



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FABIANA FELIPIN RIGOBELLO

**DETERMINAÇÃO DE NÍVEL SÉRICO DE IgE ANTI – gp70
NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA**

Londrina
2011

FABIANA FELIPIN RIGOBELLO

**DETERMINAÇÃO DE NÍVEL SÉRICO DE IgE ANTI - gp70 NA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano.
Co-orientadora: Profa. Dra. Audrey de Souza Marquez.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia do Departamento de Ciências Patológicas – CCB, Universidade Estadual de Londrina, com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), PPSUS/Fundação Araucária e PROPPG/UEL.

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R572d Rigobello, Fabiana Felipin.
Determinação de nível sérico de IgE anti – gp70 na paracoccidiodomicose humana / Fabiana Felipin Rigobello. – Londrina, 2011.
57 f. : il.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.

Co-orientador: Audrey de Souza Marquez.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Paracoccidiodomicose – Teses. 2. Paracoccidiodes Brasiliensis – Teses. 3. Antígenos de fungos – Teses. 4. Resposta imune – Teses. 5. Micoses fungóides – Teses. 6. Virulência (Microbiologia) – Teses. I. Itano, Eiko Nakagawa. II. Marquez, Audrey de Souza. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 616.993

FABIANA FELIPIN RIGOBELLO

**DETERMINAÇÃO DE NÍVEL SÉRICO DE IgE ANTI - gp70 NA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nelson Figueiredo Mendes
UNIFESP – São Paulo – SP

Prof. Dr. Mario Augusto Ono
UEL – Londrina – PR

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

Londrina, 18 de fevereiro de 2011.

Dedico

Àqueles que sempre acreditaram no meu sucesso e me apoiaram com imenso amor.

Agradeço

À Deus por me dar saúde e persistência para a concretização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, que sempre disposta, amiga e solidária colaborou de maneira imprescindível para meu crescimento profissional;

À minha co-orientadora Audrey de Souza Marquez pela amizade, compreensão e grande contribuição para a realização e sucesso deste trabalho.

À Profa. Dra. Berenice Tomoko Tatibana pela correção deste trabalho.

Aos meus pais Aparecido A. Rigobello e Beatriz F. Rigobello pelo apoio e compreensão em todos os momentos de alegria e dificuldade.

À minha irmã Anna Maria pela revisão ortográfica e ao meu irmão pelas palavras de amor e carinho.

Mári S. Kaminami e Nilson de Jesus Carlos pelo incentivo e auxílio técnico na fase experimental deste trabalho;

Aos meus amigos e colegas de laboratório Luciene Airy Nagashima, Paula Leonello Alvares da Silva, Juliana Elisa Lima, Lilian Cristina Raio de Dio pela amizade e incentivo diário durante a execução deste trabalho;

Aos colegas de curso, Ana Flávia Leal Specian, César Armando Contreras Lancheros, Eik Hamada Sorgi, Gilselena Kerbauy Lopes, Jakeline Renata Marçon Delamuta, Kristie Aimi Yamamoto, Lílian Hattori, Luciana Cadioli Panchoni, Lucilene de Paula Lopes, Martha Viviana Torres Cely, Nagomi Kishino, Paula Galdino Cardin de Carvalho, Rosana Serpa e Silvia Emanoele Cestari, pela amizade, carinho e incentivo durante as aulas e execução deste trabalho.

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

RIGOBELLO, Fabiana Felipin. **Determinação de nível sérico de IgE anti - gp70 na paracoccidiodomicose humana.** 2011. 57f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides Brasiliensis* é o agente causador da paracoccidiodomicose (PCM). A resistência na PCM está relacionada a resposta imune celular (Th1), enquanto a susceptibilidade está relacionada à intensa resposta imune humoral (Th2) com aumento no nível de IgE. Considerando a possibilidade de envolvimento de gp70 de *Paracoccidioides Brasiliensis* na resposta Th2, no presente trabalho foi proposto determinar os níveis de IgE anti-gp70 em amostras de soro humano. Como fonte desse antígeno foi utilizado preparado de antígeno somático de *P. Brasiliensis*. Amostras foram submetidas à cromatografia em gel de filtração (Sephadex G-150/120) e as frações contendo gp70 detectadas por *western blotting* e refracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O grau de pureza foi determinado por *Western blot*. O nível sérico de IgG e IgE anti-gp70, foi determinado por ensaio imunoenzimático (ELISA) com soros de pacientes com PCM na forma crônica (n=20) e doadores normais (n =20). Adicionalmente foram determinados os níveis séricos de IgE anti-exoantígeno e IgG total, por ELISA, em 12 amostras de soros de pacientes com PCM e, a seguir realizadas as análises de correlação de Pearson com o nível de IgE anti-gp70. Os resultados obtidos demonstraram nível significativamente mais elevado de IgE e IgG a gp70 em grupo de pacientes com PCM em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). E as análises de correlação de Pearson demonstraram forte correlação entre o nível de IgE anti-gp70 e o nível de IgE anti-exoantígeno ($r= 0,7032$) e nível de IgG anti-gp70 com o nível de IgG total ($r=0,7542$). Concluímos pelos resultados obtidos que o aumento no nível de IgE sugere que a gp70 apresenta o potencial de indução de resposta Th2. A correlação com alguns marcadores utilizado no diagnóstico e monitoramento da PCM sugere o potencial da gp70 também como marcador biológico para o monitoramento da PCM, o que requer estudos adicionais.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose. Fator de virulência. Antígeno somático. Anticorpos. gp70.

RIGOBELLO, Fabiana Felipin. **Determination of IgE anti-gp70 serum levels in human paracoccidioidomycosis**. 2011. 57f. Dissertation (Master of Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The dimorphic fungus, *Paracoccidioides Brasiliensis* (Pb), is the causative agent of Paracoccidioidomycosis (PCM). The resistance in PCM is associated with cellular immune response (Th1), while susceptibility is related to the intense humoral immune response (Th2) with increase IgE levels. Considering the possibility of participation of gp70 of *P. Brasiliensis* in the Th2 response, the present study was designed to determine human serum levels of IgE antibodies anti-gp70. *P. Brasiliensis* (pb339) somatic antigen (SA) was used as the source of antigen, once it showed the highest concentration of gp70. SA Ag samples were subjected to gel filtration chromatography (Sephadex G-150/120) for this analysis. Fractions containing gp70 detected by Western blot were re-fractionated by gel electrophoresis Polyacrylamide (SDS-PAGE). The antigen purity was determined by Western blotting. Serum IgG and IgE anti-gp70 was determined by enzyme-linked immunosorbent assay with sera from chronic PCM patients (n=20) and normal donors (n=20). Additionally, were determined the serum levels of IgE anti-Exoantigen and total IgG, in 12 serum samples from patients with PCM, by ELISA, and then performed statistical analysis using Pearson correlation test with IgE anti-gp70 level. The results showed significantly higher levels of IgE and IgG antibodies to gp70 in the group of patients with PCM in relation of the control group ($p < 0.05$). And the analysis of Pearson correlation showed a strong correlation between the level of IgE anti-gp70 and the level of IgE anti-exoantigen ($r = 0.7032$) and the level of IgG anti-gp70 with the level total IgG ($r = 0.7542$) in serum samples from patients with PCM. We conclude by the results that the increase in IgE levels suggests that gp70 has the potential to induce Th2 response. The correlation with some markers used in diagnosis and monitoring of PCM suggests the potential of gp70 as a biological marker for diagnosis and or monitoring of PCM, which requires further investigation.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Factor of virulence. Somatic antigen. Antibodies. gp70.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de purificação de gp70	29
Figura 2 – Resultado de <i>western blotting</i> de AS e CFA de <i>P. Brasiliensis</i>	35
Figura 3 – Resultado do <i>Western blotting</i> (SDS-PAGE 7,5%)	36
Figura 4 – Resultado de <i>western blotting</i>	37

LISTA DE TABELA E GRÁFICO

Gráfico 1 – Perfil espectrofotométrico a 280nm de frações obtidas por cromatografia em <i>Sephadex</i> G-150/120 de AS.....	36
Gráfico 2 – Determinação do nível de IgG anti-gp70 por ELISA.....	38
Gráfico 3 – Determinação do nível de IgE anti-gp70 por ELISA.....	39
Gráfico 4 – Resultado da correlação de Pearson	40
Gráfico 5 – Resultado da correlação de Pearson	40
Gráfico 6 – Correlação entre IgG e IgE anti-gp70.....	41
Tabela 1 – Elisa IgG e IgE anti-gp-70 de <i>P. Brasiliensis</i>	38

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
mL	Mililitros
nm	Nanômetros
Ag	Antígeno
Ag7	Exoantígeno de <i>Paracoccidioides Brasiliensis</i>
Anti-gp43	Anticorpo contra a glicoproteína de 43 quilodaltons
AS	Antígeno somático
CD4	Conjunto de diferenciação CD4 (Linfócitos T CD4+)
CD8	Conjunto de diferenciação CD8 (Linfócitos T CD8+)
CFA	Antígeno livre de células (Cell Free Antigens)
CIC	Imunocomplexo circulante
EBP	Proteína ligadora de estrogênio (Estrogen binding protein)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme-linked immunossorbent assay)
ExoAg	Exoantígeno
gp43	Glicoproteína de 43 quilodaltons
gp70	Glicoproteína de 70 quilodaltons
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IgA	Imunoglobulina A
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
INF	Interferon
INF-γ	Interferon gama

kDa	Quilodalton
MM	Massa molecular
N	Normal
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT/BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato mais nitro-azul tetrazolio
PBS	Tampão salino fosfato pH 7,2(saline-phosphate buffered, pH 7,2)
PCM	Paracoccidiodomicose
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)
PMSF	Alfa-tolueno-sulfonilfluoreto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel poliacrilamida com SDS (Polyacrylamide gel electrophoresis with SDS)
SHN	Soro humano normal
Th1	Linfócito T “helper” (auxiliar) 1
Th2	Linfócito T “helper” (auxiliar) 2
TNF	Fator de necrose tumoral (Tumor factor necrosis)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	<i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS</i> : VISÃO GERAL E EPIDEMIOLOGIA.....	16
2.2	FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>P. BRASILIENSIS</i>	17
2.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE	20
2.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA PCM	22
2.5	RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO	23
3	OBJETIVOS	26
3.1	GERAL	26
3.2	ESPECÍFICOS	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	27
4.2	OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL E SOMÁTICO.....	27
4.3	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE <i>SEPHADEX G-150-120</i>	28
4.4	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS (SDS-PAGE) PARA PURIFICAÇÃO DE <i>GP70</i>	28
4.5	ANÁLISE DE CFA E AS POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	29
4.6	IMUNOBLOTTING DE AS PARA DETECÇÃO DE <i>GP70</i> POR IGE DE SORO DE PACIENTES COM PCM E COM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI- <i>GP70</i>	30
4.7	DETERMINAÇÃO DA PUREZA DE <i>GP70</i>	30
4.8	ELISA PARA IGG TOTAL	30
4.9	DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE IGG ANTI- <i>GP70</i> POR ELISA.....	31
4.10	DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE IGE ANTI- <i>GP70</i> E EXOAG. DE <i>P. BRASILIENSIS</i> POR ELISA.....	31
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5	RESULTADOS	33
5.1	ANÁLISE DE CFA E AS DE <i>P. BRASILIENSIS</i> POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	33

5.2	FRACIONAMENTO DE AS DE <i>P. BRASILIENSIS</i> POR CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO	33
5.3	PURIFICAÇÃO DE GP70 DE <i>P. BRASILIENSIS</i>	33
5.4	IMUNOBLOT DE AS PARA DETECÇÃO DE GP70 POR IGE DE SORO DE PACIENTE COM PCM E COM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-GP70	33
5.5	ANÁLISE DE IGG SÉRICO ANTI-GP70 POR ELISA.....	34
5.6	ANÁLISE DE IGE SÉRICO ANTI-GP70 POR ELISA	34
5.7	CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEL DE IGE ANTI-GP70 E IGE ANTI-EXOANTÍGENO	34
5.8	CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEL DE IGG ANTI-GP70 E IGG TOTAL	34
5.9	CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEL DE IGG E IGE ANTI-GP70	34
6	DISCUSSÃO	42
	REFERÊNCIAS	45
7	CONCLUSÕES	57

1 INTRODUÇÃO

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides Brasiliensis* é o agente causador da paracoccidioidomicose (PCM), a mais prevalente micose sistêmica humana na América latina, endêmica no Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia. Esta infecção é adquirida por inalação de propágulos fúngicos encontrados em natureza, provavelmente no solo, os quais chegam aos pulmões e são convertidos para a forma de levedura. As leveduras podem tanto serem eliminadas por células imunocompetentes, como disseminadas para os tecidos através da via hematogênica ou linfática (RESTREPO, 1985; MCEWEN et al., 1987).

