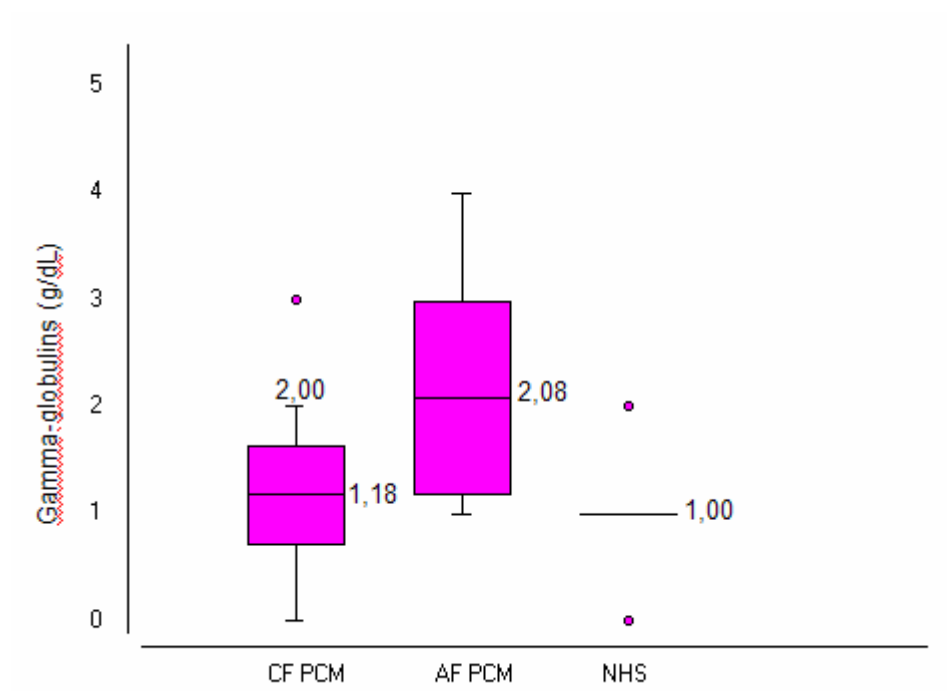


Figure 5 – Medium values and standard deviation of gamma-globulins fraction expressed in g/dL in chronic (CF) and acute (AF) PCM patients' sera and normal human serum donors (NHS).

POSSIBLE RELATION OF AUTOANTIBODIES AND IgG-IgE IMMUNE COMPLEXES IN PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS

Audrey de Souza Marquez¹, Adriana Pardini Vicentini², Mári Sumigawa Kaminami³, Mario Augusto Ono³, Zoilo Pires de Camargo⁴ & Eiko Nakagawa Itano³

¹ Department of Microbiology, Microbiology Doctorate Course, State University of Londrina – UEL, Campus Universitário, CEP 86051-970, Londrina, PR, Brazil.

² Immunology Section, Institute Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, 11º andar, CEP 012406-902, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brazil.

³ Department of Pathology Sciences, CCB, State University of Londrina, Campus Universitário, CEP 86051-970, Londrina, PR, Brazil.

⁴ Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo, Rua Botucatu 862, Vila Clementino, CEP 04023-062, São Paulo, SP, Brazil.

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

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM), caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, is characterized by two clinically distinguished forms: a more severe the acute (AF) and less severe chronic (CF) form. Circulating IgG-IgE immune complexes (IC) were analyzed in 22 CF, 12 AF PCM and 29 normal donors (NHS) by capture immunoassay (ELISAc). Additionally, IgG-gp43 IC, total IgG and IgE and specific IgG and IgE to *P. brasiliensis* antigens were analyzed. The increased level of IgG-IgE IC was observed in CF but not in the AF PCM. On the other hand, IgG-gp43 IC, total and specific IgG and IgE levels were higher in AF than CF ($p < 0.05$). The results of this study reaffirm the association of increased IgG-gp43 IC, IgE and IgG anti-*P. brasiliensis* and total IgG and IgE levels to PCM severity and introduce for the first time the presence of IgG-IgE IC distinguishing chronic and acute PCM which could provide a new differential marker between both forms of PCM disease. If this IC is due to autoantibody anti-IgE evidenced in some diseases, it requires further investigation.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, IgE, IgG, gp43, immune complexes.

Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is a dimorphic fungus that causes paracoccidioidomycosis (PCM), a deep mycosis endemic in many countries of Central and South Latin America, with a high incidence in Brazil^{1, 2}. Initially, filamentous aerial propagules of the fungus convert to the yeast phase in the lungs followed by lymphatic and haematogenic dissemination to multiple organs as liver, spleen, mucous membranes, skin, adrenals and nervous system. The majority of exposed individuals develop an asymptomatic infection that progresses to the fungus total elimination or its latency in quiescent foci for decades³. PCM disease is characterized by two clinically distinguished forms: the acute or juvenile form (AF) and chronic or adult form (CF). The AF is prevalent in children and young people and presents a more severe and rapid clinical evolution with the involvement of multiple organs and adenomegaly, hepatosplenomegaly, digestive disorders, osteo-articular involvement and muco-cutaneous lesions. The CF occurs mainly in adult males and the disease progresses slowly and silently for years in unifocal manifestations, especially pulmonary. Some patients develop the multifocal CF PCM that is more severe and involves skin, mucous membranes, pulmonary and lymph nodes manifestations⁴. In PCM, the efficient protection against the fungus is related to a Th1 immune response whereas susceptibility and more severe manifestations of the disease are associated to a Th2 immune response and the lower production of IFN- γ ^{5, 6, 7}. The humoral immune response is considered not protective and polyclonal B lymphocyte activation is more prominent in severe cases of the disease^{8, 9}. It has been reported high levels of IgE, specific IgE and IgG to gp43, the main antigen of *P. brasiliensis*, in severe PCM^{10, 11}. The overproduction of immunoglobulins through polyclonal B cells activation and the presence of *P. brasiliensis* soluble antigens direct investigations to the possible role of circulating immune complexes (IC) in PCM pathogenesis. The presence of IC has been associated to cellular immune suppression in PCM^{12, 13}. The evidenced of high

levels of IC formed by IgG associated to glycoproteins of 43-kDa, the main *P. brasiliensis* antigen, have been reported in PCM patients' sera^{14, 15, 16}. However, IgG-IgE IC observed in high levels in allergic patients due to IgG autoantibodies anti-IgE^{17, 18} could modulate IgE production^{19, 20}. Considering that, as well as in allergic diseases, in PCM there is an elevation of IgE seric levels and therefore the possibility of forming IgG-IgE IC, the present work analyzed, in addition to IgG-gp43 IC, levels of IgG-IgE IC in acute and chronic PCM patients' sera.

Material and methods

Serum samples

Serum samples were obtained from 22 chronic PCM patients (unifocal and multifocal disease) attended at Londrina State University Clinical Hospital (Londrina, Paraná [PR], Brazil) and 12 acute PCM patients (from the Mycosis Immunodiagnostic Laboratory of Institute Adolfo Lutz Immunology Section, São Paulo, São Paulo [SP], Brazil); 29 samples from healthy blood donors previously selected were used as negative control (NHS). All serum specimens analyzed were previously divided into aliquots and stored at -20°C until the moment of use. Informed consent was obtained from all subjects participating in this study, which was approved by the Internal Scientific Commission and the Committee of Bioethics in Research of Londrina State University (Londrina, PR, Brazil).

ELISA for IgG-IgE IC

ELISA immunoplates were sensitized (100µL/well) with goat immunoglobulin fraction anti-human IgE (Sigma I-0632 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) at 16µg/mL in carbonate buffer, pH 9.6, for 1h at 37°C and then overnight at 4°C. After the plates were blocked with 5%-skim milk 0.5%-Tween PBS buffer and washed four times using 0.5%-skim milk 0.05%-Tween PBS washing solution, serum samples (1:40) in 0.5%-skim milk PBS were added (100µL/well) and incubated for 2h at 37°C. The plates were washed with the same washing solution four times and goat peroxidase anti-human IgG (Sigma A-8775 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted 1:4000 (100µL/well) was added and incubated for 1h 30min at 37°C, followed by washing (four times) and the addition of 10mg OPD (ortho-phenylenediamine) in 25mL phosphate citrate buffer, pH 5.0, plus 10µL H₂O₂ 30%

(100 μ L/well). Following 20 min incubation, the reaction was stopped with 50 μ L/well of H₂SO₄ 4N and the absorbance read at 492nm in a Multiskan EX reader (Labsystems, Helsinki, Finland).

ELISA for IgG-gp43 IC

ELISA immunoplates were sensitized (100 μ L/well) with monoclonal mouse IgG anti-gp43 at 40 μ g/mL as previously described and serum samples (1:10) were added and incubated for 2h at 37°C. The plates were washed and incubated for 1h 30min at 37°C with goat peroxidase anti-human IgG (Sigma A-8775 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted 1:4000, followed by washing and 10 min of incubation with OPD/H₂O₂ substrate. The reaction was stopped and read as described above.

