



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNNA EMANUELLA FRANÇA REGO

**AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA NA
SOROLOGIA DA CANDIDEMIA COM OS ANTÍGENOS GP43
NATIVA E GP43 RECOMBINANTE DE *Paracoccidioides
brasilensis***

BRUNNA EMANUELLA FRANÇA REGO

**AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA NA
SOROLOGIA DA CANDIDEMIA COM OS ANTÍGENOS GP43
NATIVA E GP43 RECOMBINANTE DE *Paracoccidioides
brasiliensis***

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

Orientador: Professor Dr. Mario Augusto Ono.

Londrina
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Rego, Brunna Emanuella França.

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA NA SOROLOGIA DA CANDIDEMIA COM OS ANTÍGENOS GP43 NATIVA E GP43 RECOMBINANTE DE *Paracoccidioides brasiliensis* / Brunna Emanuella França Rego. - Londrina, 2015.
48 f. : il.

Orientador: Mario Augusto Ono.
dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2015.
Inclui bibliografia.

1. *Paracoccidioides brasiliensis* reatividade cruzada. - 2. imunodiagnóstico - 3. gp43 recombinante - 4. reatividade cruzada. - I. Ono, Mario Augusto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

BRUNNA EMANUELLA FRANÇA REGO

**AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA NA SOROLOGIA DA
CANDIDEMIA COM OS ANTÍGENOS GP43 NATIVA E GP43
RECOMBINANTE DE *Paracoccidioides brasiliensis***

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dra. Márcia Cristina Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina -UEL

Prof^ª. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina -UEL

Londrina, Outubro de 2015.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Animal localizado no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

O projeto contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por mais essa conquista. Por ter me sustentado e me capacitado a superar cada obstáculo que encontrei durante este período. Agradeço também por ter pessoas ao meu redor às quais posso expressar minha gratidão. Sem elas, não seria possível chegar até aqui.

Ao orientador, Prof. Dr. Mario Augusto Ono, pelos conhecimentos transmitidos, pelos conselhos, pela paciência e confiança depositada em mim. Agradeço imensamente a oportunidade que me foi dada para meu crescimento profissional.

À Prof^ª. Dra. Eiko Nakagawa Itano e Prof^ª. Dra. Márcia Cristina Furlaneto, pela valiosa contribuição em meu trabalho e por ter aceito o convite em participar da banca de qualificação e de defesa.

À todos os professores do programa de mestrado em Patologia Experimental, por todos os ensinamentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, pelo incentivo à pesquisa.

Ao meu amigo Paulo Osório, pela disponibilidade em ajudar cedendo as amostras de soros fornecidas.

Aos meus companheiros de laboratório Aline Omori, Igor Massahiro, Isabele Kazahaya, Giovana Carvalho, Tiago Zaninelli, João Paulo Assolini, obrigada pelos momentos de descontração e auxílio com os experimentos. Em especial aos amigos Rafaela Macagnan e Fernando César dos Santos pelo companheirismo e ajuda, pelas risadas que demos juntos, pelas descobertas e também por compartilharem comigo os momentos de dúvida e insegurança, sou grata a Deus por ter vocês ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus pais, por todo apoio e incentivo, paciência nos momentos de estresse e desânimo e por terem me dado a oportunidade de seguir em frente e realizar meus sonhos e principalmente por não me deixarem fraquejar.

Às minhas irmãs e sogra, por toda ajuda e por compreenderem os inúmeros momentos em que estive ausente, me dedicando para concluir mais essa importante etapa em minha vida.

Aos meus amados sobrinhos Raphaela e Davi França, pelos momentos de alegria, pelas brincadeiras e por tornarem minha vida mais leve. Amo vocês!

Em especial ao meu noivo Victor Robles, por sempre ter apoiado minhas decisões e nunca ter medido esforços em me ajudar. Pelo companheirismo, pelo incentivo, pelas palavras nas horas difíceis e por compartilhar comigo mais essa conquista. Sem você ao meu lado não teria chegado até aqui!

