



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LILIAN CRISTINA RAIA DE DIO

**NÍVEIS SÉRICOS DE ANTÍGENO DE ALTA MASSA
MOLECULAR (hMMAg) E ANTICORPO ANTI- hMMAg EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Paracoccidioides*
brasilensis E TRATADOS OU NÃO COM CICLOSPORINA A**

LILIAN CRISTINA RAIA DE DIO

**NÍVEIS SÉRICOS DE ANTÍGENO DE ALTA MASSA
MOLECULAR (hMMAg) E ANTICORPO ANTI- hMMAg EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Paracoccidioides
brasilensis* E TRATADOS OU NÃO COM CICLOSPORINA A**

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

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Londrina
2012

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D278n De Dio, Lilian Cristina Raia.

Níveis séricos de antígenos de alta massa molecular (hMMAg) e anticorpo anti-hMMAg em camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* e tratados ou não com Ciclosporina A / Lilian Cristina Raia De Dio. – Londrina, 2012. 36 f. : il.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2012.

Inclui bibliografia.

1. *Paracoccidioides brasiliensis* – Teses. 2. Paracoccidioidomicose – Teses. 3. Ciclosporina – Teses. 4. Antígenos de fungos – Teses. 5. Patologia experimental – Teses. 6. Camundongo como animal de laboratório – Teses. I. Itano, Eiko Nakagawa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

LILIAN CRISTINA RAIA DE DIO

**NÍVEIS SÉRICOS DE ANTÍGENO DE ALTA MASSA MOLECULAR
(hMMAg) E ANTICORPO ANTI- hMMAg EM CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM *Paracoccidioides brasiliensis* E TRATADOS OU
NÃO COM CICLOSPORINA A**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Elisa Yoko Hirooka
UEL – Londrina - PR

Prof^o Dr^o Mario Augusto Ono
UEL – Londrina - PR

Prof^a Dr^a Eiko Nakagawa Itano
UEL – Londrina - PR

Londrina, 17 de abril de 2012.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina e contou com apoio financeiro da PPSUS/Fundação Araucária, Fundação Araucária, MEC/PROEXT, CAPES, PROPPG e PROEX/ UEL.

Com i mensa gratidão d edico este
trabalho a todos aqueles que am o
e a todos que estiveram com igo
nesta jornada.

Agradecimentos:

Primeiramente a Deus que deu-me a oportunidade de viver, a meus pais por sua doação e dedicação na minha formação, aos amigos e companheiros dessa jornada e a todos aqueles que fizeram parte do meu dia-a-dia proporcionando momentos inesquecíveis.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Eiko Nakagawa Itano, que sempre disposta e dedicada colaborou de maneira imprescindível em meu crescimento profissional durante a orientação para realização deste trabalho.

Aos docentes Prof.^a Dr.^a Elisa Hirooca e Prof^o. Dr^o. Mario Augusto Ono pela contribuição na banca de qualificação e participação na banca de defesa para correção deste trabalho.

À Mari Sumigawa Kaminami e Nilson de Jesus Carlos pelo incentivo, amizade e auxílio técnico na fase experimental deste trabalho.

Aos amigos de Laboratório que além de possibilitarem a realização deste trabalho tornaram-se parte da minha família: Luciene Airy Nagashima, Paula Leonello Alvares e Silva, Adriane Lenhard Vidal, Maiary Voltolini de Souza Pinto, Ana Gabriela da Silva Bonacini, Bruno Alexandre Sekiguchi, Fabiana Felipin Rigobello, Tânia Maris Pedrini Soares da Costa.

À Thiago Yuiti Castilho Massuda que contribuiu de maneira imprescindível para que este trabalho fosse desenvolvido.

À minha família, meu alicerce, pelo apoio, compreensão, dedicação e paciência principalmente os meus pais, à minha irmã e ao meu namorado.

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

Obrigada.

DE DIO, Lilian Cristina Raia. **Níveis séricos de antígenos de alta massa molecular (hMMAg) e anticorpo anti-hMMAg em camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* e tratados ou não com Ciclosporina A.** 2012. 36f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma das micoses sistêmicas mais importantes da América Latina, e tem o Brasil como região endêmica. A baixa ou a alta gravidade da doença depende da competência imunológica do hospedeiro e da virulência do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, agente da PCM. Os dados da literatura demonstram o potencial de utilização de antígenos como um importante marcador de acompanhamento terapêutico da PCM. Dentre os antígenos, destacam-se a gp43, seguida de gp70 e por último o antígeno de 87-kDa, investigados por técnica de ELISA de inibição. O objetivo do presente trabalho foi verificar a possibilidade de se detectar antígeno de alta massa molecular – gp ~380kDa (hMMAg) por ELISA de captura e verificar a sua potencial utilização como marcador de gravidade da doença em modelo experimental de PCM em camundongos. Inicialmente camundongos BALBc e ddY foram infectados com 1×10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18) e posteriormente como modelo de PCM menos grave, camundongos BALBc foram infectados e tratados com a Ciclosporina A (CsA), agente com atividade antifúngica. Os níveis de hMMAg e de gp43 foram determinados por ELISA captura utilizando IgG de coelho e de camundongo (anti-hMMAg e anti-gp43, respectivamente) e os níveis de IgG anti-hMMAg e gp43 foram determinados por ELISA indireto utilizando hMMAg e gp43, respectivamente, após 28 dias de infecção. Os resultados obtidos demonstraram níveis elevados de hMMAg e de IgG anti-hMMAg circulantes em camundongos BALBc e ddY em relação aos grupos não infectados ($p < 0,05$). Os níveis de hMMAg e de IgG anti-hMMAg bem como os níveis de gp43 e de IgG anti-gp43 foram significativamente menores nos camundongos infectados e tratados com CsA (doença menos grave) em relação ao grupo infectado e não tratado ($p < 0,05$). Esses resultados sugerem a possibilidade de se utilizar ELISA de captura para determinar nível de hMMAg circulante e seu potencial para fins de prognóstico ou de monitoramento de tratamento na PCM, o que requer air estudos adicionais.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Imunodiagnóstico. Antígenos solúveis. Ciclosporina A. Droga antifúngica.

DE DIO, Lilian Cristina Raia. **Serum levels of high molecular weight antigens (hMMAg) and anti-hMMAg in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* and treated with or without cyclosporine A.** 2012. 36p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is one of the most important systemic mycosis in Latin America, and Brazil is an endemic region. The low or high severity of the disease depends on the host's immune competence and on the virulence of the fungal agent of PCM, *Paracoccidioides brasiliensis*. Literature data show the potential use of antigens as important markers of the therapeutic management of PCM. The following *P.brasiliensis* antigens stand out: gp43, gp70 and the 87-kDa antigen, investigated by inhibition ELISA. Current study aimed to investigate if it is possible to detect the high molecular mass antigen - gp ~380kDa (hMMAg) by capture ELISA and to verify its potential use as a marker of disease severity in an experimental model of murine PCM. Initially, BALBc and ddY mice were infected with 1×10^6 yeast cells of *P. brasiliensis* (Pb18) and later, as a model of less severe PCM, BALBc mice were infected and treated with Cyclosporin A (CsA), an antifungal agent. The levels of hMM Ag and gp43 were determined by capture ELISA using rabbit and mouse IgG (anti-hMM and anti-gp43, respectively) and the levels of IgG anti-hMM Ag and anti-gp43 were assessed by indirect ELISA after 28 days of infection. The results showed high levels of hMM Ag and circulating IgG anti-hMM Ag in BALBc and ddY mice compared to uninfected groups ($p < 0.05$). The levels of hMM Ag and IgG anti-hMM Ag as well as gp43 and IgG anti-gp43 were significantly lower in mice infected and treated with CsA (less severe disease) in comparison to the infected but untreated group ($p < 0.05$). These results suggest the possibility of using capture ELISA to determine the levels of circulating hMM Ag and its potential use in prognosis or to monitor PCM treatment, which requires further studies.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Immunodiagnosis. Soluble antigens. Cyclosporine A. Antifungal drug.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Perfil espectrofotométrico obtido por cromatografia em coluna Sephadex G-200 e eletroforese (SDS-PAGE) das frações obtidas.....26
- Figura 2** - Determinação do nível de IgG anti-gp43 e IgG anti-hMM em plasma de camundongos BALBc e ddY.....27
- Figura 3** - Determinação de IgG anti-hMM e anti-gp43 e determinação de hMM e gp43 em plasma de camundongos BALBc infectados e tratados.28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
mL	Mililitros
M	Mols
mM	Milimols
µg/mL	Microgramas por mililitro
mg/Kg	Miligramas por quilo
mg/mL	Miligramas por mililitros
Ag	Antígeno
Anti-gp43	Anticorpo contra a glicoproteína de 43 quilodaltons
Anti-hMM	Anticorpo contra a glicoproteína de alta massa molecular
AS	Antígeno somático
Ca²⁺	Íon Cálcio
CFA	Antígeno <i>Cell free</i>
CFU	Unidade Formadora de Colônia (colony-forming unit)
CaM	Calmodulina
CaN	Calcineurina
CaNA	Subunidade catalítica do complexo Cálcio/Calmodulina
Cna1p	Catalisador da CaNA
CaNB	Subunidade regulatória do complexo Cálcio/Calmodulina
Cnb1p	Regulador obrigatório da CaNB dependente de Ca ²⁺
CsA	Ciclosporina A
E2	Hormônio 17β-estradiol
EBP	Proteína ligadora de estrogênio (Estrogen binding protein)

ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme-linked immunossorbent assay)
gp 43	Glicoproteína de 43 quilodaltons
gp 380	Glicoproteína de 380 quilodaltons
hMM	Alta massa molecular
IgG	Imunoglobulina G
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
INF-γ	Interferon gama
kDa	Quilodalton
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	Tampão salino fosfato pH 7,2
PCM	Paracoccidioidomicose
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
SDS-PAGE	Eletroforese em gel poliacrilamida com SDS
(TGF-β)	Fator de crescimento tumoral
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
USP	Universidade de São Paulo
V	Volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	20
	Objetivo Geral	20
	Objetivos Específicos	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
	Manutenção do Isolado de <i>P. brasiliensis</i>	21
	Obtenção de Antígenos Cell free (CFA Pb18).....	21
	Purificação e Análise de hMM Ag.....	21
	Infecção Experimental em Murinos com Pb18	22
	Obtenção de Amostras de Soro/Plasma	23
	ELISA Indireto para Detecção de IgG anti-hMM Ag e gp43	23
	ELISA Captura para Detecção de hMM Ag e gp43 Circulante	24
	Análise Estatística	24
4	RESULTADOS	25
5	DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma doença granulomatosa, sistêmica de evolução crônica, descrita inicialmente por Lutz, em 1908 (San-Blas, 1993; Brummer *et al.*, 1993). É causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* sendo endêmica nas Américas Central e do Sul, em zonas subtropicais de clima úmido. O Brasil é o país com maior número de casos de PCM, sendo considerada a 8ª causa de morte por doenças infecciosas (Coutinho *et al.*, 2002), afetando principalmente trabalhadores e moradores da zona rural (San-Blas, 1993; Brummer *et al.*, 1993, Blotta *et al.*, 1999).

O fungo *P.brasiliensis* apresenta-se na fase leveduriforme quando cultivado entre 35°C – 37°C ou nos tecidos do hospedeiro e na forma micelial quando cultivado à 25°C (San-Blas F & San-Blas G, 1982; Brummer *et al.*, 1993; Queiroz-Telles, 1994). Evidências epidemiológicas e experimentais sugerem que a infecção seja provavelmente adquirida por inalação de propágulos produzidos pela fase micelial saprófita do fungo, que se instalam nos pulmões onde sofrem conversão para a fase leveduriforme (Mendes, 1994), invasiva e patogênica. (Franco *et al.*, 1987; Restrepo *et al.*, 2005).

Diversas classificações das formas clínicas da PCM foram publicadas desde o surgimento da doença. Todas elas baseavam-se em diferentes critérios tais como topografia das lesões, gravidade da doença, resultados de reações sorológicas, história natural, entre outros. Para a classificação de formas clínicas e gravidade da doença, foi proposta no consenso de 2006 uma adaptação da classificação apresentada no *International colloquium on paracoccidiodomycosis* realizado em fevereiro de 1986 em Medellín, Colômbia, que relaciona dados clínicos a história natural da moléstia. Assim as formas clínicas da doença foram classificadas como: PCM- infecção, PCM-doença de forma aguda/subaguda (forma juvenil), forma crônica (tipo adulta) o forma residual (seqüelas), sendo subdividida novamente em PCM unifocal ou multifocal conforme o número de locais de lesão (Shikanay-Yassuda, 2006., Franco *et al.*, 1987).

Formas crônicas de PCM acometem geralmente homens adultos, envolve gradualmente pulmões (unifocal), e podem estar associados ou não a lesões na pele e mucosas, em geral bem localizadas, e envolvimento clínico de outros órgãos (multifocal) (Franco *et al.*, 1989; Londero, 1986; Londero *et al.*, 1978;

Restrepo *et al.*, 1976; Restrepo *et al.*, 1970). Formas graves de PCM são caracterizadas por inibição da imunidade celular contra agentes infecciosos, permitindo deste modo o crescimento fúngico, com alta carga antigênica e altos títulos de anticorpos específicos (Morais *et al.*, 2000).

A Forma aguda ou subaguda de PMC, que representa somente três a cinco por cento dos casos, acomete pacientes mais jovens, de ambos os sexos, progride rapidamente e se dissemina através do sistema linfático e sanguíneo. A forma aguda é mais grave, e os pacientes geralmente apresentam uma função imune celular deprimida, levando a um prognóstico ruim. Dentre as manifestações clínicas ocorre hepatoesplenomegalia, aumento de linfonodos, além de disfunção da medula óssea, sendo esta forma da doença facilmente confundida com uma desordem linfoproliferativa em disseminações intensas, também se caracteriza por lesões generalizadas, nível elevado de anticorpos específicos aos antígenos de *P. brasiliensis*, imunidade diminuída e presença de reação inflamatória granulomatosa não organizada, contendo muitos fungos viáveis (Franco *et al.*, 1987). Análises de biópsias mostram um grande número de leveduras gemulantes sem a formação de granulomas (Londero; Melo, 1983; Terra *et al.*, 1991).

A maioria dos indivíduos expostos ao fungo apresenta uma infecção assintomática (PCM infecção). A infecção primária da PCM pode persistir em focos quiescentes por décadas, sugerindo que durante esse período os pacientes foram capazes de controlar a disseminação fúngica. O fato de a PCM infecção ser significativamente alto no sexo masculino e que a exposição ao fungo é praticamente igual para ambos os sexos levou à hipótese de que os hormônios sexuais femininos interferem na infecção do fungo (Restrepo *et al.*, 1984). Proteínas de ligação ao estrógeno têm sido detectadas no citosol do fungo (Loose, *et al.*, 1983) e durante a transformação, novas proteínas são produzidas como resultado da incorporação de estradiol (Restrepo, *et al.*, 1984). Investigações a respeito do efeito hormonal de hospedeiros mamíferos sobre a patogenicidade de *P. brasiliensis* levou à evidência de que o hormônio 17 β -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 proteína ligadora de estrogênio (EBP) de alta afinidade, presente no citosol da fase leveduriforme do fungo (Loose *et al.*, 1983 apud Hogan *et al.*, 1996). Acredita-se que o hormônio E2 circulante em mulheres adultas retarda ou

inibe a transição de partículas infectantes à forma parasitária leveduriforme e a EBP 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).