A PCM é caracterizada por inflamação granulomatosa, com supressão da imunidade celular e altos níveis séricos de anticorpos não protetores (SAN-BLAS, 1993). A doença pode apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas e patológicas variando de infecção pulmonar assintomática a formas graves e disseminadas (ALMEIDA et al., 1998; FRANCO et al., 1987). A forma crônica é a apresentação clínica mais comum e afeta predominantemente homens adultos, com freqüente envolvimento pulmonar, de mucosa, cutâneo e adrenal. Embora a gravidade da infecção seja devido a vários fatores, é especialmente dependente da capacidade de proteção do sistema imune do hospedeiro (FRANCO et al., 1989).

Um dos principais antígenos expresso pelo fungo *P. Brasiliensis*, a gp70, é reconhecida por 96% dos soros de pacientes com PCM (BLOTTA; CAMARGO, 1993). A gp70 é composta predominantemente de polissacarídeos (MATTOS GROSSO et al., 2003) e esta importante molécula não é somente um marcador para a doença, mas também tem habilidades imunomoduladoras *in vitro*, incluindo indução da resposta linfoproliferativa quando testado com linfócitos de pacientes com PCM (BERNARD et al., 1997) e diminuição na função de macrófagos peritoneais como a fagocitose, produção de NO e H₂O₂, (MATTOS GROSSO et al., 2003). É detectada na urina de pacientes com a forma aguda da doença (SALINA et al., 1998), e *In vivo*, anticorpo monoclonal anti-gp70 confere imunoproteção quando administrado no início ou durante a infecção por PCM em camundongo (MATTOS GROSSO et al., 2003).

Depressão da imunidade celular é comumente encontrado na paracoccidioidomicose e correlacionado com a forma aguda e progressiva da doença (MENDES; RAPHAEL, 1971; MENDES et al., 1971; MOTA et al., 1985). e

um aumento do nível de resposta imune humoral está associado com o aumento da disseminação da doença (ARANGO et al., 1982).

A resistência à infecção por *P. Brasiliensis* têm sido correlacionada à interferon- γ (IFN- γ) e outros tipos de citocinas Th1, enquanto a susceptibilidade tem sido correlacionada com a produção de citocinas tipo Th2, como interleucinas (IL)-4, IL-5 e IL-10 (OLIVEIRA et al., 2008).

A avaliação da resposta imune humoral é uma importante ferramenta para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com PCM. O nível da produção de anticorpos específicos tem sido usado pra correlacionar a gravidade da doença e monitoramento da resposta ao tratamento (FRANCO et al., 1989).

Os Métodos tradicionais para diagnóstico da PCM consistem na identificação de *P. Brasiliensis* em exame a fresco de escarro ou outro espécime clínico (como por ex. aspirado de linfonodos) e/ou por exame histopatológico. Diagnóstico imunológico utiliza a detecção de anticorpos séricos anti-gp43 (SAN-BLAS et al., 2002). Porém sabe-se que a gp43 pode desaparecer da circulação durante o tratamento (MENDES-GIANNINI et al., 1989) e gerar resultados falso-negativos (DEL NEGRO et al., 1995) ou ocasionalmente reações cruzadas (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991), provavelmente devido ao polimorfismo da gp43 (MORAIS et al., 2000)

No presente trabalho, analisar-se-á o nível de IgE anti-gp70 em soros de pacientes com PCM crônica, por ELISA. Esta é a primeira vez que se descreve a utilização de ELISA para detecção de IgE anti - gp70. Estes dados podem contribuir para a melhor compreensão do desenvolvimento da resposta Th2, uma vez que a produção de IgE está relacionado ao desvio do padrão da resposta humoral para Th2.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*: VISÃO GERAL E EPIDEMIOLOGIA

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides Brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), a mais prevalente micose sistêmica humana na América latina, endêmica no Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia (RESTREPO, 1985), sendo que 80% dos casos encontram-se no Brasil (COUTINHO, 2002). Encontra-se taxonomicamente classificado no filo Ascomycota, ordem Onygenales e família Onygenaceae (SAN-BLAS et al., 2002).

O *P. Brasiliensis* apresenta-se na forma leveduriforme em temperaturas entre 35-37°C e micelial a 25°C (LACAZ et al., 1991). Lutz (1908) foi o primeiro a relatar essa micose e Splendore (1912) a observar o dimorfismo térmico do fungo. A conversão da fase micelial do fungo para a fase leveduriforme é dependente tanto de fatores relacionados à temperatura (MEDOFF et al., 1987) quanto de fatores nutricionais (MIYAJI et al., 2003). Os clamidiósporos de *P. Brasiliensis* podem exercer um importante papel no processo de conversão da forma de micélio para levedura (MIYAJI et al., 2003). Tal transição resulta em modificações na composição da parede celular, provavelmente mediadas por enzimas de membrana (SAN-BLAS et al., 1987). Os polímeros mudam de beta-glucanos para alfa-glucanos, possivelmente para evitar que os beta-glucanos desencadeiem a resposta inflamatória (BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

Embora o fungo tenha sido encontrado no solo, geralmente em regiões classificadas como florestas montanhosas subtropicais, o entendimento de seu habitat natural é ainda limitado (NEGRONI, 1966; ALBORNOZ, 1971; SILVA-VERGARA et al., 1998). O tatu, *Dasybus novemcinctus* tem sido apontado como reservatório primário natural do *P. Brasiliensis*, encontrando-se preferencialmente em florestas úmidas e sombreadas (BAGAGLI, 1998; SILVA-VERGARA; MARTINEZ, 1999).

Em regiões endêmicas, a infecção por *P. Brasiliensis* é frequentemente adquirida antes dos 20 anos de idade, sendo que a forma sintomática da infecção é mais prevalente entre as idades de 30 e 50 anos. A incidência da PCM ocorre numa taxa de 78:1 em adultos do sexo masculino quando comparados àqueles do sexo feminino (RESTREPO et al., 1984).

No Brasil, estima-se que a incidência anual é de 1 a 3 casos por 100 mil habitantes em áreas com alta endemicidade, com coeficiente de mortalidade de 1,45/milhão de habitantes (RESTREPO, 2001; COUTINHO et al., 2002).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *P. BRASILIENSIS*

No caso de fungos patogênicos, pode-se considerar como fatores de virulência alguns componentes da parede celular como, por exemplo, a α -(1,3)-glucana (SAN-BLAS; VERNET, 1977); moléculas de adesão aos tecidos do hospedeiro (VARTIVARIAN, 1992), observadas em leveduras de *P. Brasiliensis*, bem como em outros fungos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus neoformans* (JIMENEZ-LUCHO et al., 1990; KLEIN et al., 1993); produção de enzimas como proteinases, lípases e fosforilases, importantes para a nutrição e invasão do fungo nos tecidos (ODDS, 1985; RUCHEL, 1986).

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 baixa quantidade de α -1,3-glucana na parede celular da forma leveduriforme está freqüentemente relacionada a uma baixa virulência, apesar de alguns mutantes avirulentos ainda apresentarem níveis de α -1,3-glucana comparáveis aos de isolados selvagens. As β -glucanas são consideradas um importante imunomodulador da resposta inflamatória do hospedeiro por induzir a produção de fator de necrose Tumoral (TNF) (SAN-BLAS; SAN-BLAS, 1977 apud HOGAN et al., 1996).

O fato de a PCM infecção ser significativamente alto no sexo masculino, e a exposição ao fungo ser praticamente igual para ambos os sexos levou à hipótese de que os hormônios sexuais femininos interferem na infecção do fungo (KERR et al., 1984; RESTREPO, 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 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 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).

Diversas glicoproteínas são excretadas pelo *P. Brasiliensis* para o ambiente extracelular, principalmente as glicoproteínas de 27kDa (gp27), 43kDa (gp43), 55kDa (gp55), 70kDa (gp70), 87kDa (gp87), glicoconjugado polidisperso de alta massa molecular (MM) e glicolípideos, observados em antígeno *cell free* (CFA) obtido da superfície do fungo, do sobrenadante de crescimento de *P. Brasiliensis* em meio líquido designado exoantígeno (ExoAg) ou de antígeno somático (AS) obtido por ruptura do *P. Brasiliensis* (PUCCIA et al., 1986; CAMARGO et al., 1991; BLOTTA; CAMARGO, 1993; TOLEDO et al., 1995; ORTIZ et al., 1998; GOMEZ et al., 1998; SALINA et al., 1998; MIURA et al., 2001). Alguns componentes de *P. Brasiliensis* podem ser importantes para a patogênese da PCM doença, sendo favoráveis ao *P. Brasiliensis* ou ao desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro (MARQUEZ et al., 2003).

Primeiramente descrito por Puccia et al. (1986), a glicoproteína imunodominante de 43kDa (gp43) é o principal antígeno utilizado no diagnóstico da PCM (CAMARGO et al., 1988; TRAVASSOS et al., 2004). 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, 1994).

O fungo *P. Brasiliensis* apresenta estruturas antigênicas complexas, algumas tem sido correlacionadas com patogenicidade. A glicoproteína de superfície gp43 é considerada como fator de virulência, uma vez que se liga a componentes da matriz extracelular como a laminina (VICENTINI et al., 1994) e fibronectina (MENDES-GIANNINI, 2006). A Interação com proteínas da matriz extracelular tem sido correlacionada com a capacidade invasiva de diferentes células (LIOTTA, 1986; TERRANOVA et al., 1983). Além disso, tem sido demonstrado que o reconhecimento

da laminina pode influenciar a patogênese de vários microorganismos (LOPES et al., 1985; SILVA FILHO et al., 1988; SPEZIALE et al., 1982; SWITALSKI et al., 1984).

A Laminina é uma glicoproteína de 850kDa, presente na membrana basal (KLEINMAN et al., 1985; TERRANOVA et al., 1983), com capacidade de promover a adesão, a diferenciação, a forma e a motilidade celular (GOLD; PEARISTEIN, 1980; GROVER et al., 1983; KLEINMAN et al., 1985; MCCARTHY et al., 1983). Receptores específicos para laminina presente na superfície de células normais (BRYANT et al., 1987; HUARD et al., 1986) bem como cancerosas (BARSKY et al., 1984; LIOTTA et al., 1983) ou microorganismos patogênicos (LOPES et al., 1985; SILVA FILHO et al., 1988; SWITALSKI et al., 1984) são responsáveis por essas funções.

Para determinar se a laminina poderia influenciar o comportamento de *P. Brasiliensis* de forma semelhante, Vicentini et al. (1994) inoculou o fungo nos testículos de hamsters na presença e na ausência de laminina e confirmaram o pressuposto de que a adição de laminina no sistema faz com que a infecção seja muito mais intensa e grave, com aumento de granulomas. Os macrófagos não eliminaram a infecção (MOSCARDI-BACCHI et al., 1989), supondo que, essas células expressam receptores para laminina (FRANCO, 1986).

Uma componente de aproximadamente 380kDa (hMM – gp380) foi parcialmente isolada de fração de alta massa molecular, com mobilidade eletroforética ampla, de *P. Brasiliensis*, e a mesma apresentou a capacidade de reagir com 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 (CFU) e diminuição de antígenos circulantes em modelo experimental de PCM em camundongos (PAVANELLI et al., 2007).

Outra importante glicoproteína expressada pelo fungo é a gp70, reconhecida por 96% dos soros de pacientes com PCM (BLOTTA; CAMARGO, 1993). A gp70 é composta predominantemente de polissacarídeos (MATTOS GROSSO et al., 2003) e esta importante molécula não é somente um marcador para a doença, mas também tem atividade imunomoduladoras *in vitro*, incluindo indução da resposta linfoproliferativa quando testado com linfócitos de pacientes com PCM (BERNARD et al., 1997) e diminui a função de macrófagos peritoneais como a fagocitose, produção de NO e H₂O₂, (MATTOS GROSSO et al., 2003).

A gp70 também é detectada na urina de pacientes com a forma aguda da doença (SALINA et al., 1998). *In vivo*, anticorpo monoclonal anti-gp70 confere imunoproteção quando administrado no início ou durante a infecção por PCM em camundongo. Portanto, o bloqueio da gp70 previne de alguma forma a infecção, reforçando assim seu papel na patogênese (MATTOS GROSSO et al., 2003). A resposta imune celular é protetora ao *P. Brasiliensis* em humanos (BRUMMER et al., 1993; FRANCO et al., 1993) e em modelos experimentais (CANO et al., 1995; CALICH et al., 1985; TRAVASSOS et al., 2004). Pessoas saudáveis previamente infectadas com *Histoplasma capsulatum* foram reativas contra gp70 (CAMARGO et al., 1989).