Aos meus amados amigos, irmãos na fé, Kauna e Kaka, Margarete e Sena, Paula Fernanda e Daiane Caro, pelas orações, amizade e palavras de encorajamento.

À todos aqueles que não mencionei mas contribuíram de alguma forma para conclusão deste trabalho.

REGO, Brunna Emanuella França. **Avaliação da reatividade cruzada na sorologia da candidemia com antígeno gp43 nativa e gp43 recombinante de *P. brasiliensis***. 2015. 48 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) –Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*. É a micose sistêmica mais importante na América Latina, e acomete principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino. A glicoproteína de 43 kDa (gp43) é o antígeno de *P. brasiliensis* mais utilizado no imunodiagnóstico e epidemiologia da PCM, porém pode apresentar reatividade cruzada com antígenos de outros patógenos, devido aos epítomos de carboidrato. Este trabalho teve como objetivo a produção e purificação da gp43 recombinante, assim como a avaliação da reatividade da gp43 nativa e gp43 recombinante (rgp43) na sorologia da PCM e da candidíase sistêmica. A rgp43 foi produzida em *Escherichia coli* BL21 e purificada por cromatografia de afinidade. A reatividade cruzada da gp43 nativa de *P. brasiliensis* e rgp43 foi avaliada por Imunodifusão Radial Dupla (IDRD), ELISA indireto e *Western blot*, empregando amostras de soros de indivíduos soropositivos e soronegativos para candidíase sistêmica. As amostras soropositivas e soronegativas para candidíase sistêmica analisadas por IDRD e por ELISA, não apresentaram reatividade com exoantígeno de *P. brasiliensis*. No entanto, quando avaliada a reatividade cruzada da gp43 nativa por *Western blot*, verificamos que a gp43 nativa foi reconhecida por 72,7% e 10% das amostras soropositivas e soronegativas para candidíase sistêmica, respectivamente. Esses resultados sugerem que amostras soropositivas para candidíase sistêmica podem apresentar reatividade cruzada com a gp43 nativa no ensaio de *Western blot*, provavelmente devido à epítomos carboidrato.

Palavras-chaves: *Paracoccidioides brasiliensis*. Micose sistêmica. Imunodiagnóstico. gp43 recombinante. Reatividade cruzada.

REGO, Brunna Emanuella França. **Evaluation of cross-reactivity in serological tests for candidemia against antigens gp43 and recombinant gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis***. 2015. 48 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii*. It is the most important systemic mycosis in Latin America, and affects mainly male rural. The 43 kDa glycoprotein (gp43) is antigen most widely used in serological tests for the diagnosis and epidemiology of PCM, although cross-reactivity may occur with antigens of other pathogens, due to carbohydrate epitopes. The objective of this study was to produce recombinant gp43 and evaluate the cross-reactivity of native gp43 and recombinant gp43 (rgp43) in serology for PCM and systemic candidiasis. The rgp43 was produced in *Escherichia coli* BL21 and purified by affinity chromatography. The reactivity of *P. brasiliensis* native gp43 and rgp43 was evaluated by Agar Gel Immunodiffusion (AGID), indirect ELISA and *Western blot*, using serum samples from individuals seropositive and seronegative to systemic candidiasis. The seropositive and seronegative samples analyzed by AGID and ELISA showed no reactivity with *P. brasiliensis* exoantigen. However, a crossreactivity was observed against native gp43 by *Western blot* in 72.7% and 10% of seropositive and seronegative samples, respectively. These results suggest that serum samples positive for systemic candidiasis may cross-react with native gp43 in *Western Blot*, probably due to carbohydrate epitopes.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*. Systemic mycosis. Immunodiagnostics. Recombinant gp43. Crossreactivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Análise de expressão e solubilidade da <i>rgp43</i> em <i>E. coli</i> BL21.....	28
Figura 2 – Purificação da <i>rgp43</i> com adição de 5mM Imidazol.....	29
Figura 3 – Avaliação da reatividade de uma das amostras soropositivas e para candidíase sistêmica com exoantígeno de <i>P. brasiliensis</i>	30
Figura 4 – Avaliação da reatividade por ELISA indireto de amostras soropositivas e soronegativas de pacientes com candidíase sistêmica com exoantígeno de <i>P. brasiliensis</i> na sua forma nativa e desnaturada pelo calor	30
Figura 5 – Análise da reatividade de amostras soropositivas (n=11) e soronegativas (n=10) para candidíase sistêmica com <i>rgp43</i> (a) e <i>gp43</i> nativa (b) por <i>Western blot</i>	31
Figura 6 – Comparação da reatividade cruzada de amostras soropositivas de pacientes com candidíase sistêmica com <i>gp43</i> nativa por <i>Western blot</i> , antes e após tratamento da membrana de nitrocelulose com metaperiodato de sódio.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Analise comparativa dos resultados obtidos pelos métodos de IDR, ELISA indireto e <i>Western blot</i>	32
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
DAB	3-3'-diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D. O.	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
gp43	Glicoprotéina de 43 kDa
gp43 Δ Nt	Glicoproteína de 43 kDa sem 20 aminoácidos na extremidade N-terminal
H	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IDRD	Imunodifusão Radial Dupla
IPTG	Isopropilthio- β -D-galactosídeo
kDa	Quilodaltons
L	Litro
LB	Luria-Bertani
M	Molar
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
Ni	Níquel
Nm	Nanômetro