O desenvolvimento ou não da doença está associado a fatores como a virulência do fungo, da suscetibilidade genética e do estado imunitário do hospedeiro determinando a forma que a PCM irá se apresentar (Franco, *et al.*, 1987).

Diferenças no padrão de resposta imune entre os indivíduos contra *P. brasiliensis* são importantes para determinar a progressão e os efeitos da doença (Oliveira *et al.*, 2002). Estudos experimentais mostram que a resistência contra *P. brasiliensis* está associada ao padrão Th1 (linfócitos T auxiliares do tipo 1) da resposta imune (Calich e Kashino, 1998) e que a susceptibilidade está ligada ao padrão de resposta Th2 (linfócitos T auxiliares do tipo 2) (Cano *et al.*, 1998).

Na PCM experimental, diversos modelos têm sido empregados na tentativa de mimetizar a PCM humana e, dentre estes, tem sido utilizado camundongos de linhagens isogênicas. Esses camundongos têm sido classificados conforme sua susceptibilidade à infecção pelo *P. brasiliensis* em: muito resistente (A/Sn), resistente (C3H/He), intermediário (C3H/HeB, C57B1/10, CBA, BALB/c) e susceptível (B10.A, B10D2/oSn e B10D2/nSn) (Calich *et al.*, 1985; Vaz *et al.*, 1992; Singer-Vermes *et al.*, 1993).

Animais susceptíveis e indivíduos com formas mais graves de PCM tendem a desviar a resposta imunológica para o padrão Th2, produzindo citocinas controladoras da ativação e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos (células secretoras de anticorpos); demonstrando a sua importância na indução de resposta imune humoral (Oliveira *et al.*, 2002; Singer-Vermes *et al.* 1993) apresentando depressão antígeno-específica da imunidade celular (Bernard *et al.*, 1996) com produção de grandes quantidades de Interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento tumoral (TGF- β) (Mamoni and Blotta, 2005). Se a resposta imune for satisfatória, a infecção é controlada e os fungos são destruídos. No entanto, se a resposta for insuficiente e permanecerem focos remanescentes, com a ocorrência de uma queda na imunidade, pode haver a reativação destes focos latentes evoluindo para o aparecimento da PCM aguda (Bernard *et al.*, 1995).

Estudos mostram que componentes do fungo *P. brasiliensis* podem apresentar atividades antigênicas ou imunomoduladoras. Anticorpos específicos

para antígenos do fungo são utilizados para o diagnóstico, especialmente a gp43, uma glicoproteína de 43kDa dominante no *P. brasiliensis* que é encontrado no soro de indivíduos infectados (Puccia *et al*, 1986) durante todos os estágios da doença (Ferreira *et al*, 2011). É considerada um importante fator de virulência devido a sua capacidade intrínseca em inibir a ativação de macrófagos, diminuindo sua capacidade fagocítica e fungicida (Popi *et al*, 2002) e reduzir a atividade linfoproliferativa (Bernard *et al*, 1997). Segundo Almeida e colaboradores, 1998, a gp43 pode promover adesão inicial e a internalização de leveduras por células fagocíticas promovendo a morte do fungo. Entretanto Popi e colaboradores, 2002, avaliaram o efeito da gp43 entre macrófagos peritoneais murinos e *P. brasiliensis* e seus resultados sugerem que a produção de gp43 pelo fungo pode ser considerada um mecanismo de evasão do *P. brasiliensis* na instalação da infecção em hospedeiros suscetíveis corroborando para afirmar a importância desta glicoproteína como principal fator de virulência do fungo.

Uma fração glicoprotéica de aproximadamente 380kDa (hMM – gp380) foi parcialmente isolada, primeiramente em nosso laboratório por Marquez *et al*, 2003, em preparado livre de células (CFA), esta fração de alta massa molecular, com mobilidade eletroforética ampla, apresentou a capacidade de interagir soro de pacientes com PCM (Marquez *et al*, 2005). A análise dessa fração demonstrou que a mesma induz resposta celular Th1, com aumento do nível de INF- γ , mas não de IL-4, promovendo também a proteção com diminuição de crescimento de colônias e diminuição de antígenos circulantes em modelo experimental de PCM em camundongos, portanto possivelmente benéfica ao hospedeiro (Pavanelli *et al*, 2007).

Atualmente, diferentes protocolos de terapia antifúngica para a PCM são utilizados, variando de acordo com a forma e gravidade da doença e idade do paciente. O tratamento convencional é baseado em sulfonamidas, anfotericina B e derivados de azóis (Visbal, *et al*, 2005; Fernandes *et al* 2011). Contudo efeitos colaterais e o longo tempo de tratamento fazem com que muitas vezes o paciente abandone-o antes de estar totalmente curado (Hahn & Hamdan, 2000; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2002; 2006). Imidazóis (cetoconazol) e triazóis (fluconazol e itraconazol) têm sido amplamente utilizados para o tratamento de PCM e têm se mostrado efetivos para fins clínicos, demonstrando menos efeitos secundários do que a anfotericina B (Fernandes *et al*, 2011). Entretanto ainda se buscam terapias

alternativas e o desenvolvimento de drogas antifúngicas mais eficazes e específicas ou a combinação de drogas que poderiam encurtar o tempo de tratamento.

Nesse contexto, vários trabalhos têm mostrado resultados promissores da intervenção na via da calcineurina (CaN) para o tratamento de infecções fúngica invasivas. A CaN trata-se de enzima serina/treonina fosfatase com ativação dependente do complexo Ca^{2+} /Calmodulina (CaM). Extremamente conservada em eucariotos, sendo um heterodímero que apresenta uma subunidade catalítica (CaNA) que tem cerca de 58-64 kDa e uma subunidade regulatória (CaNB) que possui 19 kDa (Shibasaki *et al.*, 2002; Xiang *et al.*, 2003).

Essa enzima é essencial para a adaptação ao ambiente, crescimento mesmo em presença de estímulo de estresse, morfogênese e patogênese de muitas espécies de fungos (Stie, J., and D. Fox., 2008). A enzima é constituída por duas subunidades, o catalisador da CaN A (Cna1p) e a Ca^{2+} regulador obrigatória da subunidade B da CaN (Cnb1p) (Sanglard *et al.*, 2003). Após o aumento de Ca^{2+} citoplasmático livre, Ca^{2+} /CaM e Ca^{2+} /Cnb1p para Cna1p ativação a CaN, induzindo uma mudança conformacional deslocando um domínio auto inibitório do sítio ativo (Watanabe, Perrino, and Soderling, 1996).

O aumento de níveis de Ca^{2+} intracelular e a ativação da CaN acompanha vários tipos de alterações ambientais em fungos, incluindo a temperatura (Odom *et al* 1997; Peiter *et al* 2005), pH, íons (Garrett-Englele *et al.* 1995, Liu *et al.* 2006), antifúngicos (Onyewu, *et al* 2003), e morfogênese de indução de sinalização (Sanglard *et al.*, 2003). A ativação da Ca^{2+} /CaM via CaN é descrita como indutora de um controle adequado dos parâmetros bioquímicos, genéticos e de alterações morfológicas em situações em que são exigidas adaptações às condições estressantes. Dependendo da espécie do fungo, a CaN aparece ligada à regulação de funções que incluem crescimento, germinação, extensão das hifas, desenvolvimento e sobrevivência, em circunstâncias normais e as condições estressantes (Stie, J., and D. Fox., 2008). Quando estes são obrigados a sobreviver em condições desfavoráveis de temperatura, pH, íons ou na presença de antifúngicos ocorre um aumento dos níveis intracelulares de cálcio, que por sua vez se liga a calmodulina, ativando a calcineurina (Fernandes *et al* 2005). Uma vez ativada, a calcineurina ativa fatores transcricionais que ao entrar no núcleo ativa um conjunto de genes responsivos a calcineurina que estão envolvidos na homeostase e sobrevivência da célula fúngica (Viladevall *et al* 2004).