ELISA for total IgE

ELISA immunoplates were sensitized (100 μ L/well) with goat immunoglobulin fraction anti-human IgE (Sigma I-0632 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) at 16 μ g/mL as previously described and incubated with serum samples (1:4) for 2h at 37°C. The plates were washed and incubated with goat alkaline-phosphatase anti-human IgE (Sigma A-3525 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted 1:500 (100 μ L/well) for 1h 30min at 37°C, followed by washing and the addition of mass/volume p-nitrophenylphosphate in dietanolamine buffer, pH 9.8 (100 μ L/well). Following 30 min of incubation, the reaction was stopped with 50 μ L/well of NaOH 3M and the absorbance read at 405nm in a Multiskan EX reader (Labsystems, Helsinki, Finland).

ELISA for total IgG

ELISA immunoplates were sensitized with rabbit immunoglobulin fraction anti-human IgG purified in Sepharose-G protein column, at 40µg/mL as previously described and incubated with serum samples (1:4) for 2h at 37°C, followed by washing and incubation with goat peroxidase anti-human IgG (Sigma A-8775 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted 1:4000 (100µL/well) for 1h 30min at 37°C. After washing OPD/H₂O₂ substrate was added and incubated for 15 min. The reaction was stopped and read as described before.

ELISA for IgE anti-gp43

ELISA immunoplates were sensitized with goat immunoglobulin fraction anti-human IgE (Sigma I-0632 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) at 20µg/mL as previously described and incubated with serum samples (1:20) for 2h at 37°C. After washing, plates were incubated for 1h at 37°C with *P. brasiliensis* CFA antigen followed by incubation with monoclonal mouse IgG anti-gp43 for 1h at 37°C and goat peroxidase anti-mouse IgG (Sigma A-8924 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted 1:4000 for 1h 30min at 37°C. The reaction was revealed in 30 min of incubation with substrate and read as described before.

ELISA for IgG anti-ExoAg

ELISA immunoplates were sensitized with *P. brasiliensis* ExoAg as previously described and serum samples (1:200) were added (100µL/well) and incubated for 1h 30 min. at 37°C. After washing, goat peroxidase anti-human IgG (Sigma A-8775 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted 1:4000 was added and incubated for 1h 30min at 37°C. The reaction was revealed in 15 min of incubation with substrate and read as described before.

Statistical Analysis

To statistical analysis, all variables were calculated in LOG10 values, except total IgE which was calculated in SQRT values. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test and significance was defined as $p \leq 0.050$. Pearson's correlation was applied between total and specific IgG and IgE where significant correlation was considered when $r \geq 0.50$.

Results

ELISA for IgG-IgE IC

The results of ELISA for total IgE-IgG IC expressed as optical densities (OD) were 0.306 ± 0.136 in AF PCM patients, 0.476 ± 0.136 in CF PCM patients and 0.334 ± 0.068 in NHS. Statistical analysis showed significant differences between CF PCM and AF PCM or NHS, $p < 0.05$ (Fig. 1). It was not detected statistical significant difference between the results of AF PCM and NHS.

ELISA for IgG-gp43 IC

The results of ELISA for IgG-gp43 IC expressed as optical densities (OD) were 0.649 ± 0.218 in AF PCM, 0.391 ± 0.221 in CF PCM and 0.206 ± 0.073 in NHS (Fig. 1). Statistical analysis showed significant differences amongst all groups, $p < 0.05$.

ELISA for total IgE

The results of ELISA for total IgE expressed as optical densities (OD) were 0.600 ± 0.123 in AF PCM patients, 0.352 ± 0.124 in CF PCM patients and 0.167 ± 0.077 in NHS (Fig. 2). Statistical analysis showed significant differences amongst all groups, $p < 0.05$.

ELISA for total IgG

The results of ELISA for total IgG expressed as optical densities (OD) were significantly higher in AF PCM (0.590 ± 0.122) than in CF PCM (0.499 ± 0.227) or NHS (0.401 ± 0.092),

$p < 0.05$ (Fig. 2). Statistical analysis did not demonstrate significant difference between CF PCM and NHS groups for total IgG.

ELISA for IgE anti-gp43

The results of ELISA for specific IgE anti-gp43 expressed as optical densities (OD) were 0.196 ± 0.052 in AF PCM patients, 0.131 ± 0.043 in CF PCM patients and 0.089 ± 0.019 in NHS (Fig. 3). Statistical analysis showed significant differences amongst all groups, $p < 0.05$. Person's correlation test between total IgE and IgE anti-gp43 for AF PCM, CF PCM and NHS were: $r = -0.0448$, $r = 0.22293$ and $r = 0.0997$.