PBS	Tampão fosfato salino
PCM	Paracoccidiodomicose
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
rgp43	Glicoproteína de 43 kDa recombinante
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Seg	Segundo
TMBZ	3,3',5,5' tetrametilbenzidina
UTI	Unidade de terapia intensiva
V	Volts
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> E A PARACOCCIDIOIDOMICOSE	15
1.2	DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE	17
1.3	ANTÍGENO RECOMBINANTE GP43.....	18
1.4	CANDIDEMIA E <i>Candida albicans</i>	19
1.5	DIAGNÓSTICO DA CANDIDÍASE.....	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS.....	23
3.2	OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	23
3.2.1	TRANSFORMAÇÃO.....	23
3.2.2	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GP43 RECOMBINANTE EM <i>E. coli</i>	23
3.2.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GP43 RECOMBINANTE EM <i>E. coli</i>	24
3.2.4	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GP43 RECOMBINANTE	24
3.2.5	ANÁLISE DA GP43 RECOMBINANTE PURIFICADA.....	25
3.3	ANÁLISE DA REATIVIDADE PARA GP43 NATIVA E G43 RECOMBINANTE.....	25
3.3.1	ANÁLISE DA REATIVIDADE DE SOROPOSITIVO E SORO NEGATIVO DE PACIENTES COM PCM E CANDIDÍASE SISTÊMICA COM EXOANTÍGENO DE <i>P. brasiliensis</i> POR IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA (IDRD).....	25
3.3.2	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE AMOSTRAS SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS PARA CANDIDÍASE SISTÊMICA COM EXOANTÍGENO DE <i>P. brasiliensis</i> E GP43 RECOMBINANTE POR ELISA INDIRETO	26