Com relação a estudos com o *P. brasiliensis* resultados de análises de Microarray feitas durante a transição da fase micelial para leveduriforme mostraram que ocorre uma alta expressão da subunidade B da CaN nessa condição (Nunes *et al.*, 2005; De Carvalho *et al.* 2003). Campos e colaboradores, 2008, evidenciaram que esse fungo também utiliza a ativação da CaN para se proteger contra o ambiente hostil do hospedeiro.

Uma conhecida droga imunossupressora a ciclosporina A (CsA) foi descrita como inibidora da atividade da CaN. De modo geral o complexo formado pela droga com as imunofilinas (receptores endógenos): CsA com a ciclofilina A (CyPA), liga-se à subunidade catalítica da CaN, inibindo sua atividade (Liu *et al.*, 1991; Derkx & Madrid, 2001). Devido a esse mecanismo, a concentração de imunofilinas (CyPA A) é determinante para um bloqueio mais ou menos efetivo da CaN (Wang & Heitman, 2005).

Alguns estudos mostraram ainda que, um aumento dos níveis de Ca^{2+} no início do processo de dimorfismo e a importância do papel da CaN nesse processo, uma vez que o seu bloqueio farmacológico impede a transição (De Carvalho *et al.*, 2003). *In vitro*, a CsA, também é efetivamente capaz de deter a transformação da fase micelial para leveduriforme, bem como de diminuir o crescimento de leveduras de *P. brasiliensis* (Campos *et al.*, 2008).

Puccia *et al.*, 1986, demonstraram pela primeira vez a presença de glicoconjugado polidisperso com ampla migração eletroforética de alta massa molecular reconhecido pelos soros de pacientes com PCM. Os mesmos autores consideraram esse antígeno como inespecífico, sem o potencial de utilização no diagnóstico, uma vez que algumas amostras de soros normais reconheciam também esse antígeno. Mas, recentemente foi observado o reconhecimento desse antígeno de alta MM em soro de um morador da área rural, possivelmente com PCM infecção e que teve a manifestação da doença após 7 anos (artigo submetido). Assim, a reatividade com algumas amostras de soros considerados normais também poderiam tratar de PCM infecção. Além disso, Márquez e colaboradores (2003), demonstraram que a gp380 contida na fração hMM poderia ser utilizada como novo marcador de diferenciação entre PCM humana aguda e crônica, doença grave e controlada, respectivamente.

Assim, considerando a importância neste contexto de marcador diferencial o presente trabalho introduziu a análise de nível de IgG anti-hMM em

grupos de camundongos tratados ou não com a CsA (PCM menos grave e grave) para verificar o potencial de utilização dos mesmos como novos marcadores biológicos para prognóstico e monitoramento da PCM.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar a possibilidade de se detectar antígeno de alta MM (hMMAg) por ELISA de captura e verificar a sua potencialidade de utilização como marcador de gravidade da doença em modelo experimental de PCM em camundongos.

Objetivos Específicos

- Padronizar e utilizar a metodologia de ELISA de captura para determinação de nível de hMMAg circulante em modelo experimental de PCM em camundongos BALBc e ddy.
- Determinar os níveis de IgG anti-fração hMM e IgG anti-gp43 circulantes em camundongos BALBc e ddy infectados com *P. brasiliensis*.
- Determinar os níveis de hMMAg e gp43 circulantes em camundongos BALBc infectados com *P. brasiliensis* e tratados ou não com CsA.
- Determinar níveis de IgG anti-fração hMM e IgG anti-gp43 circulantes em camundongos BALBc infectados com *P. brasiliensis* e tratados ou não com CsA.

3 MATERIAS E MÉTODOS

Manutenção do Isolado de *P. Brasiliensis*

P. brasiliensis da cepa de referência 18 (Pb18), gentilmente fornecido pelo Professor Dr. Zoilo Pires de Camargo (UNIFESP), foi mantido a 35°C para cultivo em ágar sabouraud 4% de glicose (Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, Michigan) e repicado a cada cinco dias.

Obtenção de Antígenos Cell free (CFA Pb18)

O antígeno CFA foi obtido de Pb18, cultivado em Agar Sabouraud por 5 dias a 35°C em estufa. Após o cultivo, foi colocado em solução salina-fosfato tamponada (PBS 0,15M e pH 7,4), com inibidor de protease PMSF a 2,5mM (Sigma Chemical Co., USA) e thimerosol a 0,02%. A suspensão foi homogeneizada em vortex durante 15 minutos e a seguir centrifugada a 18,500g a 4°C (Eppendorf Centrifuge 5804 R – Hamburg, Germany). A concentração de proteína foi determinada pela técnica de Folin (Lowry *et al.*, 1951). As amostras foram analisadas à 660nm (Sp-2000 UV Spectrum UV-VIS Spectrophotometer - Shanghai, China) e como padrão foi utilizado soro albumina bovina (BSA) fração V (Sigma Chemical Co., USA) 1mg/mL.

Purificação e Análise de hMM Ag

Amostra de CFA Pb18 (12 mL) foi aplicada em Coluna de Sephadex G-200 seguida de eluição de PBS 0,15M pH 7,4. As frações obtidas foram analisadas à 280nm (Sp-2000 UV Spectrum UV-VIS Spectrophotometer - Shanghai, China). Amostra de fração hMM Ag (1mg/mL) e padrão de massa molecular pré-corado foram submetidos à SDS-PAGE (gel gradiente 5-15%). Após a corrida, em tampão tris glicina 1M (Pharmacia biotec – Sweden e Sigma Co., Germany), pH 8,2 a 100V, o gel foi colocado em solução de TCA (ácido tricloroacético – Sigma Co, USA) a 10% por 30 minutos. Foram realizadas lavagens de 10 minutos com solução de etanol 10% (Vetec, Rio de Janeiro/RJ-Brasil) com ácido acético 5% (Nuclear,

Diadema/SP-Brasil). Em seguida foi mantido em solução oxidante contendo ácido nítrico 3,2mM (Sigma Chemical Co., USA) e dicromato de potássio 3,4mM (Chemco,Campinas/SP-Brasil) por 5 minutos. Após foi lavado com água destilada por 5 minutos. A seguir, foi adicionado solução de nitrato de prata 12mM (Nuclear, Diadema/SP-Brasil) por 20 minutos. Após, foi lavado com água destilada e a revelação do gel realizada com solução de carbonato de sódio 280mM (Nuclear, Diadema/SP-Brasil) e formaldeído 0,019% (Sigma Chemical Co., USA), e o bloqueio com solução de ácido acético 5%, realizado após a detecção das bandas.

Infecção Experimental em Murinos com Pb18

Camundongos machos da linhagem BALBc, com idade entre seis a oito semanas (25 a 30 g), foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL. Os animais foram mantidos em salas isoladas, ambiente climatizado com alimentação e água a vontade e iluminação controlada (ciclo de 12h claro-escuro). Os camundongos foram inoculados com 0,2 mL de solução salina contendo 10^6 células de Pb18 na fase leveduriforme, por via endovenosa. As amostras de sangue foram coletadas após 28 dias de infecção. Para controle, camundongos sem infecção receberam 0,2 mL de PBS e foram mantidos por 28 dias nas mesmas condições.

Para analisar o potencial de utilização de fração de hMM como prognóstico da PCM, foram utilizadas as amostras de camundongos BALBc infectados e tratados com CsA. Esses camundongos foram infectados com 10^6 células de Pb18 (100 μ L) por via endovenosa e tratados com 10mg/Kg de CsA (grupo Pb/CsA). Como controles foram utilizadas amostras de plasmas de camundongos somente infectados (grupo Pb), somente tratados com CsA (Grupo CsA) e somente tratados com PBS (grupo PBS). Os animais dos grupos CsA receberam 100 μ L de CsA na dose de 10 mg/Kg (SANDIMMUN[®], 50 mg/mL, Novartis Farma - Produtos Farmacêuticos, S.A.) pela via subcutânea em dias alternados por todo o período do experimento. Esse procedimento foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Estadual de Londrina.