ELISA for IgG anti-ExoAg

The results of ELISA for total IgG expressed as optical densities (OD) were significantly higher in AF PCM (0.450 ± 0.273) or CF PCM (0.316 ± 0.179) than NHS (0.079 ± 0.017), $p < 0.05$ (Fig. 3). Statistical analysis did not demonstrate significant difference between AF and CF PCM for specific IgG anti-ExoAg. Person's correlation test between total IgG and IgG anti-ExoAg for AF PCM, CF PCM and NHS were: $r = 0.3574$, $r = -0.268$ and $r = -0.1788$.

Discussion

At the present work it was introduced by the first time the investigation of IgG-IgE IC in PCM patients' sera using a capture ELISA (ELISAc), a similar method also used by Vassella *et al.* (1990). The results obtained demonstrated the presence of IgG-IgE IC in human sera significantly higher in CF PCM patients' samples than in AF PCM. The formation of IgG-IgE IC could be responsible for the lower levels of total IgG and IgE or specific IgG and IgE to *P. brasiliensis* antigens observed in the chronic form of the disease. Increased levels of total and specific IgG and IgE detected in AF patients agree with literature data^{10, 11, 22}.

The formation of IgG-IgE IC could be due to the interaction of IgG-Ag-IgE or to the production of IgG autoantibodies recognizing IgE or vice-versa. Literature data has demonstrated more elevated levels of soluble antigens in sera of patients with the acute form of PCM^{23, 24}, consequently with greater probability of forming Ig-Ag IC. In agreement with that we have observed higher levels of IgG-gp43 IC in sera of AF PCM patients. However, low level of IgG-IgE IC was observed in this PCM manifestation suggesting that IgG-IgE IC detected in PCM could possibly be resulted from the production of IgG isotype autoantibodies recognizing IgE, observed yet in some diseases^{17, 18, 25, 26} and not the IgG-Ag-IgE IC. If the determination of IgE levels is affected by the presence of IgG-IgE IC has not been clearly defined^{21, 27}. We believe that when IgG-IgE IC is formed, IgE epitopes are possibly blocked and become not accessible, since our results of IgE and IgG-IgE IC in PCM patients with the chronic form are contrary in relation to the acute form.

The total and specific IgG and IgE are increased in the acute form but the inexistence of correlation between total and specific Igs levels (Fig. 4) suggest that total IgG and IgE levels could be due to polyclonal lymphocyte activation. The B cells polyclonal activation in PCM has been described in literature⁸. In regard of IgE, other antigens that not gp43 could be

involved in specific immune response and this could contribute to the evidence of no correlation. Nevertheless, for specific IgG analysis ExoAg was used, therefore, with all antigens of *P. brasiliensis*. However, we cannot totally exclude other somatic antigens that could be contributing for this absence of correlation.

The severity of PCM disease has been associated to the increase of Ig-Ag IC levels in both forms the disease¹² and other infectious pathologies^{28, 29}. In agreement with this information we have also observed high levels of IgG-gp43 IC in AF PCM patients' sera. On the other hand, the increased levels of IgG-IgE IC could modulate IgE production. According to Daëron et al.¹⁹, mast cell secretory response triggered by high-affinity receptors for IgE may be controlled by low-affinity receptors for IgG by Fc epsilon RI cross linked to Fc RII by the same multivalent ligand. MacGlashan et al.²⁰ observed decreased free IgE levels and a marked down-regulation of Fc(epsilon)RI on basophils during treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. The IgG-IgE IC immunomodulation effect could explain our high IgG-IgE IC level finding in chronic than more severe acute PCM disease.

In conclusion, this work demonstrates for the first time the presence of IgG-IgE IC distinguishing chronic and acute PCM which could provide a new differential marker between both forms of PCM disease and further studies investigating the role of IgG-IgE IC could contribute to the better understanding of PCM pathogenesis.

Acknowledgements

The authors thank Nilson de Jesus Carlos for their excellent technical assistance, Dra. Tiemi Matsuo and Dr. Leonardo Sturion for their help in statistical analysis.