3.3.3	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE AMOSTRAS SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS PARA CANDIDÍASE SISTÊMICA COM GP43 NATIVA E GP43 RECOMBINANTE POR <i>WESTERN BLOT</i>	27
3.3.4	TRATAMENTO DA MEMBRANA DE <i>WESTERN BLOT</i> COM METAPERIODATO DE SÓDIO.....	27
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4	RESULTADOS	28
4.1	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA GP43 RECOMBINANTE.....	28
4.2	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA DA GP43 NATIVA E GP43 RECOMBINANTE	29
4.2.1	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS SOROPOSITIVOS E SOROSNEGATIVOS DE PACIENTES COM CANDIDÍASE COM A GP43 NATIVA.....	29
4.2.2	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA DAS AMOSTRAS SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS PARA CANDIDÍASE PELO TESTE DE ELISA INDIRETO COM GP43 NATIVA E GP43 RECOMBINANTE.....	30
4.2.3	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA DE SORO POSITIVOS E NEGATIVOS PARA CANDIDÍASE POR GP43 NATIVA E GP43 RECOMBINANTE POR <i>WESTERN BLOT</i>	31
5	DISCUSSÃO	33
6	CONCLUSÃO	37
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Paracoccidioides brasiliensis* E A PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelos fungos *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* pertencentes ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem Onygenales, família Onygenaceae (TEIXEIRA *et al.*, 2009). O fungo *P. brasiliensis* originalmente descrito por Adolfo Lutz, no Brasil, em 1908 é um fungo termodimórfico, que cresce na forma miceliana a 25°C e na forma de levedura a 37°C (LUTZ, 1908; BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993). Essa transição para a forma de levedura no hospedeiro é essencial tanto para a sobrevivência do patógeno como para a invasão tecidual (FRANCO, 1986; SAN-BLAS; NIÑO-VEJA, 2008). Esta mudança morfológica é reversível e está ligada à regulação enzimática da síntese de glucanas que modificam a estrutura da parede celular do fungo (ARRAES *et al.*, 2005).

A forma miceliana do *P. brasiliensis* é caracterizada por hifas septadas, com a presença de conídios, enquanto que as células leveduriformes são constituídas por brotamentos múltiplos originados de uma célula-mãe, apresentando uma estrutura semelhante a uma roda de leme de navio (RESTREPO *et al.*, 2008).

A PCM é a micose sistêmica mais importante na América Latina, e acomete principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino entre 30 e 60 anos de idade (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). A menor prevalência da doença em mulheres ocorre pela influência do estrogênio, que interfere na conversão da forma de micélio para levedura (PINZAN *et al.*, 2010). Estudos sobre a inibição da transição dimórfica *in vitro* pelo hormônio feminino e demonstraram que o estrogênio liga-se a proteínas do fungo e retarda ou inibe a conversão para a forma de levedura (LOOSE *et al.*, 1983; RESTREPO *et al.*, 1984; STOVER *et al.*, 1986; SALAZAR *et al.*, 1988).

Acredita-se que o habitat natural do *P. brasiliensis* seja o solo e que a infecção ocorra provavelmente pela inalação de propágulos do fungo (RESTREPO *et al.*, 1985; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Uma vez inalados, os propágulos alcançam os bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares, sob a influência da temperatura corpórea convertem para a forma de levedura com possível disseminação para outros órgãos como pele, mucosas, fígado, baço e glândulas supra-renais por meio da circulação sanguínea ou linfática (SAN-BLAS *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2005). A PCM é uma doença granulomatosa crônica, e a resposta imune celular é o principal mecanismo de defesa levando a uma resposta tecidual específica do

hospedeiro contra o fungo, na tentativa de destruir e limitar o parasita, evitando assim sua multiplicação e disseminação (ANDRÉ *et al.*, 2004; CACERE *et al.*, 2008).

Na maioria dos casos a infecção apresenta-se assintomática, porém alguns indivíduos desenvolvem sinais e sintomas da doença resultando na forma crônica ou na forma aguda (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

A forma crônica acomete principalmente indivíduos adultos do sexo masculino. A progressão é lenta e silenciosa, pois o fungo *P. brasiliensis* tem a capacidade de permanecer quiescente no pulmão por longos períodos de tempo (RESTREPO *et al.*, 1984). Quando a PCM se desenvolve pode ficar restrita aos pulmões, com manifestações pulmonares presentes em 90% dos pacientes, sendo que a fibrose pulmonar é observada em cerca de 50% dos pacientes com infecção crônica nos pulmões, evoluindo em alguns casos para doença pulmonar obstrutiva crônica, ou levar a disseminação para outros órgãos (FRANCO, 1986; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Enquanto que na forma aguda ou subaguda, que é considerada a forma menos freqüente da PCM acomete principalmente crianças e adolescentes, ocorre comprometimento grave do sistema mononuclear fagocitário e caracteriza-se por evolução mais rápida (ROMANO *et al.*, 2005).