Camundongos machos ddY de seis semanas (Nihon SLC Co, Ltda, Shizuoka, Japão) foram mantidos em ambiente climatizado ($25\pm 1^\circ\text{C}$) e controlado

(umidade $55\pm 5\%$), alimentados *ad libidum*. Os camundongos foram inoculados com 0,2 mL de solução salina contendo 10^6 células de Pb18 na fase leveduriforme, por via endovenosa. As amostras de sangue foram coletadas após 28 dias de infecção. Para controle, camundongos sem infecção foram mantidos por 28 dias nas mesmas condições, conforme as normas adotadas pelo comitê de sanidade animal da Faculdade de Medicina, Universidade de Chiba, Japão.

Obtenção de Amostras de Soro/Plasma

Amostras de sangue de camundongos BALBc (item acima) foram obtidos após 28 dias de infecção e os soros respectivos obtidos foram armazenados a -80°C até o momento de uso. Amostras de plasma de camundongos ddy foram provenientes da Universidade de Chiba (descrição no item anterior) e transportados (congelados) para o laboratório de Imunologia Aplicada, CCB, UEL armazenados a -80°C até o momento de uso.

ELISA Indireto Para Detecção de IgG anti-hMM Ag e gp43

Placas de 96 orifícios foram sensibilizadas com hMM (obtido por cromatografia descrito anteriormente) ou gp43 (obtido por cromatografia de afinidade segundo Camargo et al., 1991) ($100\mu\text{L}/\text{poço} - 25\mu\text{g}/\text{mL}$) diluída em solução tampão de carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6 e incubados por 1 hora a 37°C e a 4°C *overnight*. A seguir, as placas foram lavadas com tampão lavagem (leite mólico 0,5% com tween 20 em PBS 0,15M) por 4 vezes e bloqueadas com tampão bloqueio (leite mólico 5% com tween 20 em PBS 0,15M) por 1 hora a temperatura ambiente. Após mais uma lavagem, $100\mu\text{L}$ de cada amostra de plasma foi aplicada em cada poço na diluição de 1/10, incubada por 1 hora a 37°C . As placas foram novamente lavada com tampão lavagem e adicionados $100\mu\text{L}$ de conjugado anti-IgG de camundongo peroxidase (Sigma Chemical Co., USA), diluído 1: 4000 em tampão diluição. Após 1 hora e 30 minutos a 37°C a placa foi lavada e a reação evidenciada com solução OPD (O-phenylenediamine Dihydrochloride – Sigma Chemical Co., USA) em tampão substrato e peróxido de hidrogênio, sendo interrompida com ácido sulfúrico 4N após 30 minutos. A absorbância foi determinada por leitura a 492nm.

ELISA Captura Para Detecção de hMMAg e gp43 Circulante

Para realização do ELISA de captura, foram utilizadas placas de 96 orifícios sensibilizados com IgG de coelho anti- hMMAg ou anti-gp43 (100µL/poço - 50µg/mL) diluído em solução tampão de carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6 incubados por 1 hora a 37°C e a 4°C overnight. A seguir, as placas foram lavadas com tampão lavagem (leite mólico 0,5% com tween 20 em PBS 0,15M) por 4 vezes e bloqueadas com tampão bloqueio (leite mólico 5% com tween 20 em PBS 0,15M) por 1 hora a temperatura ambiente. Após nova lavagem, 100µl de cada amostra de plasma foi aplicada em cada poço na diluição de 1/10, incubada por 2 hora a 37°C. Após a incubação, as placas foram novamente lavadas com tampão lavagem e adicionados 100µl de IgG policlonal de camundongo anti- hMM Ag ou anticorpo monoclonal de camundongo anti-gp43 e incubado por 1 hora. A seguir foi feita nova lavagem com tampão lavagem e adicionado 100µl de conjugado anti-IgG de camundongo peroxidase (Sigma Chemical Co., USA), diluído 1: 4000 em tampão diluição, seguida de mesmo procedimento anteriormente descrito.

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados por software GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPadSoftware, San Diego, Califórnia, EUA), utilizando análise ANOVA para verificar a interação entre infecção e tratamento, teste Tukey-Kramer foi utilizado para identificar diferenças entre os grupos, considerando $p < 0,05$ significativo.

4 RESULTADOS

- Obtenção e análise de hMM

O perfil espectrofotométrico das frações de CFA Pb 18 em coluna Sephadex G-200, a 280nm está mostrado na figura 1a. O primeiro pico (tubo 11) foi considerada a fração de hMM, denominada de F11 e detectada (~380kDa) por SDS-PAGE utilizando coloração de nitrato de prata (figura 1b).

- Avaliação de Níveis séricos de IgG anti-gp43 e IgG anti-hMM em camundongos BALBc e ddY

Os resultados apresentados demonstraram aumento significativo no nível de IgG anti-gp43 em camundongos BALBc ou ddY infectados em relação aos seus controles não infectados ($p < 0,05$) (figura 2a). Aumento significativo também foi observado com o nível de IgG anti-hMM em camundongos infectados, em relação aos controles não infectados, em ambas as linhagens (figura 2b) ($p < 0,05$).

- Avaliação de níveis séricos de IgG anti-gp43 e IgG anti-hMM em camundongos BALBc infectados e tratados ou não com CsA.

Os resultados demonstrados na figura 3 mostram que o grupo Infectado com Pb18 e tratado com CsA apresenta uma diminuição significativa nos níveis tanto de IgG anti-gp43 (figura 3a) quanto de IgG anti-hMM (figura 3b) em relação ao grupo Infectados e não tratados ($p < 0,05$).

- Avaliação de níveis plasmáticos de antígeno gp43 e de hMM em camundongos BALBc infectados e tratados ou não com CsA.

Os resultados apresentados demonstraram níveis inferiores de gp43 e de hMM circulantes em camundongos infectados e tratados com CsA em relação aos seus grupos controles não infectados e não tratados (figuras 3c e 3d). ($p < 0,05$).

Figura 1 - Perfil espectrofotométrico a 280nm de frações de CFA de Pb18 obtidas por cromatografia em coluna Sephadex G-200: fração 11 corresponde ao hMMAg (figura 1a) . Resultado de eletroforese em gel de poliácridamida (5-15%) de hMMAg (A) apresentando uma banda com aproximadamente 380kDa em fração hMMAg (A) e de banda de ~380kDa e de gp43 amostra de CFA (B) (Figura 1 b).