References

1. San Blas G. Paracoccidioidomycosis and its etiological agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 31: 99-113, 1993.
2. Blotta MHSL, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouer SA, Papaiordanou PMO, Goveia A, Camargo ZP. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am. J. Trop. Hyg.*, Baltimore, v.61, n.3, p.390-394, 1999.
3. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an Update. *Clin. Microbiol Rev* 2: 89-117, 1993.
4. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML and Group of Consulters in Paracoccidioidomycosis. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Bras Med Tropical* 39(3): 297-310, 2006.
5. Benard G, Mendes-Giannini MJS, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJS. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 175, p. 1263-1267, 1997.
6. Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, Vaz CAC, Burger E, Calich VLG. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.*, Bethesda, v.66, p.800-806, 1998.
7. Mello LM, Silva-Vergara ML, Rodrigues-Junior V. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high

Interleukin-4 and Interleukin-5 production. *Human Immunol.*, New York, v.63, p.149-154, 2002.

8. Chequer-Bou-Habib D, Ribeiro CD, Banic DM, do Valle AC, Castro BG. Polyclonal B cell activation in paracoccidioidomycosis. Polyclonal activation in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 108(2): 89-93, 1989.

9. Silva MF, Silva CL. The role of somatic structure of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* upon B cell activation in experimental paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol* 101(2):321-327, 1995.

10. Arango M & Yarzabal L. T-cell dysfunctional and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, Netherlands, v.79, p.115-124, 1982.

11. Baida H, Biselli PJC, Juvenale M, Del Negro GMB, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. Differential antibody isotype expression to major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infec.*, Paris, v.1, p.273-278, 1999.

12. Chequer-Bou-Habib D, Oliveira-Neto MP, Ferreira-da-Cruz MF, Castro BG. The possible role of circulating immune complexes in the deficiency of cell-mediated immunity in paracoccidioidomycosis. *Braz J Med Biol Res* 22(2): 205-212, 1989.

13. Chequer-Bou-Habib D, Ferreira-da-Cruz MF, Castro BG. Immunosuppressive effect of paracoccidioidomycosis sera on the proliferative response of normal mononuclear cells. Identification of a *Paracoccidioides brasiliensis* 34-kDa polypeptide in circulating immune complexes. *Mycopathologia* 119(2): 65-71, 1992.

14. Unterkircher CS, Yazaki C, Shimizu MT, Jorge AOC, Camargo ZP. Specific components found in circulating immune complexes (CIC) in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.34, p.273-277, 1996.
15. Miura CSN, Estevão D, Lopes JD, Itano EN. Levels of specific antigen (gp43), specific antibodies and antigen-antibody complexes in saliva and serum of paracoccidioidomycosis patients. *Med. Mycol.*, Oxford, v.39, p.423-428, 2001.
16. Ramos SP, Sano A, Ono MA, Camargo ZP, Estevão D, Miyaji M, Nishimura K, Itano EM. Antigenuria and antigenemia in experimental murine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 43(7): 631-636, 2005.
17. Scheuer A, Haas H, Schlaak M. Prevalence and subclass distribution of IgG anti-IgE autoantibodies in atopy and parasitoses. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 96(3): 271-276, 1991.
18. Boluda L. & Berrens L. Do IgE-IgG complexes occur in the circulation? *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.100, p.145-150, 1995.
19. Daëron M, Malbec O, Latour S, Arock M, Fridman WH. Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J Clin Invest*, 95(2): 577-585, 1995.
20. MacGlashan DW Jr, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, McKenzie-White J, Sterbinsky SA, Hamilton RG, Terbinsky SA, Lichtenstein LM. Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J Immunol*, 158(3): 1438-1445, 1997.
21. Vasella CC, De Weck AL, Stadler BM. Natural anti-IgE autoantibodies interfere with diagnostic IgE determination. *Clin Exp Allergy*, 20: 295-303, 1990.

22. Bisseli PJC, Juvenale M, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. IgE antibody response to the main antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in patients with paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.*, Oxford, v.39, p.475-478, 2001.
23. Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz B, Robledo MA, Hay RJ, Restrepo A. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.35, n.12, p.3278-3282, 1997.
24. Silva SHM, Colombo AL, Blotta MHSL, Lopes JD, Queiroz-Telles F, Camargo ZP. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington DC, v. 41, n.8, p.3675-3680, 2003.
25. Millauer N, Zuercher AW, Miescher SM, Gerber HA, Seitz M, Stadler BM. High IgE in rheumatoid arthritis (RA) patients is complexed with anti-IgE autoantibodies. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.115, p.183-188, 1999.
26. Carini C, Fratazzi C, Aiuti F. Evidence for IgE immune complexes and distribution of IgG subclasses with anti-IgE activity in patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*, 21(4): 481-487, 1991.
27. Twena DM, Marshall JS, Haeney MR, Bell EB. A survey of nonatopic and atopic children and adults for the presence of anti-IgE autoantibodies. *Clin Immunol Immunopathol*, 53(1): 40-51, 1989.
28. Stoute JA, Odindo AO, Owuor BO, Mibei EK, Opollo MO, Waitumbi JN. Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complex are associated with severe malarial anemia. *J Infect Dis*, 187: 522-525, 2003.