O estabelecimento da doença, sua disseminação e gravidade dependem de fatores ligados ao fungo, como virulência e composição antigênica e de fatores ligados à resposta imune do hospedeiro. Assim, nos pacientes com PCM, observa-se que formas graves da doença são acompanhadas pela perda gradual de resposta imune celulares específicas e por altos títulos de anticorpos, enquanto formas mais branda, tendem a cura, são concomitantes a resposta celular preservada e baixos níveis de anticorpos específicos (FRANCO, 1986).

A incidência da PCM é maior no Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela, e o Brasil detém 80% dos casos, distribuídos entre as regiões sul, sudeste e centro-oeste (WANKE; AIDÊ, 2009; BERNI *et al.*, 2010). Por ser uma doença sem notificação compulsória no Brasil, não existem dados precisos sobre a incidência de PCM, porém, de acordo com inquéritos epidemiológicos e relatos de casos, acredita-se que a incidência anual em zonas rurais endêmicas varie de 3 a 4 novos casos/1.000.000 de habitantes até 1 a 3 novos casos/100.000 habitantes (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; WANKE; AIDÊ, 2009).

A PCM foi a causa de 3.181 óbitos no Brasil entre 1980 e 1995, com média anual de 198,81 mortes. A taxa de mortalidade por milhão de habitantes no mesmo período foi de 1,45 casos, superando doenças como criptococose (0,33 casos por milhão de habitantes), pneumocistose (0,13 casos por milhão de habitantes) e histoplasmose (0,04 casos por milhão

de habitantes). Neste período, a PCM destacou-se como oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva entre as doenças infecciosas e parasitárias e a mais alta taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas (COUTINHO *et al.*, 2002).

Sendo assim, a PCM representa um importante problema de saúde pública devido à quantidade de mortes prematuras que provoca, e ao seu alto potencial incapacitante (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; WANKE; AIDÊ, 2009). Além disso, a falta de programas de controle ou de padronização no diagnóstico de PCM no país, aliados a deficiências de acesso e suporte da rede de serviços de saúde contribuem para um diagnóstico tardio (COUTINHO *et al.*, 2002; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

1.2 DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

O diagnóstico definitivo da PCM é obtido por meio da identificação do fungo em espécimes clínicos, como escarro, raspado de lesões cutâneas e de mucosas, aspirado ganglionar ou de material obtido por broncoscopia (CAMARGO; FRANCO, 2000; WANKE; AIDÊ, 2009). O diagnóstico da PCM pode ser feito por meio da detecção do fungo no material biológico ou pela cultura, porém constantemente o fungo na forma de levedura pode não ser observado ou ser confundido com outros fungos dimórficos, e o resultado de cultura é demorado devido ao crescimento lento do fungo. O exame histopatológico também é uma alternativa de diagnóstico da PCM, pois permite a visualização das formas fúngicas, no entanto é um procedimento invasivo (CARVALHO *et al.*, 2008; TELES; MARTINS, 2011).

Os testes sorológicos constituem uma importante ferramenta de auxílio no diagnóstico da doença, além de permitir o acompanhamento durante e pós-tratamento, uma vez que existe correlação direta entre resultado sorológico e gravidade da doença (FRANCO, 1986; BLOTTA *et al.*, 1999; DEL NEGRO *et al.*, 2000; DINIZ *et al.*, 2002; MARQUES *et al.*, 2003).

Os métodos sorológicos mais utilizados para o diagnóstico da PCM são Imunodifusão Radial Dupla (IDRD), ELISA e *Western Blot* (SILVA *et al.*, 2003). A maioria dos ensaios sorológicos emprega antígenos brutos obtidos a partir de filtrados de cultura do fungo, que podem conter componentes comuns a outros fungos e apresentar reações cruzadas com outras micoses como histoplasmose, aspergilose e candidíase (CAMARGO *et al.*, 1988; PUCCIA; TRAVASSOS, 1991; TABORDA; CAMARGO, 1994; CAMARGO; FRANCO, 2000).