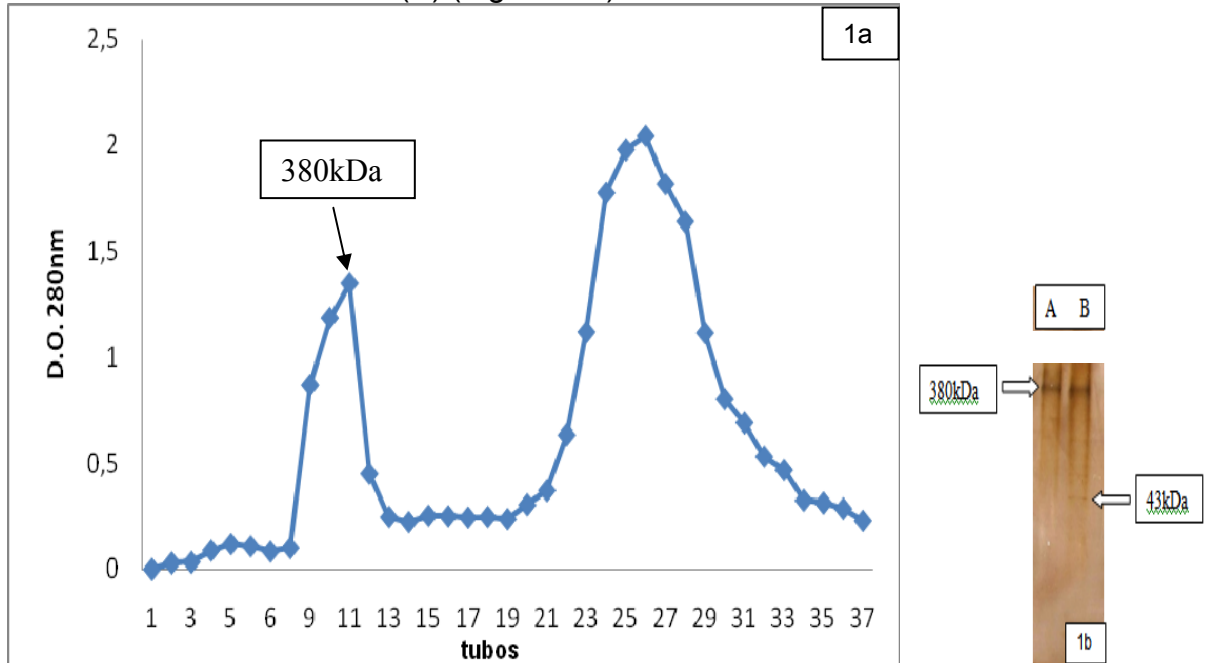


Figura 2 – Níveis de IgG anti-gp43 em plasma de camundongos ddY e camundongos BALBc (figura 2a) e de IgG anti-hMM em plasma de camundongos ddY e camundongos BALBc (figura 2b). Dados expressos em densidade óptica (D.O.) a 492nm em grupo de camundongos infectados (Pb) e não infectados (controle). Valores significativos sendo obtidos por teste T ($p < 0,05$).

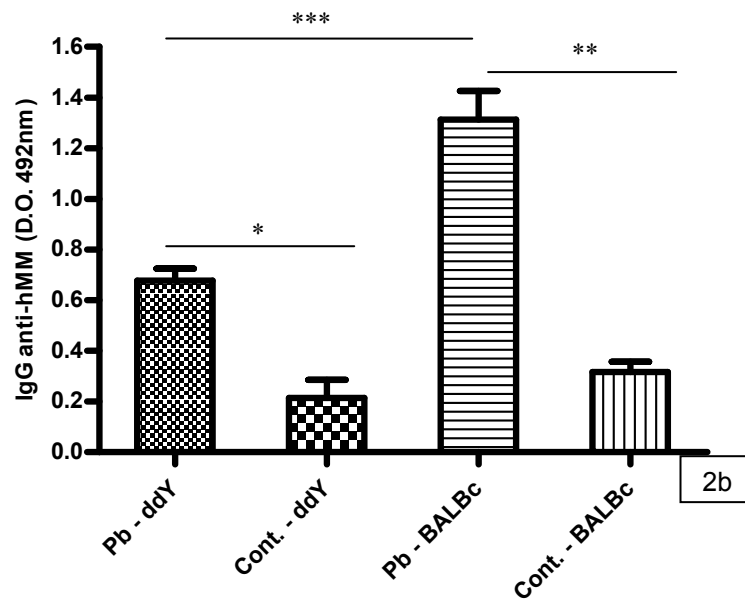
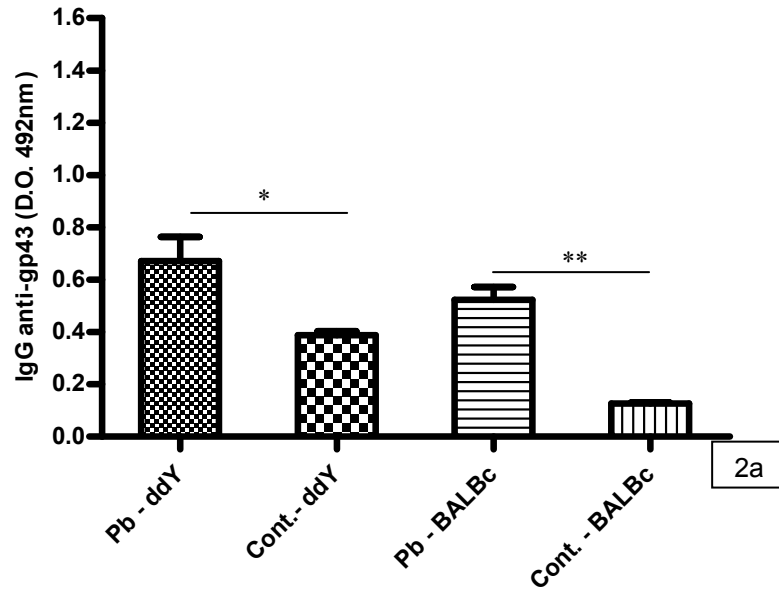
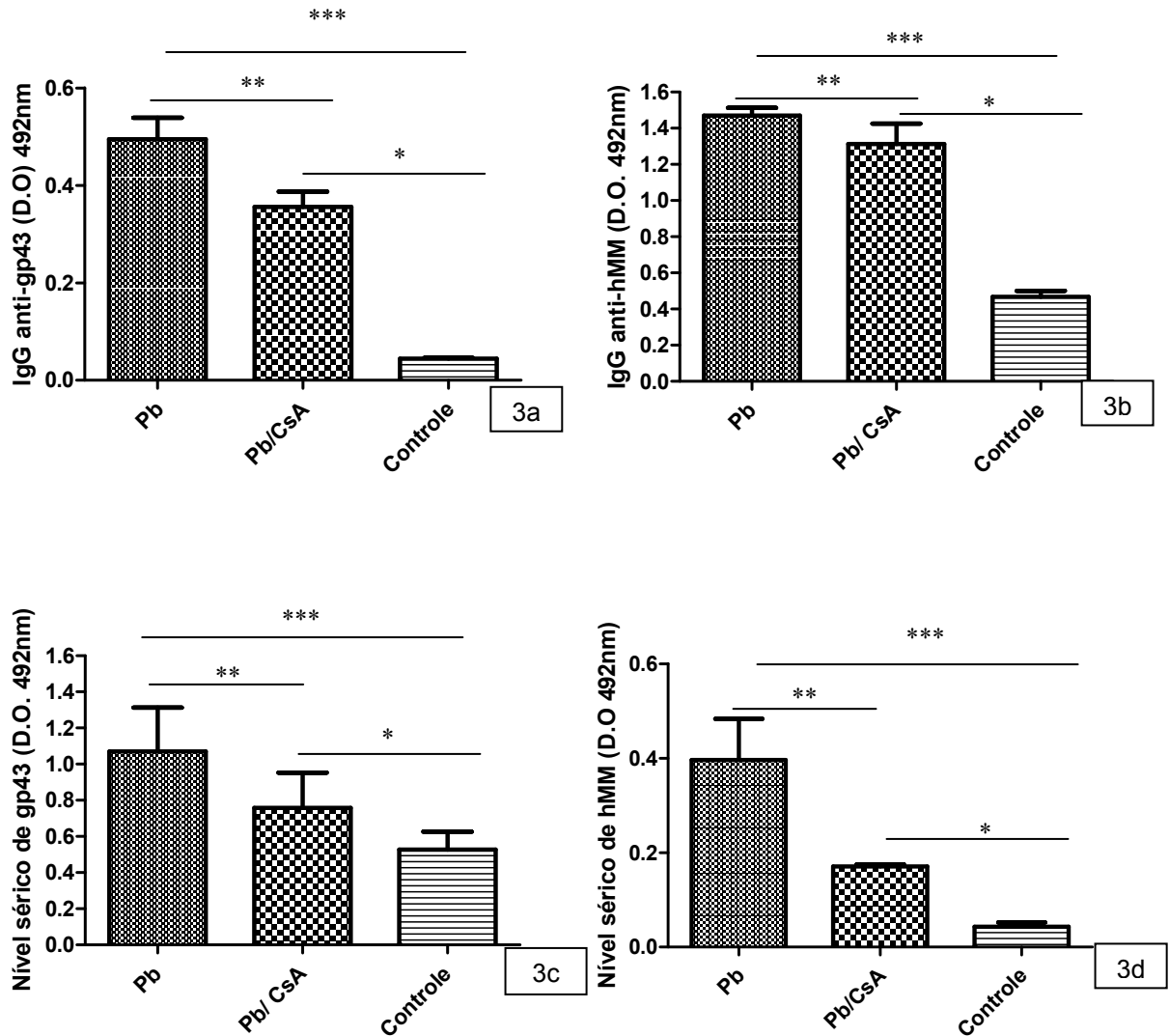


Figura 3 - Níveis de IgG anti-gp43 (figura 3a) e de IgG anti-hMM (figura 3b) em plasma de camundongos BALBc infectados e não tratados (Pb), infectados e tratados com CsA (Pb/CsA) e não infectados e não tratados (controle). Determinação de gp43 (figura 3c) de hMM (figura 3d) em plasma de camundongos BALBc infectados e não tratados (Pb), infectados e tratados com CsA (Pb/CsA) e não infectados e não tratados (controle).