A gp70 pertence à família das proteínas de choque térmico (HSP70). Estas proteínas podem ser expressas transitoriamente como resposta protetora à mudança de temperatura, ou alternativamente, podem desempenhar um papel no desenvolvimento celular, talvez por estabilizar os produtos dos genes de proteínas, que estão ligados durante a diferenciação celular (MARESCA; KOBAYASHI, 1994)

2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Na PCM, a destruição pulmonar envolve o alvéolo, interstício, e árvore brônquica, resultando em fibrose, disfunção respiratória e hipoxemia (RATTO; AFONSO, 1994). A infecção pulmonar primária é inaparente ou pouco sintomática em muitos casos e alguns indivíduos pode permanecer infectados por toda a vida sem desenvolver a doença. Porém, em outros casos, pacientes sintomáticos desenvolvem a doença anos após adquirirem a infecção, como resultado da reativação de um foco quiescente (forma crônica) (FRANCO et al., 1989; GIRALDO et al., 1976; MONTENEGRO, 1986).

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: Paracoccidioidomicose doença, Forma aguda/subaguda, forma crônica, unifocal, multifocal e forma residual ou seqüelar (SHIKANAY-YASSUDA, 2006).

Formas crônicas de PCM acometem geralmente homens do sexo masculino adulto, envolve gradualmente pulmões (unifocal), e podem estar associados ou não a lesões na pele e mucosas, e envolvimento clínico de outros órgãos (multifocal) (FRANCO et al., 1989; GUTIÉRREZ et al., 1985; LONDERO, 1986; LONDERO; RAMOS, 1990; LONDERO et al., 1978; RESTREPO et al., 1976; RESTREPO et al., 1970). Formas graves de PCM são caracterizadas por inibição da proteção 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. 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. Análises de biópsias mostram um grande número de leveduras gemulantes sem a formação de granulomas (LONDERO; MELO, 1983; TERRA et al., 1991). 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 (RESTREPO et al., 1989).

O envolvimento do sistema nervoso central na PCM, neuroparacoccidioidomicose (neuroPCM), é secundário à disseminação hematogênica do fungo. Geralmente ocorre como manifestação da grande disseminação da doença, mas ocasionalmente pode ser uma infecção localizada. Quando há envolvimento do sistema nervoso central, métodos neuro-radiológicos como tomografia computadorizada, e ressonância magnética são necessárias para a identificação das lesões. A neuroPCM é usualmente representado por lesões parenquimais isoladas ou múltiplas que levam a deficiências motoras e sensoriais,

alterações no estado mental e hipertensão intracraniana (FINAMOR et al., 2002; PEREYRA, 2001).

Considerando a morbidade associada com os procedimentos neurológicos invasivos, os clínicos não recomendam aspiração ou biópsia de lesões do sistema nervoso central. Portanto, métodos imunodiagnósticos sensíveis e específicos para determinar a presença do *P. Brasiliensis* em fluido cérebro-espinhal são indispensáveis (SILVA et al., 2005).

2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA PCM

Diagnósticos definitivos da PCM pulmonar são baseados na visualização de elementos fúngicos característicos de *P. Brasiliensis* em biópsia, diagnósticos sorológicos que dependem de anticorpos, entre eles, gp 43, atualmente o anticorpo de referência para PCM (SAN-BLAS et al., 2002), secreção respiratória, ou cultura de escarro. Entretanto, o processamento da secreção respiratória para exame direto é demorado. A Cultura é difícil porque escarro é contaminado com bactéria e outras leveduras como *Candida sp* que inibem o crescimento do *P. Brasiliensis*. A broncoscopia e a biópsia de pulmão podem ser difíceis em pacientes com disfunção respiratória grav. Por estas razões, métodos sorológicos baseados na detecção de antígeno ou anticorpo podem ser ferramentas úteis no diagnóstico da doença (MARQUES-DA-SILVA et al., 2006).

Em 1916, Moses foi o primeiro a usar antígenos de *P. Brasiliensis* para testes sorológicos, utilizando extrato de fungo e salina, para os testes de fixação do complemento. Em 1955, Fava Netto padronizou um antígeno polissacarídico de *P. Brasiliensis* para usar em testes de fixação do complemento. Com este teste e antígeno, a sorologia para PCM alcançou 90% de sensibilidade, demonstrando então a utilidade desta técnica não somente no diagnóstico, mas também no monitoramento do curso da doença. A preparação do filtrado de antígenos e seu uso para imunodiagnose da PCM por Imunodifusão dupla, foi iniciado por Restrepo (1966) e Negróni (1968), que observaram um nível de sensibilidade semelhante a 90%. (BLUMER et al., 1984; YARZABAL et al., 1977).

Pons e colaboradores (1972) foram os primeiros a introduzir ELISA para detecção de anticorpos anti-*P. Brasiliensis*. Desde então, o ELISA tem sido a base de muitos estudos para a detecção de anticorpos séricos de *P. Brasiliensis*

(MENDES-GIANNINI et al., 1984; PUCCIA; CAMARGO, 1991), e tem sido usado com uma variedade de antígenos diferentes, uma vez que o extrato bruto, parcialmente purificados e moléculas purificadas como a gp43, geralmente possuem alta sensibilidade.(CAMARGO et al., 2008)

Mendes-Giannini et al. (1984) padronizaram ELISA utilizando filtrado de levedura de *P. Brasiliensis* como antígeno, e encontraram 100% de sensibilidade e 88% de especificidade. Entretanto, reações cruzadas foram verificadas nos soros de pacientes com histoplasmose e doença de Jorge Lobo. Os filtrados são constituídos principalmente pelo antígeno imunodominante gp43.

Camargo et al. (2008) realizou o ELISA de inibição que foi capaz de detectar antígeno gp43 variando em concentração de 0,0053 a 30 µg/ml de soro. A sensibilidade geral do teste entre 81 pacientes com PCM foi de 95,1%, com uma maior sensibilidade em pacientes com a forma aguda da PCM (100%), Entre os pacientes com a forma crônica de PCM, gp43 foi detectada em 95,71%. Esses resultados mostraram que o teste de detecção de gp43 pode ser utilizado para ambas as formas clínicas da doença. Conseqüentemente, o teste de detecção do antígeno gp43 pode ser um instrumento valioso no diagnóstico de PCM.

Métodos moleculares estão sendo desenvolvidos para ajudar no diagnóstico da PCM. Genes 58S e 28S, regiões intergênicas ou gene da gp43 tem sido usadas no desenho de oligonucleotídeos específicos para a identificação e caracterização de *P. Brasiliensis* culturas e amostras clínicas de pacientes com PCM (GOMES et al., 2000; TATIBANA et al., 2009; TAKAYAMA et al., 2009).

2.5 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO

A PCM tem sido associada com vários estágios de depressão da resposta imune celular e aumento da resposta imune humoral. Posteriormente tem sido caracterizada por ativação policlonal de células B, hipergamaglobulinemia, e altos níveis séricos de anticorpos anti-*P. Brasiliensis* (CHEQUER-BOU-HABIB et al., 1989; BERNARD et al., 1996). A resistência à infecção por *P. Brasiliensis* têm sido correlacionada a interferon- γ (IFN- γ) e outros tipos de citocinas Th1, enquanto a susceptibilidade tem sido correlacionada com a produção de citocinas tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10 (OLIVEIRA et al., 2008).

A citocina imunorregulatória IL-4 é produzida por linfócitos Th2, mastócitos, basófilos, e uma subpopulação de linfócitos NK (ABBAS et al., 1996). A IL-4 induz a diferenciação de células T naive a linfócitos Th2, regula a troca de células B a células IgE secretoras, e está envolvida nas reações inflamatórias de hipersensibilidade do tipo imediata (KOPF et al., 1993; SHIMODA et al., 1996). Em contrapartida, IL-4 inibe a produção de IFN- γ e inibe a ativação de macrófagos mediados por IFN- γ (HART et al., 1989; TANAKA et al., 1993). A gravidade da PCM humana está correlacionada com a propensão do hospedeiro em desenvolver uma resposta imune Th2 caracterizada por secreção de altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10, presença de eosinofilia, e secreção de anticorpos IgG4 e IgE específica (BAIDA et al., 1999; MAMONI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002). IL-4 é uma importante citocina que pode modular positivamente ou negativamente a trajetória da infecção por *P. Brasiliensis* no hospedeiro. Os efeitos antagônicos de IL-4 em hospedeiros com diferentes *background* genético, demonstram que muitos mecanismos imunológicos podem levar a susceptibilidade a infecção pulmonar por *P. Brasiliensis*, e mais que isso, o paradigma Th1-Th2 não explica todos os mecanismos imunológicos que determinam a evolução da doença (ARRUDA et al., 2004).

Outros autores têm mostrado que a indução de citocinas inflamatórias tais como IFN- γ e TNF- α , pode levar à superprodução de óxido nítrico que tem sido associado à supressão da imunidade celular (BOCCA et al., 1998; BOCCA et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2002).

Biondo et al. (2010) demonstraram que *P. Brasiliensis* produz prostaglandinas usando substratos endógenos ou exógenos que podem ser fundamentais para a viabilidade do fungo e provavelmente modula a resposta imunológica do hospedeiro. As prostaglandinas (principalmente a PGE2) atuam em clones Th0 induzindo a síntese de citocinas Th2 com conseqüente inibição da resposta Th1 (BETZ; FOX, 1991; PHIPPS et al., 1991). Ela também inibe a produção de quimiocinas e proliferação de linfócitos e tem um efeito supressivo sobre fagócitos (ROCCA; FITZGERALD, 2002) e funções de células dendríticas (HARIZI; GUALDE, 2006). Assim, o reforço na produção de prostaglandinas durante a infecção por fungos pode ser um fator de promoção da doença crônica ou disseminada por suprimir uma resposta imune protetora.

Considerando que os isotipos de imunoglobulinas são determinados pelos tipos de citocinas presentes onde as células B são ativadas, a detecção de

isotipos particulares pode ser considerada como indicador da via correspondente da indução da citocina (MCINTYRE et al., 1995; CALLARD; TUNER, 1990). A excelente correlação entre IL-4 e IgE sugere que a produção de IgE pode ser usada como um bom marcador para a existência de uma forte resposta Th2 (CALLARD; TUNER, 1990; ROMAGNANI, 1997), porém a detecção de IgE sérico é difícil porque o anticorpo IgG compete pelos mesmos epítomos (MAMONI et al., 2001).

A Hiperprodução de IgE em doenças como asma alérgica, e dermatites atópicas é bem documentada (JOHANSSON, 1967; JOHANSSON, 1969; JUHLIN et al., 1969); bem como elevados níveis de IgE sérico foram relatados na aspergilose broncopulmonar (DESSAINT et al., 1976; PATTERSON et al., 1972) candidíase (KIRK et al., 1974; MATHUR et al., 1977), histoplasmose (COX; ARNOLD, 1980), hanseníase (SAKA et al., 1975), infecções parasitárias (DESSAINT et al., 1975; HOGARTH-SCOTT et al., 1969; JOHANSSON et al., 1968; ROSENBERG et al., 1970), síndrome de Wiskott-Aldrich (WALDMANN et al., 1972), síndrome de Di George (KIKHAWA et al., 1973), e doença de Hodgkin (WALDMANN et al., 1974). Cada uma dessas doenças está associada a uma deficiência na imunidade celular, embora a deficiência varie em gravidade (COX et al., 1982).

A avaliação da resposta imune humoral tem sido uma importante ferramenta para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com PCM. O nível da produção de anticorpos específicos tem sido usado pra correlacionar a gravidade da doença e monitoramento da resposta ao tratamento (FRANCO et al., 1989).

Análises da expressão de isotipos de anticorpos nas formas agudas e crônica de PCM têm demonstrado elevados níveis de IgG e IgE total, e IgG, IgE ou IgA específicos para alguns antígenos do *P. Brasiliensis* (BAIDA et al., 1999; BLOTTA, et al., 1993; LURASCHI et al., 2004). Altos níveis de IgE e IgE anti-gp43 tem sido encontrado em pacientes com PCM e correlacionado com ativação policlonal de linfócito B, observado na forma aguda da doença (BISELLI et al., 2001; CHEQUER-BOU-HABIB et al., 1989; BRUMMER et al., 1993; ARANGO; YARZABAL, 1982).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Determinar os níveis de IgE anti-gp70 em soros de pacientes com PCM.