1.3 ANTÍGENO RECOMBINANTE GP43

A glicoproteína com massa molecular de 43 kDa (gp43), presente no exoantígeno de *P. brasiliensis*, é o principal antígeno utilizado em testes sorológicos para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da PCM (CISALPINO *et al.*, 1996). A gp43 pode apresentar reatividade cruzada com antígenos de outros patógenos devido à presença de resíduos de galactofuranose na porção terminal da cadeia oligossacarídica (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991).

Cisalpino e colaboradores (1996) demonstraram através da clonagem e caracterização do gene codificante para gp43 que sua seqüência de aminoácido apresenta 58% de similaridade com a exo-1,3-beta-D-glucanase de *Candida albicans*.

Vários trabalhos descreveram a produção e caracterização de gp43 recombinante com o objetivo de produzir antígenos mais sensíveis e específicos para o imunodiagnóstico da PCM (CISALPINO *et al.*, 1996; DINIZ *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2008). A gp43 recombinante na forma solúvel só foi possível quando clonada em *Pichia pastoris*, porém apresentava a porção carboidrato que precisou ser retirada para eliminar reações cruzadas (CARVALHO *et al.*, 2008).

A primeira tentativa de expressar a gp43 recombinante em *Escherichia coli* demonstrou o reconhecimento do antígeno recombinante por soros de pacientes com PCM (TABA *et al.*, 1989). Cisalpino e colaboradores (1996) caracterizaram a seqüência completa do gene que codifica a gp43, posteriormente clonaram determinadas porções da gp43 em *E. coli* e analisaram a reatividade de diferentes regiões da gp43 obtidas utilizando-se soros de pacientes com PCM, que reagiram no teste de *Western blot*.

A produção da gp43 em *E. coli* avaliou a reatividade da molécula recombinante e de fragmentos da proteína recombinante com soros de pacientes com PCM. Desta forma verificaram que a gp43 na forma de molécula recombinante foi reconhecida por todos os soros analisados de pacientes com PCM (DINIZ *et al.*, 2002).

A gp43 recombinante pura é produzida por meio da tecnologia do DNA recombinante em *E. coli* permite sua obtenção em larga escala, bem como a redução de possíveis reações cruzadas em ensaios sorológicos, uma vez que não é glicosilada.

1.4 CANDIDEMIA E *Candida albicans*

As leveduras do gênero *Candida* fazem parte do reino Fungi; Divisão *Deuteromycotina*; Classe *Deuteromycetes*; Ordem *Cryptococcales*; Gênero *Candida*. Microscopicamente, essas leveduras se apresentam na forma unicelular chamadas de blastoconídeos e por vezes na forma de pseudohifas (resultante do alongamento, união e ramificação dos blastoconídeos) ao invadir tecidos. Macroscopicamente, as colônias são cremosas, branco-amareladas e de aspecto liso ou rugoso. São usualmente encontradas em reservatórios humanos e animais, solo, plantas, alimentos e ambiente hospitalar (SIDRIM, 1999; GIANNINI; MELHEM, 2000; LACAZ *et al.*, 2002; SILVA; DÍAZ; FEBRÉ, 2002).

As espécies de *Candida* podem fazer parte da microbiota da pele e mucosas do ser humano como um organismo comensal benigno (HELJIC *et al.*, 2005). A transição da forma comensal para patogênica oportunista se manifesta quando fatores predisponentes, fisiológicos, patológicos e mecânicos, modificam o relacionamento que ocorre entre o hospedeiro e a microbiota natural, podendo passar a causar infecções superficiais em pessoas saudáveis e, sistêmicas graves, colonizando a cavidade oral, trato gastrointestinal, respiratório e urinário além da circulação sanguínea (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PFALLER; DIEKEMA, 2007; JOUAULT *et al.*, 2009; MOCHON *et al.*, 2010).