Dados expressos em densidade óptica (D.O.) a 492nm. Valores significativos sendo obtidos pela análise de ANOVA – Tukey Kramer ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Inicialmente a avaliação de nível de IgG foi realizada em camundongos ddY e camundongos BALBc, sendo o primeiro diferentemente do segundo, mantidos em biotério livre de patógenos. E os resultados obtidos (figura 2) demonstraram aumento no nível de IgG anti-hMMAg em ambas as linhagens. Embora a pesquisa de IgG anti-hMMAg com a linhagem de camundongo ddy seja a primeira investigação, com os camundongos BALBc já foram investigados anteriormente e os nossos resultados estão de acordo com os de Pavanelli et al (2007) e Kaminami (2006).

Mesmo considerando hMMAg como inespecífico quando se pesquisa anticorpo, a investigação da sua presença no soro poderia auxiliar no acompanhamento de tratamento da PCM. Assim, no presente trabalho foi introduzida a metodologia de ELISA captura para determinação de nível de hMMAg circulante, sendo observado aumento no nível de hMMAg em ambas as linhagens de camundongos (ddY e BALBc), sugerindo a viabilidade de se utilizar essa referida metodologia para investigação de hMMAg circulante.

Como modelo de PCM doença menos grave foram utilizados camundongos BALBc tratados com CsA (figura 3), tendo como parâmetro a gp43 já intensamente investigada por diversos autores. Nesses animais tratados com CsA foram observados níveis inferiores de IgG anti-hMM como de IgG anti-gp43. A eficácia de CsA na proteção na PCM experimental foi observada por Massuda e colaboradores (2011) pelo número de CFU obtidos de pulmão, fígado, rim e baço, evidenciando que o tratamento com CsA diminui notavelmente a o número de leveduras encontradas nos tecidos. Estes autores demonstraram ainda a ação protetora da CaN com a diminuição de carga fúngica, de IgG anti-gp43 e de gp43 circulante em modelo experimental de PCM em camundongos.

Assim os nossos resultados sugerem o potencial de se utilizar IgG anti-hMMAg como a IgG anti-gp43 como prognóstico ou para monitoramento de tratamento de PCM. O nível elevado de IgG anti-hMMAg em camundongos tratados com CsA, forma menos grave do que o grupo somente infectado está de acordo com o nível de IgG detectado por Marquez et al (2003) em grupo de PCM crônica, menos grave, em relação a forma aguda, mais grave.

Segundo Marques da Silva e colaboradores(2004), um dos principais desafios na PCM é estabelecer quando o médico deve interromper a terapia antimicótica, porque não há consenso sobre as opções de tratamento ou sobre quando o paciente está realmente curado. O nível de anticorpos específicos é utilizado como um marcador da gravidade da doença bem como um avaliador para respostas ao tratamento (Franco *et al.*1989, Shikanai-Yassuda *et al.*, 2008). Embora a literatura defenda que a detecção de anticorpos circulantes específicos seja um importante parâmetro para definir o tempo de interromper o tratamento antifúngico, os títulos de anticorpos não se correlacionam necessariamente, com o estado clínico do paciente. Em alguns casos, títulos elevados de anticorpos foram observados até ao final do tratamento, quando os pacientes estejam clinicamente curados. Por outro lado, embora na maioria dos pacientes, baixos níveis de anticorpos estão relacionados com a ausência de sintomas clínicos, em alguns casos títulos baixos estão presentes durante meses e em conjunto com os sintomas clínicos. Por isto os mesmos autores introduziram a metodologia de determinação de nível de gp43 circulante por ELISA de inibição (Gomez, et al, 1997) com potencial para ser usado no monitoramento de pacientes com PCM em tratamento. Embora sejam necessários estudos adicionais de determinação de nível de hMM utilizando drogas anti-fúngicas convencionais e outras pesquisas adicionais, o resultado obtido com camundongos tratados com CsA, sugere o potencial de se utilizar hMMAg circulante como novo marcador biológico para monitoramento de tratamento ou para o prognóstico da PCM doença.

A pesquisa de hMMAg é relevante pelo fato de que esta glicoproteína apresenta potencial de ser utilizada no diagnóstico diferencial de PCM humana, aguda e crônica, uma vez que, apresenta a capacidade de induzir a resposta imune celular com perfil de resposta Th1 e com indução de proteção em modelo experimental murino de PCM (Pavanelli *et al.*, 2007), além do potencial para prognóstico ou monitoramento de tratamento da PCM (resultados apresentados neste trabalho).

Assim, trabalhos futuros de investigação de hMM correlacionado com a gp43 na interação parasita-hospedeiro em associação de agentes antifúngicos como a CsA podem contribuir para melhor compreensão da patogênese bem como levar a descoberta de um novo agente imunoterapêutico, considerando a sua capacidade de induzir a produção de INF- γ .

6 CONCLUSÃO

1. Ocorre aumento no nível de IgG anti-hMMAg circulante em camundongos ddY e BALBc infectados com *P. brasiliensis*.
2. O nível de hMMAg pode ser determinado por técnica de ELISA de captura.
3. Ocorre aumento no nível de hMMAg circulante em camundongos ddY e BALBc infectados com *P. brasiliensis*.
4. O tratamento de camundongos BALBc com a CsA induz diminuição no nível de IgG anti-hMMAg e de acordo com a literatura também a diminuição no nível de IgG-anti-gp43 circulantes na PCM experimental.
5. O tratamento de camundongos BALBc com a CsA induz diminuição no nível de hMMAg e de acordo com a literatura também a diminuição no nível de gp43 circulantes na PCM experimental.
6. Embora sejam necessários estudos adicionais, esses resultados sugerem o potencial de se utilizar IgG anti-hMMAg ou hMMAg circulantes como prognóstico ou para monitoramento de tratamento de PCM.

REFERÊNCIAS

- BERNARD, G. et al. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.54, n.1, p.7-12, 1996.
- BERNARD, G. et al. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *The Journal of Infectious Disease*, v.157, n.5, p.1263-1267, 1997.
- BERNARD G. et al. Severe juvenile type paracoccidioidomycosis in an adult. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v.33, p. 67-71, 1995.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESPRETO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical Microbiology Reviews*. Ver., v.6, n.2, p. 89-117, 1993.
- BLOTTA, M.H. et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region, São Paulo. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.61, n.3, p. 390-394, 1999.
- CALICH, V.L.; KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.31, n.5, p. 615-623, 1998.
- CALICH, V.L. et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *British Journal of Experimental Pathology*, v.66, n.5, p.585-594, 1985.
- CAMARGO, Z.P. et al. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v.29, p.31-38, 1991.
- CAMPOS, C.B. et al. Evidence for the role of calcineurin in morphogenesis and calcium homeostasis during mycelium-to-yeast dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell*, v. 7, n.10, p.1856-64, 2008.
- CANO, L.E. et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infection and Immunity*. v. 66, p.800-806, 1998.
- DE CARVALHO, M.J.A. et al. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 39, p.204-210, 2003.
- DERKX, P.M.; MADRID, S.M. The *Aspergillus niger* cypA gene encodes a cyclophilin that mediates sensitivity to the immunosuppressant cyclosporin A. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 266, n.4, p.527-36, 2001.
- FERNANDES, V.C. et al. Additive Effect of rPb27 Immunization and Chemotherapy in Experimental Paracoccidioidomycosis. *PloS ONE*, v. 6, n.3, p.e17885, 2011.
- FERNANDES, L. et al. Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis* - inferred from comparisons with other fungi. *Genetics and Molecular Research*. v. 4, p. 216-231, 2005.