29. Miyaike J, Iwasaki Y, Takahashi A, Shimomura H, Taniguchi H, Koide N, Matsuura K, Ogura T, Tobe K, Tsuji T. Regulation of circulating immune complexes by complement receptor type 1 on erythrocytes in chronic viral liver diseases. *Gut*, 51: 591-596, 2002.

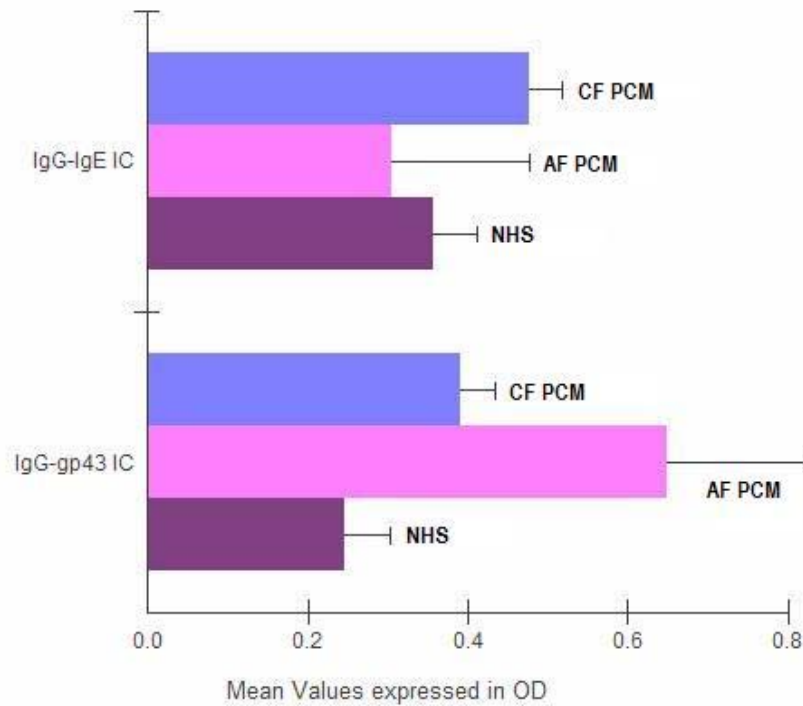


Figure 1 – Mean levels of IgG-IgE IC and IgG-gp43 IC in sera of patients with CF PCM (●), AF PCM (●) and NHS (●) expressed in optical density (OD) at 492 nm. Immunoplates sensitized with goat anti-human IgE, incubated with serum samples (1/40) and goat peroxidase anti-human IgG for IgG-IgE IC or sensitized with monoclonal mouse IgG anti-gp43 and incubated serum samples (1/10) goat peroxidase anti-human IgG for IgG-gp43 IC. CF PCM results were statistically higher than AF PCM or NHS for IgG-IgE IC, while IgG-gp43 IC results were significantly higher in AF than CF PCM or NHS, $p < 0.050$.