Candidemia é uma infecção da corrente sanguínea causada por leveduras de *Candida* spp., sendo considerada a terceira causa mais frequente de infecção de corrente sanguínea na unidade de terapia intensiva (UTI) e a infecções sistêmicas com a mais alta taxa de mortalidade, atingindo 30% a 40% nos pacientes da UTI (FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ, 2008; NEUFELD, 2009; TAPIA *et al.*, 2011).

Muitos estudos epidemiológicos têm demonstrado que atualmente *Candida* spp são os principais patógenos causadores de fungemias em pacientes hospitalizados e aparecem como quarto microrganismo mais isolado em hemoculturas. Atualmente respondem por 8 a 12% do total das infecções da corrente sanguínea (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004; WENZEL; GENNINGS, 2005; NEUFELD, 2009).

Estudos mostram que na maioria dos casos, as leveduras isoladas da corrente sanguínea são pertencentes à microbiota do próprio paciente. Desta forma, a colonização prévia tanto da pele e mucosa torna-se potencial fonte para o desenvolvimento de candidemia (NUCCI; ANAISSIE, 2001). Numerosos relatos têm sugerido que o trato gastrointestinal (TGI) como a principal fonte de aquisição da *Candida* por via endógena. Por outro lado há de se considerar fatores que favorecem a colonização da pele, como fontes por via exógena. Outras hipóteses

da origem da infecção incluem o trato genitourinário e a administração de soluções endovenosas contaminadas durante o período de internação (COLOMBO *et al.*, 1996; VERDUYN LUNEL *et al.*, 1999; MELLADO *et al.*, 2000; NUCCI; ANAISSIE, 2001; BINELLI *et al.*, 2006).

Nucci e Anaissie (2001) relataram que as prováveis fontes de candidemia ocorrem pela translocação das leveduras do trato gastrointestinal para corrente sanguínea. A perda da integridade da mucosa do trato gastrointestinal devido à cirurgia, quimioterapia ou outras doenças criam uma porta de entrada por onde o fungo pode chegar a corrente sanguínea. Pela pele, as leveduras podem alcançar a corrente sanguínea como consequência da quebra da integridade deste tecido, ou seja, por invasão de uma lesão (queimadura, incisão cirúrgica, escara, entre outras) ou ainda via cateteres, sondas, drenos e próteses (COLOMBO *et al.*, 1999; NUCCI; ANAISSIE, 2001; FEJA *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2006).

Candida albicans é a espécie de *Candida* spp. responsável por cerca de 37,6% dos casos de candidemia, enquanto que a somatória das espécies não-*albicans* compõem 40% (TROFA *et al.*, 2008; VIDIGAL; SVIDZINSKI, 2009; NEUFELD, 2009; POIKONEN *et al.*, 2010; NUCCI *et al.*, 2013). *C. albicans* é uma levedura diplóide com história de dimorfismo fúngico invertido, ou seja, na fase de levedura é inócua enquanto que na forma de micélio patogênica. Este dimorfismo ocorre em resposta a condições ambientais, apresentando-se na forma de blastoconídios em meio rico de nutrientes, enquanto os filamentos são formados em resposta à falta de nutrientes. Esta característica dimórfica está envolvida na patogenicidade deste fungo (FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ, 2008; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Este fenômeno é importante para uma maior interação do fungo com o hospedeiro, permitindo a penetração e proliferação em uma grande variedade de tecidos. A transição de leveduras para hifas pode ser influenciada pela temperatura, pH, fontes de carbono e substâncias químicas e nutrientes presentes do meio (FEJA *et al.*, 2005; PÓTON, 2006; NEUFELD, 2009).