3.2 ESPECÍFICOS

- Obter gp70 de *P. Brasiliensis*.
- Determinar os níveis de IgG à gp70 em soros de pacientes com PCM e em soro humano normal.
- Determinar os níveis de IgE à gp70 em soros de pacientes com PCM e em soro humano normal.
- Correlacionar os níveis de IgG e IgE à gp70 com os níveis de IgE anti-exoantígeno e nível de IgG total em amostras de soros de pacientes com PCM.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Utilizou-se soro armazenado à -20°C do banco de amostras biológicas do laboratório de Imunologia aplicada da Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR. As amostras constituíram-se de soro de 20 pacientes (19 do sexo masculino e 01 do feminino), com PCM crônica, e 20 amostras de doadores saudáveis de sangue de ambos os sexos. Para os ensaios de ELISA anti-ExoAg e Anti-gp 43 selecionou-se aleatoriamente 12 amostras do grupo acima mencionado. Todas as amostras foram cedidas pelo paciente mediante termo de consentimento livre esclarecido e aprovado pelo comitê de ética em seres humanos.

4.2 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL E SOMÁTICO

O antígeno *cell free* (CFA) foi obtido de acordo com Camargo *et al.* (1991), modificado pela adição do inibidor de protease *phenylmethanesulfonylfluoride* (PMSF) a 2,5mM ao sobrenadante, o qual foi congelado a -80°C.

O Antígeno somático (AS) foi obtido de cepas de *P. Brasiliensis* B-339, com 05 dias de cultura em ágar saboraud (Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, Michigan) à 35°C e ressuspendidos em aproximadamente 15ml de tampão salino-fosfato 0,15 M (PBS), pH 7.4, tratados com nitrogênio líquido e macerados 3 vezes no gral de porcelana (procedimento realizado no gelo). O homogenato foi centrifugado (1756,16g a 4°C, 10 min) (Eppendorf centrifuge 5804R) e ao sobrenadante foi adicionado inibidor de protease PMSF a 2,5mM, aliquoteado e mantido em freezer -80°C até o momento do uso. A concentração de proteína foi determinada pela técnica de Folin (LOWRY *et al.*, 1951).

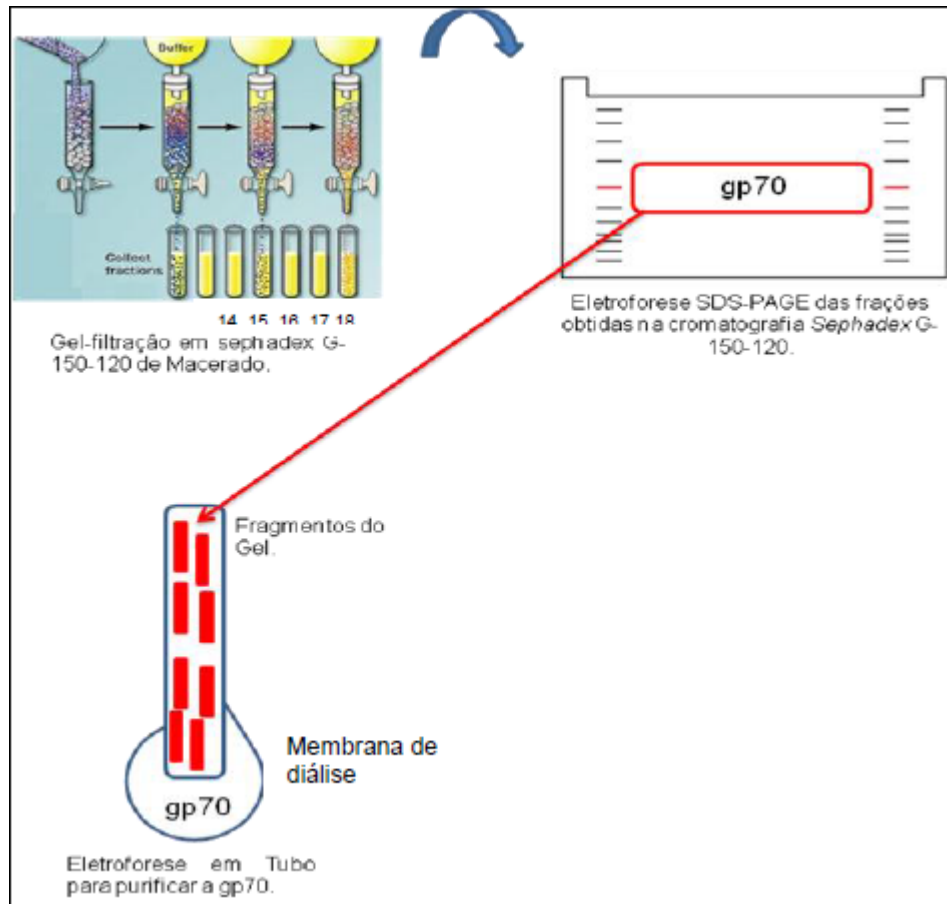
4.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE *SEPHADEX G-150-120*

O antígeno somático na quantidade de 04 mL foi aplicado à coluna de cromatografia de *Sephadex G-150-120* equilibrada com tampão PBS 0,15 M pH 7,2. Como eluente foi utilizado PBS. Frações de 2 mL cada foram recolhidas por coletor de frações automático (Gilson fraction collector), lidas em espectrofotômetro a 280 nm (Spectrum SP - 2000UV) e armazenadas em freezer -80oC.

4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS (SDS-PAGE) PARA PURIFICAÇÃO DE GP70

Amostra de fração obtida na coluna de *Sephadex g-150-120* e padrão de massa molecular pré-corado foram submetidos à SDS-PAGE (7,5%). Após a corrida, em tampão tris-glicina 1M (Pharmacia Biotec – Swedwn e Sigma Co., Germany), pH 8,1 a 100V, foi selecionada e eluída através de nova eletroforese em tubo, somente a faixa correspondente ao componente de 72kDa, o material foi recolhido em membrana de diálise (como demonstrado a seguir na figura 1 abaixo) e armazenado em freezer -800C até o momento do uso.

Figura 1 – Esquema de purificação de gp70.



4.5 ANÁLISE DE CFA E AS POR *WESTERN BLOTTING*

Amostra de CFA e AS e marcador de massa molecular (BIO-RAD, Bio-Rad Laboratories, Inc. USA) foram submetidos à SDS-PAGE (7,5%) e transferidos para membrana de nitrocelulose em tampão Tris-HCl-metanol a 23v durante a noite e mais 1 hora a 60v antes do término da transferência. A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio (leite desnatado 5% - *Tween* 0.5% - PBS) por 1h à temperatura ambiente, e lavada por quatro vezes com tampão lavagem (leite mólico 0,5%-*Tween* 0,05% - PBS). A membrana foi incubada com *pool* de soro de pacientes PCM positivo diluído 1:40 por 2h a 37°C seguido de lavagem e adição de conjugado de coelho anti-IgG humana peroxidase diluído 1:2000 (Sigma A-8775 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) por 2h a 37°C. Após a lavagem da membrana, foi revelada com 3'3'5'5' tetrametilbenzidina (TMB) (Zimed cat. N° 00-2019 Zimed, S. San Francisco, CA, USA).

4.6 IMUNOBLOTTING DE AS PARA DETECÇÃO DE GP70 POR IGE DE SORO DE PACIENTES COM PCM E COM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-GP70

Amostra de AS foram submetidos à SDS-PAGE (gel gradiente 5-20%) e transferidos para membrana de nitrocelulose em tampão Tris-HCl-metanol a 23v durante a noite e mais 1 hora a 60v antes do término da transferência. Após bloqueio e lavagens como descrito acima, a membrana foi incubada com pool de soros de pacientes PCM crônico, previamente adsorvidos em Sepharose de Proteína A diluído 1:3 e concentrado (10x) em amicon 10k, à 37°C por 2h. Para a adsorção de IgG, *pool* de amostras séricas diluído 1:4 (4ml) foi incubada v/v com Sepharose de proteína A à 37°C sob agitação 28rpm durante 1h. Para concentrar a amostra, foi utilizado Amicon ultra 0,5ml centrifugal filters (Amicon ultra-0,5, Millipore corporation, Billerica, MA USA), segundo o protocolo do fabricante. Após lavagens, foi adicionado conjugado anti-IgE humano fosfatase alcalina produzido em cabra (Sigma 2765 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluído 1:500 a 37°C por 1h 30min. A membrana foi revelada com *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate* mais *nitro-blue tetrazolium* (NBT/BCIP) (Invitrogen Cat n. 00-2209).

Adicionalmente a amostra de AS transferida para membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo monoclonal anti-gp70(1A7C) gentilmente cedido pelo Prof. Dr. José Daniel Lopez, e a revelação realizada com conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo diluído 1:2.000 (Sigma A8924 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

4.7 DETERMINAÇÃO DA PUREZA DE GP70

A determinação da pureza de gp70 foi realizada por *Western blot*, como descrito no item 4.5.

4.8 ELISA PARA IGG TOTAL

Placas de ELISA foram sensibilizadas (100µl/poço) com fração de imunoglobulina de coelho anti-IgG humana a 40µg/ml e bloqueado como descrito acima. Amostras séricas diluídas 1:4 em 0,5% leite desnatado em PBS foram

adicionadas (100µl/poço) e incubadas por 2h a 37°C. Após lavagens, as placas foram incubadas com conjugado anti-IgG humano peroxidase produzido em cabra (Sigma A-8775 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluído 1:4000 (100µl/poço) por 1h 30min a 37°C, seguido de lavagens e a adição de 10mg de OPD em 25ml de tampão citrato/fosfato (pH 5.0), mais 10µl de H₂O₂ 30% (100µl/poço). Após 15min de incubação, a reação foi interrompida com 50µl/well de H₂SO₄ 4N e a leitura da absorbância realizada a 492nm na Multiskan EX reader (Labsystems, Helsinki, Finland). O *background* interferente (avaliado através de reações controle) foi descontado de todos os resultados de absorbância. A curva padrão foi realizada usando diferentes diluições de um *Pool* de amostras de soro de concentração conhecida (mg/dl).

4.9 DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE IGG ANTI-GP70 POR ELISA

Placas de ELISA foram sensibilizadas (100µl/poço) com o antígeno, 16µl/ml por 1h a 37°C e 18hrs sob refrigeração. Após o bloqueio (leite mólico 5% - *Tween* 0.5% - PBS) e lavagem (leite desnatado 0,5%-*Tween* 0,05% - PBS), amostras séricas diluídas 1:40 foram adicionadas (100µl/poço) e incubadas a 37°C por 2h. Após lavagens, foi adicionado (100µl/poço) de conjugado anti-IgG humano peroxidase produzido em cabra diluído 1:4.000 (Sigma A-8775 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) seguido de lavagens e adição (100µl/poço) de solução de substrato cromógeno *ortho-fenilenediamine* (OPD). A reação foi paralisada com 50µl de H₂SO₄ 4N e leitura a 492nm na Multiskan EX reader (Labsystems, Helsinki, Finland).

4.10 DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE IGE ANTI-GP70 E EXOAG. DE *P. BRASILIENSIS* POR ELISA

Placas de ELISA foram sensibilizadas (100µl/poço) com antígeno de 72kDa ou Exo Ag a 10µl/ml por 1h a 37°C e 18hrs a 4°C e bloqueadas como descrito acima. Amostras séricas previamente adsorvidas em Sepharose de proteína A diluídas 1:20 (100µl/poço) foram adicionadas e incubadas a 37°C por 2h. Para absorção de IgG, amostras de 100µl de soro diluído 1:10 foi incubada v/v com

Sepharose de proteína A à 37°C sob agitação 28rpm durante 1h. Após a lavagem (4x) foi adicionado (100µl/poço) anticorpos de cabra anti-IgE humano a 30µg/ml(Sigma A3525 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), e incubado a 37°C por 1h. As placas foram lavadas, adicionado conjugado anti-IgG de ovelha produzido em burro (Sigma A3415 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluído 1:2000 (100µl/poço) e incubado por 1h e 30min a 37°C, seguido de lavagem e adição (100µl/poço) de solução de cromógeno *ortho-fenilenediamine* (OPD) e substrato H₂O₂. A reação foi paralisada com 50µl de H₂SO₄ 4N e leitura a 492nm na Multiskan EX reader (Labsystems, Helsinki, Finland).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar estatisticamente as variáveis entre os grupos foi utilizado o programa Graphpad Prism 4, aplicando-se o Teste t e considerado significativo $p < 0,05$ e correlação de Pearson, sendo considerado forte correlação $r \geq 0,75$.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE CFA E AS DE *P. BRASILIENSIS* POR WESTERN BLOTTING

Resultado do *Western blotting* do AS e CFA, demonstrou a presença da banda de gp70 em ambos os materiais analisados, porém com maior evidência no AS. (Fig. 2).

5.2 FRACIONAMENTO DE AS DE *P. BRASILIENSIS* POR CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO

O processo de fracionamento de AS de *P. Brasiliensis* por cromatografia de gel filtração através de coluna *Sephadex G-150/120* (gráfico 1) resultou em perfil espectrofotométrico com 2 picos de absorbância a 280nm. As frações obtidas foram analisadas por *western blot*, onde se observou a presença em maior concentração de gp70 nas frações de 14 à 18.