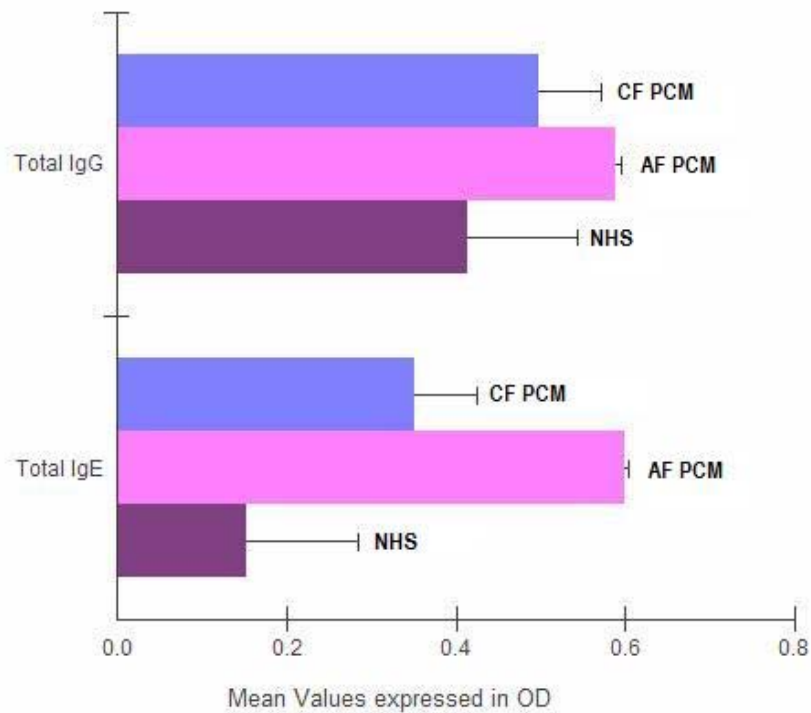


Figure 2 – Mean levels of total IgG and total IgE in sera of patients with CF PCM (●), AF PCM (●) and NHS (●) expressed in optical density (OD) at 492 nm (total IgG) or 405 nm (total IgE). Immunoplates sensitized with rabbit anti-human IgG or goat anti-human IgE were incubated with serum samples (1/4) and goat peroxidase anti-human IgG or goat alkaline phosphatase anti-human IgE. For total IgE, statistical significant differences were observed amongst all groups while for total IgG AF results were statistically higher than CF PCM and NHS, $p < 0.05$.

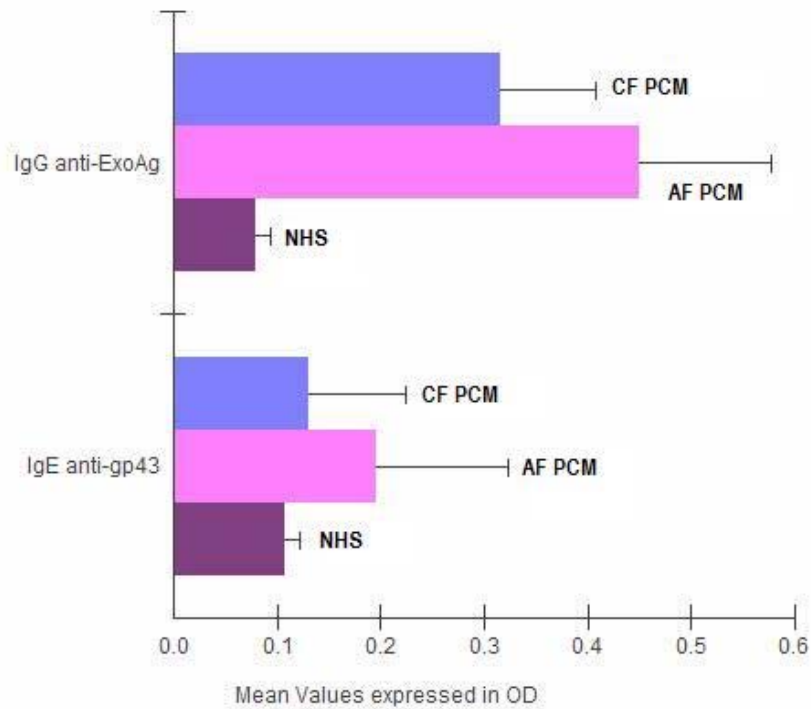


Figure 3 – Mean levels of specific IgG and IgE to *P. brasiliensis* antigens in sera of patients with CF PCM (●), AF PCM (●) and NHS (●) expressed in optical density (OD) at 492 nm. For specific IgG, immunoplates sensitized with *P. brasiliensis* ExoAg were incubated with serum samples (1/200) and goat peroxidase anti-human IgG. For specific IgE, immunoplates were sensitized with goat anti-human IgE and incubated with serum samples (1/20), *P. brasiliensis* CFA antigen, monoclonal mouse IgG anti-gp43 and goat peroxidase anti-mouse. AF and CF PCM results were statistically higher than NHS for IgG anti-ExoAg and IgE anti-gp43, $p < 0.05$.