FERREIRA, K.S. et al. Dendritic Cells Transfected with scFv from Mab 7.B12 Mimicking Original Antigen gp43 Induces Protection against Experimental Paracoccidioidomycosis. *PLoS ONE*, v. 6, n.1, p. e15935, 2011.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of this clinical forms. *Revista da Sociedade Médica Tropical*, v.20, p.129, 1987.

FRANCO M.F. et al. Paracoccidioidomycosis, *Baillière's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases*, v. 4, p. 185-220, 1989.

GARRETT-ENGELE, P.,B.; MOILANEN, AND M. S. Cyert. Calcineurin, the Ca²⁺/calmodulin- dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H⁺-ATPase. *Molecular and Cellular Biology*, v. 15, p.4103–4114, 1995.

GOMEZ, B.L. et al. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.12, p. 3278-3283, 1997.

HAHN, R.C.; HAMDAN, J.S. In vitro susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs. *Mycoses*, v.43, n.11-12, p.403-7, 2000.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M., Virulence factors of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, v.9, n.4, p.469-488, 1996.

KAMINAMI, M. S., Caracterização bioquímica e imunológica de sub-frações de antígeno de alta massa molecular de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2006

LIU, J. et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. v. 66, p. 807–815, 1991.

LIU, M. et al. Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. *Eukaryot Cell*, v. 5, p. 1788–1796, 2006.

LONDERO, A. T. Paracoccidioidomicose: Patogenia, formas clinicas, manifestações pulmonares e diagnostico. *Jornal de Pneumologia*, v.12, p.41-57, 1986.

LONDERO, A. T., AND I. S. MELO. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. *Mycopathologia*, v.82, p.49-55, 1983.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C.D.; LOPES, J.O.S. Progressive pulmonary paracoccidioidomycosis: a study of 34 cases observed in Rio Grande do Sul (Brazil). *Mycopathologia*, v.63, p.53-56, 1978.

LOOSE, D. S. et al. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.80, n.24, p. 7659-63, 1983.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-275, 1951.

MAMONI R.L.; BLOTTA M.H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine*, v. 32, p. 20-9, 2005.

MARQUEZ, A.S. et al. Reactivity of acute and chronic paracoccidioidomycosis patients' sera to high mass molecular components of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: XXVIII Meeting of the Brazilian Society of Immunology, *Revista da Sociedade Brasileira de Imunologia*, 2003.

MARQUEZ AS. Et al. Reactivity of antibodies from patients with acute and chronic paracoccidioidomycosis to a high-mass molecular antigen from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*; v. 19, p. 199–204, 2005.

MARQUEZ-DA-SILVA, S.H. et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow up of patients undergoing antimycotic therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.10, p. 4480-4486, 2004.

MASSUDA T.Y.C. et al. Cyclosporin A Treatment and Decreased Fungal Load/Antigenemia in Experimental Murine Paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, v. 171, p.161–169, 2011.

MENDES, R.P. The gamut of clinical manifestations. In: Franco, M.; Silva-Lacaz, C.; Restrepo-Moreno, A. Paracoccidioidomycosis, 2ed, *CRC Press*, p. 223-258, 1994.

MORAIS, F.V. et al. Polymorphism in the Gene Coding for the Immunodominant Antigen gp43 from the Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 11, p. 3960-3966, 2000.

NUNES, L.R. et al. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell*, v.4, p.2115–2128, 2005.

ODOM, A. et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO Journal*, n.16, p.2576–2589, 1997.

OLIVEIRA, S.J. et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes and Infeccion*, v.4, n.2, p.139-144, 2002.

ONYEWU, C. et al. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.47, p.956–964, 2003.

PAVANELLI, W.R. et al. Protection induced in BALB/c mice by the High-Molecular-Mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*, n.163, p.117-128, 2007.

PEITER, E. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* Ca²⁺ channel Cch1p/Mid1p is essential for tolerance to cold stress and iron toxicity. *FEBS Letters*, n. 579, p.5697–5703, 2005.

POPI, A.F.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cellular Immunology*, v.218, n.1-2, p. 87-94, 2002.

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

QUEIROZ-TELLES, F.; *Paracoccidioides brasiliensis* ultraestrutura findings. In: Franco, M.; Silva-Lacaz, C., Restrepo-Moreno, A. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, p. 27-49, 1994.

RESTREPO A, TOBÓN AM. *Paracoccidioides brasiliensis*. in: , Mandell GE, Benzett JE, Dollin R. Principles and practice of infectious diseases. 6 ed., PA: Elsevier. p.3062–3068, 2005.

RESTREPO A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infection and Immunity*, n.46, v.2,p.346–353, 1984.

RESTREPO, A. et al. The gamut of paracoccidioidomycosis. *The American Journal of Medicine*, v.61, p.33-41, 1976.

RESTREPO, A. et al. Paracoccidioidomycosis. A study of 39 cases observed in Medellin, Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.19, p.68-76, 1970.

SAN-BLAS, G., Biochemical and Physiological aspects um the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arcives of Medical Research*, v.24, n.3, p.267-268, 1993.

SAN-BLAS F & SAN-BLAS G. et al. Paracoccidioidomicose – blastomicose sul-americana Ed. Sarvier- EDUSP., p.35-58, 1982.

SANGLARD, D. et al. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Molecular Microbiology*, v.48, p.959–976.2003

SHIBASAKI, F.; HALLIN, U.; UCHINO, H. Calcineurin as a multifunctional regulator. *The Journal of Biochemistry*, v. 131, n.1, p.1-15, 2002.

SHIKANAI-YASUDA, M.A. et al. Neoplasia and paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, v. 165, p. 303-312, 2008.

SHIKANAI-YASUDA, M.A. et al. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39, n.3, p.297-310, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M.A. et al. Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology*, v.40, n.4, p.411-7, 2002.

SINGER-VERMES, L.M. et al. *Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. Clinical Experimental Immunology*, v.94, n.1, p.75-79, Oct, 1993.

STIE, J.; FOX, D. Calcineurin regulation in fungi and beyond. *Eukaryot Cell*, n.7, p.177–186. 2008

TERRA, G.M.F. et al. Paracoccidioidomicose em crianças. ABP. *Arquivo Brasileiro de Medicina*, v.65, p.8-15, 1991.

VAZ, C. A.C. et al. Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis. *Clinical and Experimental Immunology*, v.88, n.1, p.119-123, 1992.

VILADEVALL, L. et al. Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 15; v.279, n.42, p.43614-43624. 2004

VISBAL, G. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. *Current Drug Targets Infect Disorders*, v.5, p.211–226, 2005

XIANG, B.Q. et al. The role of loop 7 in mediating calcineurin regulation. *Oxford Journals: Protein Engineerin design & selection*, v.16, n.11, p.795-8, 2003.

WANG, P.; HEITMAN, J. The cyclophilins. *Genome Biology*, v.6, p.226, 2005.

WATANABE, Y., PERRINO, B. A.; SODERLING, T. R. Activation of calcineurin A subunit phosphatase activity by its calcium-binding B subunit. *Biochemistry*, v.35, p.562–566. 1996.