5.3 PURIFICAÇÃO DE GP70 DE *P. BRASILIENSIS*

O resultado de *Western blot* das frações 14, 15, 16, 17 e 18 de AS obtidas por cromatografia em gel filtração *sephadex G-150-120*, demonstrou a presença de pelo menos 08 componentes, com maior concentração de gp70. A associação de gel filtração e SDS-PAGE mostraram ser eficazes na purificação do antígeno, pois resultou no reconhecimento de apenas uma banda de 70kDa (fig. 3).

5.4 IMUNOBLOT DE AS PARA DETECÇÃO DE GP70 POR IGE DE SORO DE PACIENTE COM PCM E COM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-GP70

No resultado do Imunoblot para a análise de reconhecimento de gp70 por IgE de soros de pacientes com PCM, observou-se a presença de apenas uma banda correspondente ao antígeno de 70kDa. O resultando de Imunoblot para o anticorpo monoclonal anti-gp70 demonstrou reconhecimento de antígeno correspondente a 70kDa e mais duas bandas inferior a 70kDa (Fig. 4).

5.5 ANÁLISE DE IGG SÉRICO ANTI-GP70 POR ELISA

Os resultados de ELISA em D.O. a 492nm (gráfico 2), demonstrou nível elevado de IgG anti-gp70 em grupo de pacientes com PCM ($n=12$) ($0,108 \pm 0,053$) em relação ao soro humano normal ($n=12$) ($0,071 \pm 0,011$), $p < 0,05$. (Tabela 1).

5.6 ANÁLISE DE IGE SÉRICO ANTI-GP70 POR ELISA

Os resultados de ELISA em D.O. a 492nm (gráfico 3) demonstrou nível elevado de IgE anti-gp70 em grupo de pacientes com PCM ($n=12$) ($0,119 \pm 0,049$) em relação ao soro humano normal ($n=12$) ($0,07 \pm 0,01$), $p < 0,05$. (Tabela 1).

5.7 CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEL DE IGE ANTI-GP70 E IGE ANTI-EXOANTÍGENO

A análise de correlação do nível de IgE anti-gp70 e IgE anti-Exoantígeno de 12 pacientes com PCM, apresentou moderada correlação ($r=0,7032$) (gráfico 4).

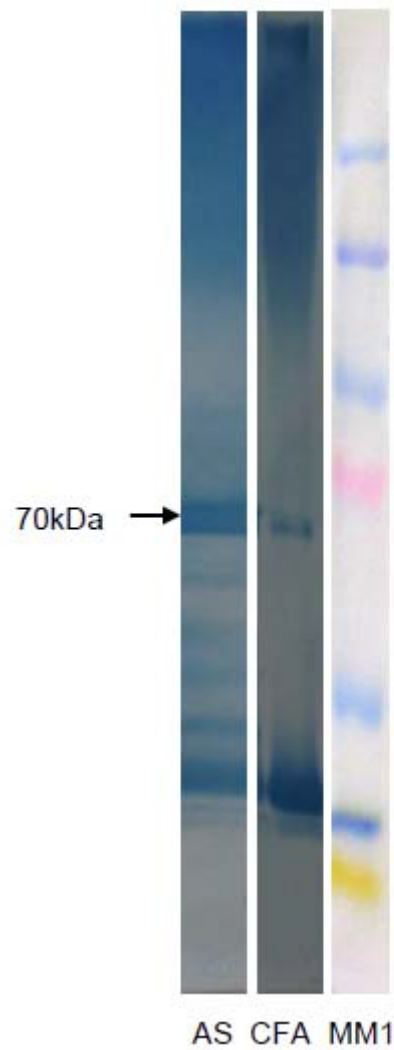
5.8 CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEL DE IGG ANTI-GP70 E IGG TOTAL

A análise de correlação do nível de IgG anti-gp70 e IgG Total de 12 pacientes com PCM, apresentou forte correlação ($r=0,7543$) (gráfico 5).

5.9 CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEL DE IGG E IGE ANTI-GP70

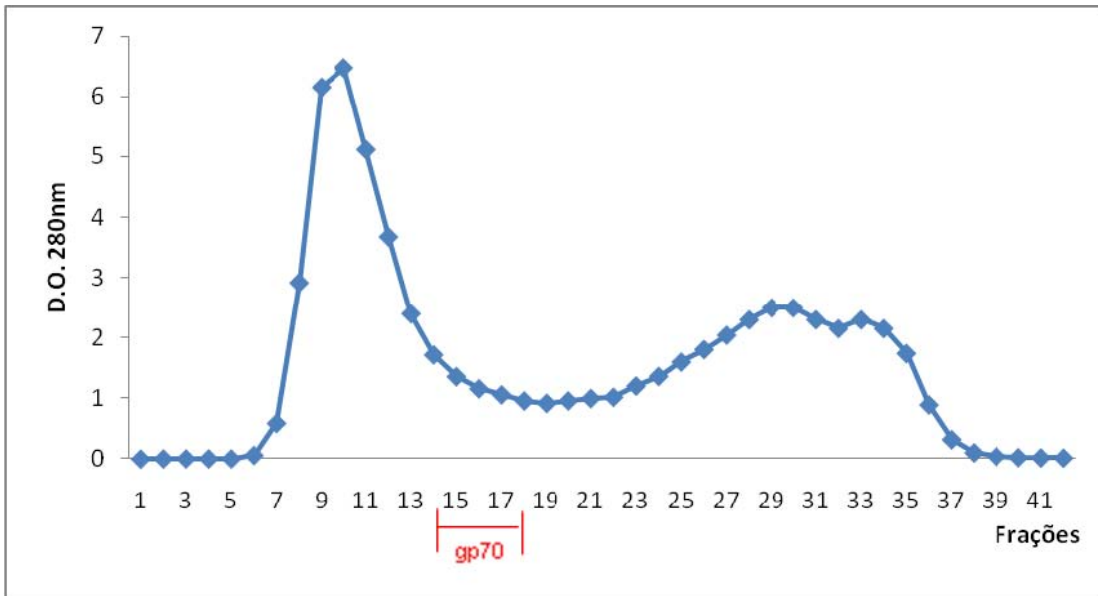
A análise de correlação do nível de IgG e IgE anti-gp70 de 12 pacientes com PCM, apresentou forte correlação ($r=0,8424$) (gráfico 6).

Figura 2 – Resultado de *western blotting* de AS e CFA de *P. Brasiliensis*.



Observou-se maior concentração de gp70 no AS que no CFA. *Western blotting* (SDS-PAGE 7,5%) usando Pool de soro de paciente PCM crônico, com conjugado anti-IgG humano-peroxidase. MM1 - Padrão de Massa Molecular (Bio Rad): 250kDa; 150kDa; 100kDa; 75kDa; 50kDa; 37kDa; 25kDa; 20kDa; 15kDa, 10kDa.

Gráfico 1 – Perfil espectrofotométrico a 280nm de frações obtidas por cromatografia em *Sephadex G-150/120* de AS.



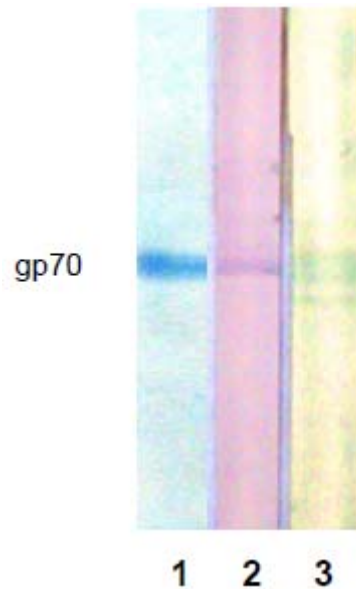
As frações do AS (1,0ml) foram coletadas com um coletor de fração automático, a leitura realizada em espectrofotômetro a 280nm.

Figura 3 – Resultado do *Western blotting* (SDS-PAGE 7,5%).



Amostras das frações 1(14), 2(15), 3(16), 4(17) e 5(18) de *P. Brasiliensis* obtidas por gel filtração. MM - Padrão de massa molecular (BIO RAD): 250kDa; 150kDa; 100kDa; 75kDa; 50kDa; 37kDa; 25kDa; 20kDa; 15kDa, 10kDa.

Figura 4 – Resultado de *western blotting*.



1) Resultado de *western blotting* de gp70 de *P. Brasiliensis* (SDS-PAGE gel gradiente 5-20%) utilizando *Pool* de soros de pacientes PCM. 2) Resultado de *western blotting* de AS de *P. Brasiliensis* utilizando pool de soro de pacientes PCM adsorvido com proteína A, conjugado anti-IgE humano fosfatase alcalina e NBT/BCIP. 3) Resultado de Western blotting de AS de *P. Brasiliensis* utilizando anticorpo monoclonal anti-gp70 (1A7C), conjugado anti-IgG de camundongo e TMB.

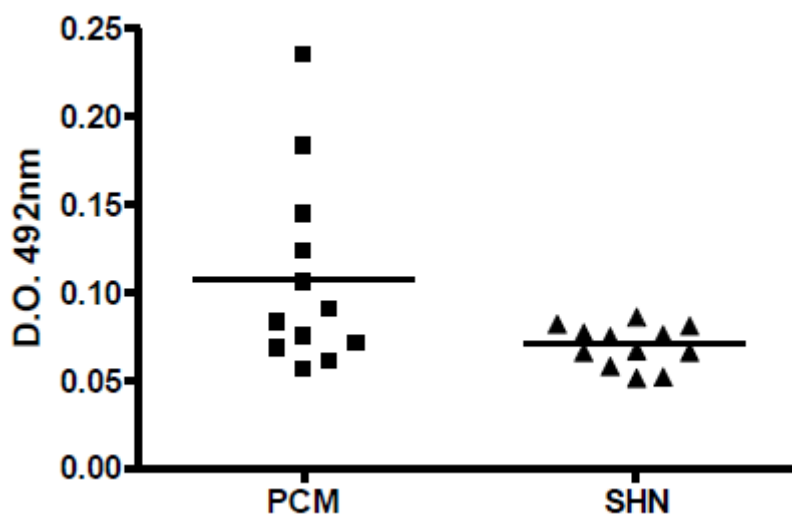
Tabela 1 – ELISA IgG e IgE anti gp-70 de *P. Brasiliensis*. Níveis séricos de anticorpos IgG e IgE reagiram com gp70 de *P. Brasiliensis* em pacientes crônicos (n=12) e SHN (n=12), por ELISA. Para a análise de IgG, placas de ELISA foram sensibilizadas com 10µg/ml de gp70 de *P. Brasiliensis* e incubadas com amostras séricas, e então adicionadas conjugado anti-IgG humano peroxidase e solução de OPD e leitura realizada a 492nm. Para a análise de IgE, placas de ELISA foram sensibilizadas com 10µg/ml de gp70 de *P. Brasiliensis* e incubadas com amostras séricas previamente adsorvidas em Sepharose de proteína A, e então anticorpos anti-IgE humano foram adicionados, conjugado peroxidase anti-IgG e solução de OPD. Resultados são mostrados em densidade óptica.

Grupo	IgG anti-gp70											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PCM crônico	0,071	0,068	0,106	0,235	0,144	0,183	0,056	0,061	0,075	0,123	0,090	0,083
SHN	0,053	0,078	0,053	0,076	0,059	0,067	0,068	0,077	0,067	0,083	0,082	0,087

Grupo	IgE anti-gp70											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PCM crônico	0,116	0,070	0,064	0,246	0,160	0,155	0,095	0,102	0,073	0,100	0,133	0,109
SHN	0,062	0,08	0,07	0,065	0,08	0,065	0,068	0,061	0,071	0,05	0,082	0,055

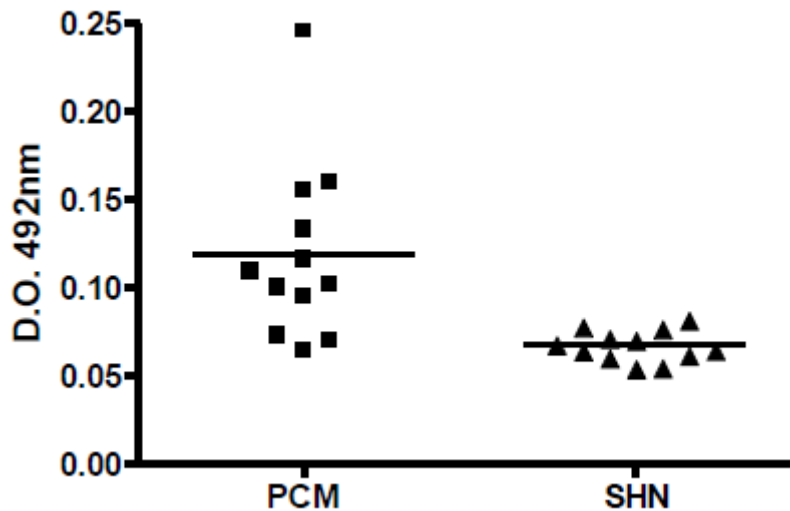
IgG PCM X SHN = $p < 0,05$; IgE PCM X SHN = $p < 0,05$.