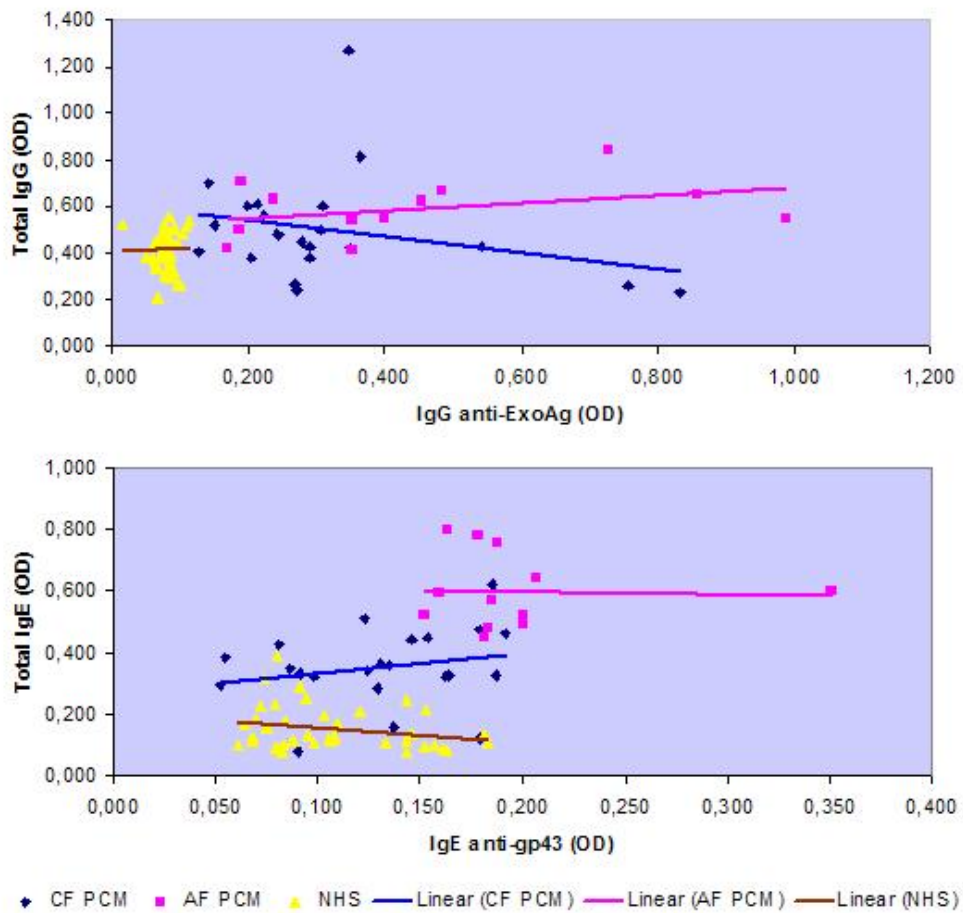


Figure 4 – Pearson's correlation test for (A) total IgG and specific IgG anti-ExoAg and (B) total IgE and specific IgE anti-gp43 expressed in optical density (OD). Results of CF PCM, AF PCM and NHS were $r = -0.268$, $r = 0.3574$, $r = -0.1788$ for IgG and $r = 0.2293$, $r = -0.0448$, $r = 0.0997$ for IgE. Statistical significance occurs when $r > 0.50$.

5 CONCLUSÕES

- 5.1 Na eletroforese de proteínas séricas, ocorre aumento nas frações protéicas alfa-1, alfa-2 e gama-globulinas na forma aguda e aumento de alfa-2 e gama-globulinas na forma crônica da PCM.
- 5.2 Existe correlação positiva entre beta e gama-globulinas tanto na forma aguda quanto crônica da doença.
- 5.3 Na forma aguda existe correlação positiva entre alfa-1 globulinas e beta ou gama-globulinas.
- 5.4 Na forma aguda existe correlação positiva entre gama-globulinas e IgE total e não IgG total sugerindo que o aumento de IgE total possa estar contribuindo para o aumento da fração gama nestes pacientes.
- 5.5 Acima de 2,0g/dL de gama-globulina sugere-se tendência à maior gravidade da PCM, considerando que os pacientes da forma crônica apresentam nível abaixo deste valor.
- 5.6 A análise da fração de albumina em porcentagem demonstra valores reduzidos na PCM aguda e crônica em relação ao grupo controle embora, quando analisados em valores absolutos, os resultados de albumina encontram-se dentro do intervalo de referência normal com exceção do grupo de pacientes crônicos com resultado de IDR superior ou igual a 1:16, o que sugere ser recomendável a análise dos resultados por ambos os parâmetros dependendo da finalidade.
- 5.7 Os níveis séricos de HDL colesterol não foram diferentes estatisticamente entre os grupos de PCM e doadores saudáveis e não correlacionou com a fração alfa-1 sugerindo que na PCM o HDL colesterol não contribui com o aumento desta fração protéica.
- 5.8 O nível sérico de IgE e IgG totais e específicos significativamente mais elevados na forma aguda que a crônica sugere que os mesmos possam estar relacionados à gravidade da doença.

- 5.9** Ocorre aumento significativo no nível sérico de IgG anti-ExoAg e IgE anti-gp43 sendo este aumento maior na forma aguda sugerindo que os mesmos podem estar relacionados à gravidade da doença.
- 5.10** A diferença no nível sérico de IC IgG-IgE pode ser utilizado como um novo marcador diferencial de forma aguda da crônica na PCM doença.