Gráfico 2 – Determinação do nível de IgG anti-gp70 por ELISA.

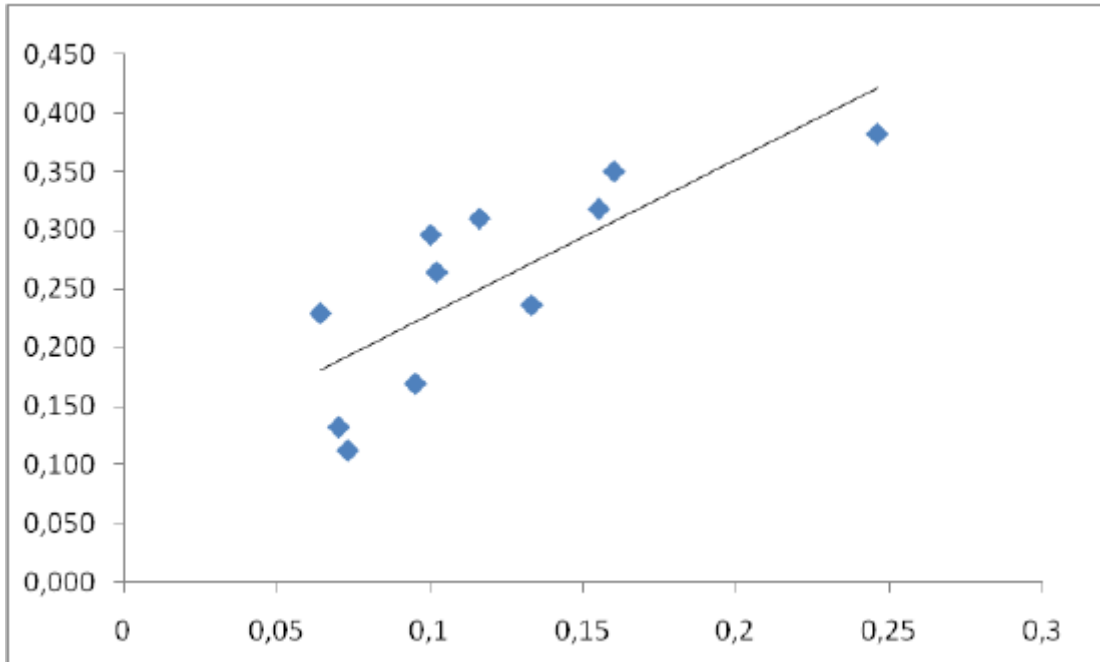


Resultado de níveis séricos de anticorpos IgG anti-gp70 de *P. Brasiliensis* em pacientes com PCM (n=12) e SHN (n=12), expresso em D.O a 492nm. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 10µg/ml de gp70 de *P. Brasiliensis* e incubadas com amostras séricas, e então adicionadas conjugado anti-IgG humano peroxidase e solução de OPD. PCM X SHN = $p < 0,05$.

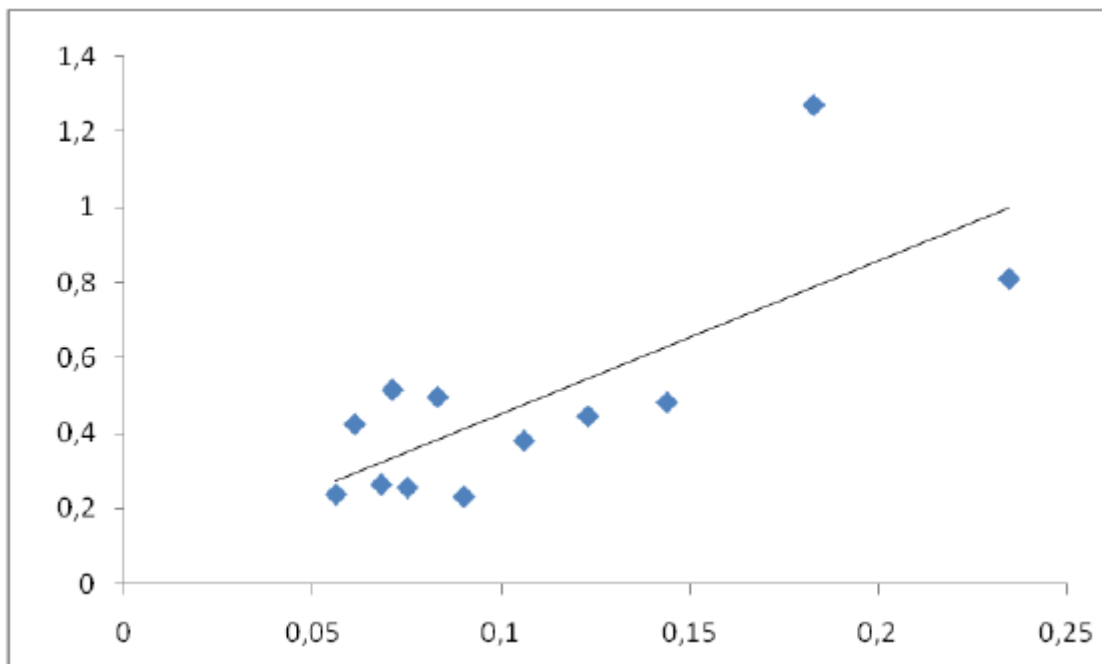
Gráfico 3 – Determinação do nível de IgE anti-gp70 por ELISA.



Resultado de níveis séricos de anticorpos IgE anti-gp70 de *P. Brasiliensis* em pacientes com PCM (n=12) e SHN (n=12), expresso em D.O. a 492nm. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 10µg/ml de gp70 de *P. Brasiliensis* e incubadas com amostras séricas previamente adsorvidas em Sepharose de proteína A, e então anticorpos anti-IgE humano foram adicionados, conjugado peroxidase anti-IgG e solução de OPD. PCM X SHN = $p < 0,05$.

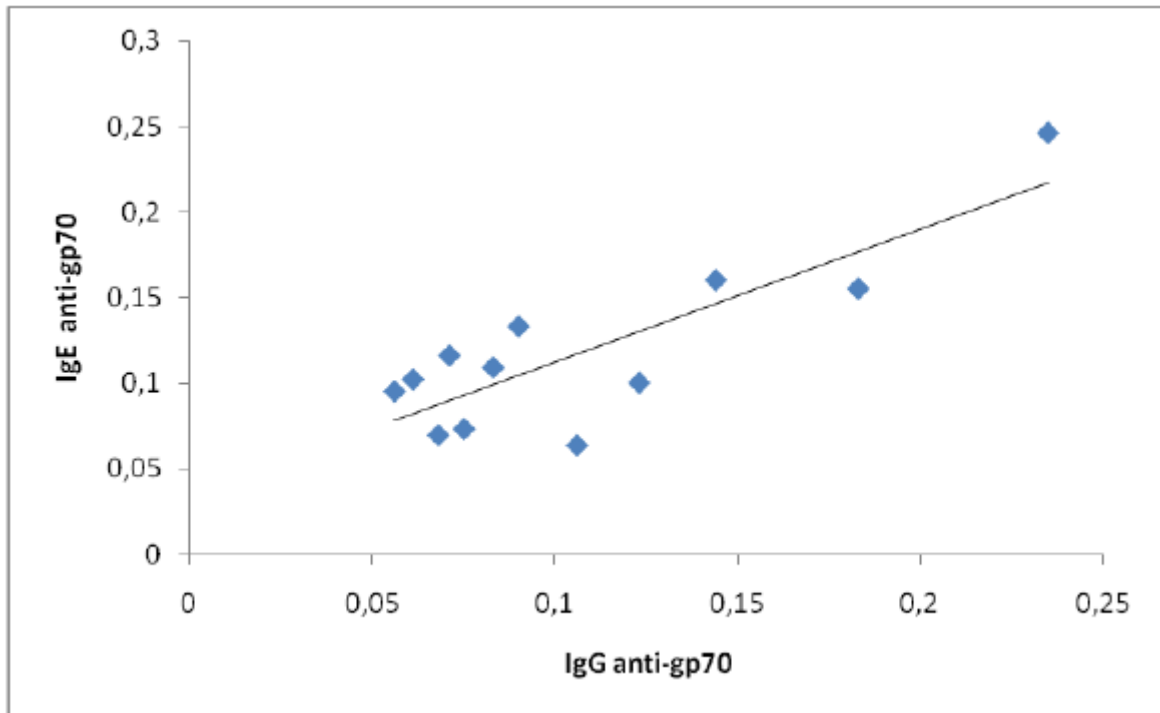
Gráfico 4 – Resultado da correlação de Pearson.

O resultado da correlação de Pearson entre nível sérico de IgE anti-gp70 e IgE anti-exoantígeno (n=12), apresentou moderada correlação ($r=0,7032$).

Gráfico 5 – Resultado da correlação de Pearson.

O resultado da correlação de Pearson entre nível sérico de IgG anti-gp70 e IgG Total (n=12), apresentou forte correlação ($r=0,7543$).

Gráfico 6 – Correlação entre IgG e IgE anti-gp70.



O resultado da correlação de Pearson entre nível sérico de IgG e IgE anti-gp70 (n=12), resultado em D.O. 492nm, apresentou forte correlação ($r=0,8424$).

6 DISCUSSÃO

A glicoproteína gp70 de *P. Brasiliensis*, é reconhecida por 96% de soro de pacientes com PCM não tratados (CAMARGO et al., 1989). Sendo não somente um marcador para doença ativa, mas também apresenta habilidades imunomoduladoras *in vitro*, incluindo a indução da resposta linfoproliferativa quando testado com linfócitos de pacientes com PCM (BERNARD et al., 1997) e inibe a função, como a fagocitose, produção de NO e H₂O₂ de macrófagos peritoneais. *In vivo*, o anticorpo monoclonal anti-gp70 confere imunoproteção quando administrado no início e durante a infecção em camundongo. Portanto, o bloqueio da gp70 impede de alguma forma a infecção, reforçando seu papel na patogênese (GROSSO et al., 2003).

A resistência à infecção por *P. Brasiliensis* têm sido correlacionada ao aumento no nível de IFN- γ e outros tipos de citocinas Th1, enquanto a susceptibilidade tem sido correlacionada com a produção de citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10 (OLIVEIRA et al., 2008). A existência de correlação entre IL-4 e IgE sugere que a produção de IgE pode ser usada como marcador para a existência de resposta Th2 (CALLARD; TUNER, 1990; ROMAGNANI, 1997).

Marquez et al. (2005) estudando o reconhecimento de IgE à fração de alta massa molecular (hMM) através de *immunoblotting*, observaram apenas uma banda de ~70kDa reconhecida por anticorpos IgE de pacientes com PCM da forma aguda, mas não com a forma crônica da doença. O não reconhecimento da banda de ~70 kDa por IgE de soros de pacientes com PCM crônica, poderia ser devido a menor sensibilidade do *immunoblot* em relação ao ELISA. Assim, no presente trabalho foi proposto analisar o nível de IgE à gp70 por ELISA que, diferentemente do *immunoblotting*, requer antígeno purificado. Sendo assim, primeiramente selecionou-se a fonte de antígeno que foi submetida a processos de purificação. Dentre as duas fontes de antígeno: preparado CFA e AS, utilizou-se o AS por demonstrar maior concentração de gp70, reconhecido por IgG por *immunoblotting*, resultado esse concordante com os dados de Marquez et al. (2005).

No processo inicial de purificação utilizando a cromatografia em gel filtração em *Sephadex g-150/120*, observou-se que os primeiros tubos continham grande quantidade de componentes de alta massa molecular, que diminuía nos tubos subseqüentes com o aumento da concentração de antígeno de gp70.

Selecionou-se os tubos de numero 14 a 18 que ainda demonstravam a presença de vários componentes de MM inferior a 70kDa, incluindo a gp43. Assim, procedeu-se a purificação por eletroforese e as frações de 70kDa recortadas e submetidas a nova eletroforese com coleta de Ag em tubos de membrana de diálise. Esse procedimento resultou em amostra contendo apenas uma banda de 70kDa reconhecido por IgG de pacientes com PCM.

A partir do antígeno purificado, foi determinado o nível de IgG anti-gp70, o qual demonstrou um nível elevado de IgG a esse antígeno em grupo de pacientes com PCM em relação ao soro humano normal. O resultado obtido esta em concordância com aqueles obtidos por Camargo et al. (1989) que observou a reatividade de gp70 com anticorpos por 96% de soro de pacientes com PCM, ou antígeno circulante detectado em 98,76% de soros de pacientes com PCM (MARQUES DA SILVA et al., 2004).

Considerando que a detecção de IgE específico a antígenos em doenças associadas a ativação policlonal de células B e hipergamaglobulinemia é difícil porque o anticorpo IgG compete pelos mesmos epítomos (MAMONI et al., 2001), para a análise de IgE anti-gp70 as amostras de soros foram previamente absorvidas com sepharose proteína A. Os resultados dessa análise demonstraram nível elevado de IgE à gp70 em grupo de pacientes com PCM crônica em relação ao grupo de soro humano normal. Esta é a primeira vez que se descreve na literatura o reconhecimento de IgE anti-gp70 em amostras de soros de pacientes com PCM crônica. Resultado este concordante com o imunobloting de IgE de preparado concentrado de soro de paciente com PCM à gp70. Biseli et al. (2001) analisou o reconhecimento de anticorpos IgE à gp43, maior componente antigênico de *P. Brasiliensis*, através de ELISA e observou que 100% dos pacientes com a forma aguda de PCM produziram anticorpos IgE e apenas 27% com a forma crônica da doença, produziram o isotipo. Assim possivelmente a gp70 induz mais fortemente a resposta Th2 em pacientes com PCM, podendo assim ser um marcador de resposta Th2.

Maricato et al. (2010) encontraram a presença de dois potenciais epítomos no seqüenciamento de Pbgp70. A análise de preparado de AS de *P. Brasiliensis* com anticorpo monoclonal anti-gp70 demonstrou o reconhecimento de bandas correspondentes a gp70 e outras três bandas próximas, sugerindo-se a

presença de mais de um epítopo presente na gp70. Estes dados podem contribuir para novas estratégias de imunoterapia e elaboração de vacinas para PCM.

Como a gp43, a investigação de gp70 pode se tornar importante por apresentar o potencial de atuar como modulador de resposta Th2 e, portanto com potencial de participar na patogênese da PCM doença.

Outra consideração importante, é a moderada correlação entre o nível de anticorpos IgE anti-gp70 e o nível de IgE anti-Exoantígeno. Pacientes que apresentaram nível elevado de IgE anti-gp70, também apresentaram elevação no nível de IgE anti-exoantígeno. A elevação do nível de IgG anti-gp70 está correlacionado com o nível elevado de IgG total. Evidencia-se ainda a forte correlação entre nível sérico de IgG e IgE anti-gp70.

Assim, como já citados na literatura, nível elevado de anticorpos a ExoAg (CAMARGO et al., 1989), e a gp43(PUCCIA et al., 1986; DE CAMARGO et al., 1988; TRAVASSOS et al., 2004), são usados como marcadores biológicos e úteis para o diagnóstico e monitoramento da PCM, a gp70 também pode apresentar esse potencial, o que torna importante estudos futuros adicionais.

REFERÊNCIAS

- ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides Brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 9, p. 248-253, 1971.
- ALMEIDA, S. R.; LOPES, J. D. Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides Brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. **Cell. Immunol.**, New York, v. 190, p. 68-76, 1998.
- ARANGO, M.; YARZABAL, L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 79, p. 115-123, 1982.
- ARAÚJO, M. S.; SOUZA, S. C. O. Análise epidemiológica de pacientes acometidos com paracoccidioidomicose em região endêmica do estado de Minas Gerais. **RPG Rev Pos-Grad.**, São Paulo, v. 7, p. 22-6, 2002.
- ARISTIZABAL, B. H. et al. Morphological transition of *Paracoccidioides Brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infect Immun.**, Bethesda, v. 66, n. 11, p. 5587-5591, 1998.
- ARRUDA, C. et al. Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infect Immun.**, Bethesda, v. 72, p. 3932-3940, 2004.
- BAGAGLI, E. et al. Isolation of *Paracoccidioides Brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 58, n. 4, p. 505-512, 1998.
- BAIDA, H. et al. Differential antibody isotype expression to major *Paracoccidioides Brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 1, p. 273-278, 1999.
- BARSKY, S. R. et al. Characterization of a laminin receptor from human breast carcinoma tissue. **Breast Cancer Res. Treat.**, Netherlands, v. 4, p. 181-188, 1984.
- BERNARD, G. et al. Antigen specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 54, p. 7-12, 1996.
- _____. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides Brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 175, n. 5, p. 1263-1267, 1997.
- BETZ, M.; FOX, B. S. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not Th2 lymphokines. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 146, p. 108-113, 1991.
- BICALHO, R. N. et al. Oral paracoccidioidomycosis: A retrospective study of 62 Brazilian patients. **Oral Dis.**, Houndmills, v. 7, p. 56-60, 2001.

- BIONDO, G. A. et al. *Paracoccidioides Brasiliensis* Uses endogenous and Exogenous Arachidonic Acid for PGEx Production. **Mycopathology**, Netherlands, v. 170, p. 123-130, 2010.
- BISELLI, P. J. C. et al. IgE antibody response to the main antigenic component of *Paracoccidioides Brasiliensis* in patients with paracoccidioidomycosis. **Medical mycology**, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, p. 671-676, 1993.
- BLUMER, S. O.; JALBERT, M.; KAUFMAN, L. Rapid and reliable method for production of a specific *Paracoccidioides Brasiliensis* immunodiffusion test antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 19, p. 404-407, 1984.
- BOCCA, A. L. et al. Treatment of *Paracoccidioides Brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J Immunol**, Baltimore, v. 161, p. 3056-3063, 1998.
- _____. Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides Brasiliensis*-infected mice. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 61, p. 280-287, 1999.
- BORGES-WALMSLEY, M. I. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides Brasiliensis*. **Trends Microbiol**. Cambridge, v. 10, n. 2, p. 80-87, 2002.
- BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 6, n. 2, p. 289-117, 1993.
- BRUMMER, E. et al. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides Brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **J. Immunol**, Baltimore, v. 140, p. 2786-2789, 1988.
- _____. Intracellular Multiplication of *Paracoccidioides Brasiliensis* in Macrophages: Killing and Restriction of Multiplication by activated macrophages. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 57, n. 8, p. 2289-2294, 1989.
- BRYANT, G. et al. A role for the laminin receptor in leukocyte chemotaxis. **J. Leukocyte Biol.**, Winston-Salem, v. 41, p. 220-227, 1987.
- CALICH, V. L. et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides Brasiliensis*. **British Journal of Experimental Pathology**, Londres, v. 66, n. 5, p. 585-594, 1985.
- CALLARD, R. E.; TURNER, M. W. Cytokines and Ig switching: evolutionary divergence between mice and humans. **Immunology Today**, Cambridge, v. 11, p. 200-203, 1990.

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.

CAMARGO, Z. P. 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.

_____. Production of *Paracoccidioides Brasiliensis* exoantigens for immunodifusion tests. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, p. 2147-2151, 1988.

CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 165, p. 289-302, 2008.

CANO, L. E. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infection Immunity**, Bethesda, v. 63, n. 5, p. 1777-1783, may 1995.

CHEQUER-BOU-HABIB, D. et al. Polyclonal B cell activation in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 108, p. 89-93, 1989.

COUTINHO, Z. P. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Caderno de saúde Pública**, São Paulo, v. 18, p. 1441-1454, 2002.

COX, R. A.; ARNOLD, D. R. Immunoglobulin E in histoplasmosis. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 29, p. 290-293, 1980.

DEL NEGRO, G. M. B. et al. General clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in child-hood. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**, CRC Press, Boca Raton, Fla., p. 225-232, 1994.

_____. 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. 13-116, 1995.

DESSAINT, J. P. et al. Serum concentration of specific IgE antibody against *Aspergillus fumigatus* and identification of the fungal allergen. **Clin. Immunol. Immunopathol.** New York, v.5, p314-319, 1976.

_____. Quantitative determination of specific IgE antibodies to schistosome antigen and serum IgE levels in patients with schistosomiasis (*S. mansoni* or *S. haematobium*). **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 20, p. 427-436, 1975.

DINIZ, S. N. et al. Expression in Bacteria of the Gene Encoding the gp43 Antigen of *Paracoccidioides Brasiliensis*: Immunological Reactivity of the Recombinant Fusion Proteins. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, n. 6, p. 1200-1204, 2002.

FAVA NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul americana, com antígeno polissacarídico. **Arq Cir Clin Exp.**, São Paulo, v. 18, p. 197-254, 1955.

FELIPE, M. S. et al. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides Brasiliensis* by EST analysis. **YEAST**, Chichester, v. 20, n. 3, p. 263-271, 2003.

FINAMOR, L. P. et al. Ocular and central nervous system paracoccidioidomycosis in pregnant woman with acquired immunodeficiency syndrome. **Am. J. ophthalmol.**, New York, v. 134, p. 456-459, 2002.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis. **Baillières Clin Trop Med Comum Dis**, v. 4, p. 185-220, 1989.

_____. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification on its clinical forms. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 129-132, 1987.

_____. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Current tropical medicine Mycology**, São Paulo, v. 5, p. 115-149, 1993.

GIRALDO, R. et al. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. **Mycopathology**, Netherlands, v. 58, p. 63-70, 1976.

GOLD, L. I.; PEARISTEIN, E. Fibronectin collagen binding and requirement during cellular adhesion. **Biochem. J.**, London, v. 186, p. 551-559, 1980.

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

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

GROVER, A.; ANDREWS, G.; ADAMSON, E. D. Role of laminin in epithelium formation by F9 aggregates. **J. Cell Biol.**, New York, v. 97, p. 137-144, 1983.

GUTIERREZ, F. et al. The radiological appearances of pulmonary paracoccidioidomycosis and the effect of ketoconazole therapy. **J. Pneumol.**, Brasília, n. 11, p. 1-12, 1985.

HARIZI, H.; GUALDE, N. Pivotal role of PGE2 and IL-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators. **Cell Mol Immunol.**, New York, v. 3, p. 271-277, 2006.

HEBELER-BARBOSA, F.; MONTENEGRO, M. R.; BAGABLI, E. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides Brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med Mycol.**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 89-96, 2003.

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.

HOGARTH-SCOTT, R. S.; JOHANSSON, S. G. O.; BENNICH, H. Antibodies to *Toxocara* in the sera of visceral larvae migrans patients: the significance of raised levels of IgE. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 5, p. 619-625, 1969.

HUARD, T. K.; MALINOFF, H. L.; WICHA, M. S. Macrophages express a plasma membrane receptor for basement membrane laminin. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 123, p. 365-370, 1986.

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 5.8s regions. **Med Mycol.**, Oxford, v. 38, p. 323-6, 2000.

JIMENEZ-LUCHO, V.; GINSBURG, V.; KRIVAN, H. C. *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal α 1-4Glc α 1-1Cer), a possible adhesion receptor for yeasts. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 58, p. 2085-90, 1990.

JOHANSSON, S. G. O. IgE in allergic diseases. **Proc. R. Soc. Med.**, London, v. 62, p. 975-976, 1969.

_____. Raised levels of a new immunoglobulin class (IgND) in asthma. **Lancet.**, London, v. 2, p. 951-953, 1967.

JOHANSSON, S. G. O.; MELBIN, T.; VAHLQUIST, B. Immunoglobulin levels in Ethiopian pre-school children with special reference to high concentrations of immunoglobulin E (IgND). **Lancet.**, London, v. 1, p. 1118-1121, 1968.

JUHLIN, L. et al. Immunoglobulin E in dermatoses. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 100, p. 12-18, 1969.

KIRK PATRICK, C. H.; SMITH, T. K. Chronic mucocutaneous candidiasis: immunologic and antibiotic therapy. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 80, p. 310-320, 1974.

KLEIN, B. S.; HOGAN, L. H.; JONES, J. M. Immunological recognition of a 25-amino acid repeat arrayed in tandem on a major antigen of *Blastomyces dermatitidis*. **J. clin. Invest.**, New York, v. 92, p. 330-7, 1993.

KLEINMAN, H. K. et al. Biological activities of laminin. **J. Cell. Biochem.**, New York, v. 27, p. 317-325, 1985.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Paracoccidioidomicose**. In *Micologia medica*, 8. ed. São Paulo: Savier, 1991. p. 248-261.

LIOTTA, L. A. Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 46, p. 1-7, 1986.

LIOTTA, L. A.; RAO, C. N.; BARSKI, S. H. Tumor invasion and the extracellular matrix. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 49, p. 636-649, 1983.

LONDERO, A. T. Paracoccidioidomicose. Patogenia, formas clinicas, manifestacoes pulmonares e diagnostico. **J. Pneumol.**, Brasília, v. 12, p. 41-57, 1986.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Paracoccidioidomicose: estudo clinico-micologico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul (Brazil). **J. Pneumol.**, Brasília, v. 16, n. 129-132, 1990.

LONDERO, A. T.; MELO, I. S. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. **Mycopathologia**, Netherlands, 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**, Netherlands, v. 63, p. 53-56, 1978.

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.

LOPES, J. D.; DOS REIS, M.; BRENTANI, R. R. Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. **Science**, Washington, v. 229, p. 275-277, 1985.

LOWRY, H. et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.

LURASCHI, P. et al. High-density lipoproteins contribute to the α -1-globulin zone in capillary eletrophoresis of human serum proteins. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25, p. 1551-1554, 2004.

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.

MAMONI, R. L. et al. Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Specific Immunoglobulin E in Sera of Patients with Paracoccidioidomycosis, São Paulo, Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 65, n. 3, p. 237-241, 2001.

MARESCA, B.; KOBAYASHI, G. S. Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen. **Experientia**, Basel, n. 50, p. 1067-1074, 1994.

MARQUEZ, A. S. et al. Serum proteins and fractions, HDL-cholesterol and total IgG and IgE levels in cases of acute and chronic paracoccidioidomycosis, Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 43, n. 3, p. 245-249, 2009.

_____. Reactivity of antibodies from patients with acute and chronic paracoccidioidomycosis to a high-mass molecular antigen from *Paracoccidioides Brasiliensis*. **Jounal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 19, p. 199-20, 2005.

MARQUEZ-DA-SILVA, S. H. et al. Diagnosis of Paracoccidioidomycosis by Detection of Antigen and Antibody in Bronchoalveolar Lavage Fluids, São Paulo, Brazil. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 6, n. 12, p.1363-1366, 2006.

MATHUR, S. et al. Immunoglobulin E anti-Candida antibodies and candidiasis. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 18, p. 257-259, 1977.

MATTOS GROSSO, D. et al. Characterization of gp70 and Anti-gp70 Monoclonal Antibodies in *Paracoccidioides Brasiliensis* Pathogenesis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 11, p. 6534-6542, 2003.

MCCARTHY, J. B.; PALM, S. L.; FURCHT, L. T. Migration of heptotaxis of a Schwann cell tumor line to the basement membrane glycoprotein laminin. **J. Cell Biol.**, New York, v. 97, p. 772-777, 1983.

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

_____. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides Brasiliensis*. **Arch Med Res.**, México, v. 26, p. 305-6, 1995.

MCINTYRE, T. M.; KEHRY, M. R.; SNAPPER, C. M. Novel in vitro model for high-rate IgA class switching. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 154, p. 3156-3161, 1995.

MEDOFF, G.; PAINTER, A.; KOBAYASHI, G. S. Mycelial-to-yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitis* and *Paracoccidioides Brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, p. 4055-4060, 1987.

MENDES, E.; RAPHAEL, A. Impaired delayed hypersensitivity in patients with South American blastomycosis. **J. Allergy**, St. Louis, v. 47, p. 17-22, 1971.

MENDES, N. F. et al. Lymphocyte cultures and skin allograft survival in patients with South American blastomycosis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 48, p. 40-45, 1971.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Bindind of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides Brasiliensis*. **Microbes Infection**, Paris, v. 8, p. 1550-1559, 2006.

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

_____. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 20, p. 103-8, 1984.

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

IYAJI, M. et al. The role of chlamydospores of *Paracoccidioides Brasiliensis*. **Jpn. J. Med Mycol.**, Oxford, v. 44, p. 133-138, 2003.

MONTENEGRO, M. R. G. Formas clinicas de paracoccidioidomicose. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 28, p. 203-204, 1986.

MORAIS, F. V. et al. Polymorphism in the Gene Coding for the Immunodominat Antigen gp43 from the Pathogenic Fungus *Paraccocidioides brasilensis*, São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 11, p. 3960-3966, 2000.

- MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Enhancement of *Paracoccidioides Brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated monocytes or macrophages, abstr. F-100, p. 425. **Abstr. 90th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.**, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1990.
- MOSES, A. Fixação de complemento na blastomicose. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, São Paulo, v. 8, p. 68-70, 1916.
- MOTA, N. G. S. et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 79, p. 765-772, 1985.
- NASCIMENTO, F. R. et al. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J Immunol.**, Baltimore, v. 168, p. 4593-4600, 2002.
- NEGRONI, P. El *Paracoccidioides Brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentine. **Prensa Med.**, Buenos Aires, v. 53, p. 2831-2832, 1966.
- ODDS, F. C. *Candida albicans* proteinase as a virulence factor in the pathogenesis of *Candida* infections. **Zbl. Bakt. Hyg. Ser. A.**, Stuttgart, v. 260, p. 539-42, 1985.
- OLIVEIRA, L. L. et al. T-helper 1-Inducing Adjuvant Protects against Experimental Paracoccidioidomycosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, p. 2-3, 2008.
- 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.
- PANIAGO, A. M. M. et al. Paracoccidioidomycose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Soc Bras Med Trop.**, Brasília, v. 36, p. 455-9, 2003.
- PATTERSON, R.; FINK, J. N.; PRUZANSKY, J. J. Serum immunoglobulin E in pulmonary allergic aspergillosis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 49, p. 98-104, 1972.
- PAVANELLI, W. R. et al. Protection induced in BALB/c mice by the High-Molecular-Mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides Brasiliensis*. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 163, p. 117-128, 2007.
- PEREYRA, W. J. F. Central nervous system paracoccidioidomycosis: analysis of 13 cases with immunofluorescence research of gp43 antigen. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 59, p. 981-984, 2001.
- PHIPPS, R. P.; STEIN, S. H.; ROPER, R. L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunol Today**.Cambridge, v. 12, p. 349-52, 1991.

PONS, L. et al. La tecnica de la inmunoperoxidase en la deteccion de anticuerpos especificos en la infeccion humana por *Paracoccidioides Brasiliensis*. **Medicina**, Buenos Aires, v. 36, p. 510-2, 1972.

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

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

RATTO, O. R.; AFONSO, J. E. Pulmonary lesions: clinical and functional aspects. In FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press, Boca Raton, Fla., p. 271-279, 1994.

RESTREPO, A.; MCEWEN J.G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides Brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol.**, Oxford, v.39, p.233-41, 2001.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides Brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 23, n. 5, p. 323-324, 1985.

RESTREPO, A. et al. Paracoccidioidomycosis. A study of 39 cases observed in Medellin, Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 19, p. 68-76, 1970.

_____. The gamut of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Med.**, New York, v. 61, p. 33-41, 1976.

RESTREPO, A.; TRUJILLO, M.; GOMEZ, I. Inapparent lung involvement in patients with the subacute juvenile type of paracoccidioidomycosis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 31, p. 18-22, 1989.

RESTREPO, A.; GREER, D. L.; VASCONCELLOS, M. Paracoccidioidomycosis: a review. **Rev. Med. Vet. Mycol.**, Abingdon, v. 8, p. 97-123, 1973.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal Infection – Diagnosis and Management.**, Oxford: Blackwell Science, p. 191-192, 1997.

ROCCA, B.; FITZGERALD, G. A. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. **Int Immunopharmacol.**, Amsterdam, v. 2, p. 603-30, 2002.

ROMAGNANI, S. The Th1/Th2 paradigma. **Immunology Today**, Cambridge, v. 18, p. 263-266, 1997.

ROSENBERG, E. B. et al. Increased circulating IgE in a new parasitic disease- human intestinal capillariasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 283, p. 1148-1150, 1970.

RUCHEL, R. Cleavage of immunoglobulin by pathogenic yeast of the genus *Candida*. **Microbiol. Sci.**, Oxford, v. 3, p. 316-9, 1986.

- SAKA, K.; DUTTA, R. N.; DASGUPTA, D. A. Immunologic aspects of leprosy with special reference to the study of immunoglobulin E. **Int. J. Lepr.**, Washington, v. 43, p. 314-319, 1975.
- SALINA, M. A. et al. Detection of circulating *Paracoccidioides Brasiliensis* antigen in urine of Paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 723-1728, 1998.
- SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent Paracoccidioides Brasiliensis. **J. Med. Vet Mycol.**, Abingdon, v. 31, p. 99-113, 1993.
- SAN-BLAS, G.; VERNET, D. Induction of the synthesis of cell wall α -1,3-glucan in the yeast like form of *Paracoccidioides Brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. **Infec. and Immun.**, Bethesda, v. 15, p. 897-902, 1977.
- SAN-BLAS, G. et al. A model of dimorphism in pathogenic fungi: Paracoccidioides Brasiliensis. **Acta Cient. Venez.**, Caracas, v. 38, p. 202-211, 1987.
- SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides Brasiliensis* chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 165, p. 183-195, 2008.
- SAN-BLAS, G.; NINÓ-VEGA, G.; ITURRIAGA T. *Paracoccidioides Brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol.**, Oxford, v. 40, p. 225-42, 2002.
- 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.
- SILVA FILHO, F.; SOUZA, W.; LOPES, J. D. Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 85, p. 8042-8046, 1988.
- SILVA, S. H. M. et al. Diagnosis of Neuroparacoccidioidomycosis by Detection of Circulating Antigen and Antibody in Cerebrospinal Fluid, São Paulo, Brazil. **Journal of clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 9, p. 4680-4683, 2005.
- _____. Detection of *Paracoccidioides Brasiliensis* gp70 Circulantig Antigen and Follow-Up of Patients Undergoing Antimycotic Therapy, São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 10, p. 4480-4486, 2004.
- SILVA-VERGARA, M. L. et al. Isolation of Paracoccidioides Brasiliensis from the soil of coffe plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, Oxford, v. 36, p. 37-42, 1998.
- SPEZIALE, P.; HOOK, M.; WADSTROM, T.; TIMPL, R. Binding of the basement membrane protein laminin to Escherichia coli. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 146, p. 55-58, 1982.

SPLENDRE, A. **Un'afezione micótica com localizzazione nella mucosa della bocca, osservata in Brasile, determinata da funghi appartenenti Alla tribu degli Exoascei** (*Zymonema brasiliensi*, n. sp.) in volume in onere Del prof. Angelo Celli nel 25o anno di insegnamento, Roma, G, Bertero: 421-458.

SPOSTO, M. R. et al. Oral paracoccidioidomycosis: a study of 36 south american patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v. 75, p. 461-5, 1993.

SWITALSKI, L. M. et al. Binding of laminin to oral and endocarditis strains of viridans streptococci. **J. Bacteriol.**, Washington DC, v. 169, p. 1095-1101, 1987.

_____. Binding of *Streptococcus pyogenes* to laminin. **J. Biol. Chem.**, Berlim, v. 259, p. 3734-3738, 1984.

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.

TABORDA, C. P. et al. Mapping os the T-cell epitope in the major 43-Kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides Brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 66, p. 786-793, 1998.

_____. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides Brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview, São Paulo, Brazil. **Mycopathology**, Netherlands, v. 165, n. 4-5, p. 331-339, 2008.

TERRA, G. M. F. et al. Paracoccidioidomicose em crianças ABP. **Arq. Bras. Med.**, Rio de Janeiro, v. 65, p. 8-15, 1991.

TERRANOVA, J. P. et al. Laminin receptor on human breast carcinoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 80, p. 444-448, 1983.

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.

TRAVASSOS, L. R. et al. The gp43 from *Paracoccidioides Brasiliensis*: a major diagnostic antigen and vaccine candidate, p. 279-296. In: DOMER, J. E.; KOBAYASHI, G. S. (Ed.). *The Mycota. Human fungal pathogens*, v. 12, Berlin, Germany. 2004.

VARTIVARIAN, S. E. Virulence and nonimmune pathogenic mechanisms of fungi. **Clin. Infect. Dis.**, Oxford, v. 14, p. 30-6, 1992.

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

WALDMANN, T. A. et al. Immunoglobulin E in immunologic deficiency diseases. II. Serum IgE concentration of patients with acquired hypogammaglobulinemia, thymoma and hypogammaglobulinemia, myotonic dystrophy, intestinal lymphangiectasia, and Wiskott- Aldrich syndrome. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 109, p. 304-310, 1972.

YARZABAL, L. A. et al. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides Brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 15, p. 79–85, 1977.

7 CONCLUSÕES

- A gp70 é encontrada em maior quantidade no Antígeno somático que em CFA.
- Soros de pacientes com PCM crônica apresentam níveis elevados de IgG anti-gp70 em relação ao soro humano normal, concordando com os dados da literatura.
- Soros de pacientes com PCM crônica apresentam níveis elevados de IgE anti-gp70 em relação ao soro humano normal o que sugere a possibilidade de envolvimento de gp70 na resposta Th2.
- Existe forte correlação entre o nível sérico de IgE anti-gp70 e o nível de IgE anti-exoantígeno ou do nível de IgG total sugerindo o potencial de utilização da gp70 como marcador biológico para monitoramento de tratamento da PCM, o que requer estudos adicionais.