1.5 DIAGNÓSTICO DA CANDIDÍASE

O diagnóstico clínico da Candidíase por *C. albicans*, fundamenta-se na sintomatologia e na anamnese do paciente, porém os sinais e sintomas muitas vezes são inespecíficos devido a sua semelhança com infecções bacterianas, portanto é necessária a combinação de dados clínicos e laboratoriais (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

O diagnóstico laboratorial da candidíase é baseado na detecção de leveduras no material examinado por microscopia e cultura. A seguir os microrganismos são identificados segundo suas características bioquímicas e morfológicas. O limitante é que a sensibilidade da hemocultura é baixa, em torno de 50%, com elevado número de casos falsos negativos, porém novas estratégias têm sido empregadas no diagnóstico laboratorial das candidemias (ALONSO-VALLE *et al.*, 2003; MOCHON *et al.*, 2010).

Os métodos sorológicos são baseados na detecção de antígenos ou anticorpos anti-*Candida* no soro. Os antígenos mais utilizados para o diagnóstico da candidíase são constituintes da parede celular (Manana e β 1-3-glucana), metabolitos da membrana celular (D-arabinitol e enolase) e um antígeno de 47 kDa referente a um fragmento de uma proteína de choque térmico de 90kDa (HSP90) componente do citoplasma celular, e entre os anticorpos de destacam aqueles dirigidos contra antígenos da fase micelial (PÓTON, 2006; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Este trabalho teve como objetivo a produção e purificação da gp43 recombinante, uma vez que até o momento não existe a comercialização de um antígeno específico para a PCM, assim como a avaliação da reatividade cruzada da gp43 nativa e gp43 recombinante na sorologia da paracoccidiodomicose e da candidíase sistêmica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a reatividade de soros de indivíduos soropositivos e soronegativos para candidíase sistêmica com gp43 nativa e gp43 recombinante de *P. brasiliensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e purificar a proteína gp43 recombinante em *E. coli*
- Caracterizar a gp43 recombinante por ELISA indireto e *Western blot*.
- Analisar a reatividade de soros de indivíduos soropositivos e soronegativos para candidíase sistêmica com exoantígeno de *P. brasiliensis* por Imunodifusão Radial Dupla, ELISA e *Western Blot*.
- Analisar a reatividade de soros de indivíduos soropositivos e soronegativos para candidíase sistêmica com rgp43 por ELISA e por *Western Blot*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS

Os soros humanos utilizados neste trabalho foram provenientes de indivíduos soropositivos (n=11) e soronegativos (n=10) em um ensaio de ELISA IgG - Ridascreen R-Biopharm para candidemia por *Candida albicans*, cedidas por um Laboratório da região Oeste do Paraná. Para controle positivo foi utilizada amostra de soro de paciente com diagnóstico confirmado de PCM, enquanto para o controle negativo foram coletadas amostras de sangue de indivíduos soronegativos para PCM (alunos da UEL). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL.

3.2 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

3.2.1 TRANSFORMAÇÃO

Assunção (2012) em nosso laboratório obteve os plasmídeos recombinantes insolúveis produzidos de forma truncada na extremidade N-terminal (gp43 Δ Nt) retirando-se 20 aminoácidos desta região (g43 Δ NT). O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformação em *E. coli* BL21 (DE3) competente. O plasmídeo foi incubado com a bactéria por 30 min. no gelo. Foi realizado choque térmico à 62°C durante 30 seg. seguido por 2 min. no gelo. Após o protocolo de choque térmico, foi adicionado caldo LB no tubo de transformação, sem antibiótico, o qual foi mantido sob agitação à 37°C por 1 hora. A transformação foi plaqueada em meio LB ágar contendo Kanamicina 50 μ g/mL e Cloranfenicol 20 μ g/mL e incubada sob agitação a 37°C, *overnight*. Uma colônia foi selecionada e crescida em LB caldo nas mesmas condições do plaqueamento *overnight* a 37°C, sob agitação para produção do pré-inóculo.

3.2.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GP43 RECOMBINANTE EM *E. coli*

Em seguida, os pré-inóculos foram transferidos a uma concentração de 2% em um novo LB caldo seletivo e cultivado sob as mesmas condições acima, até que atingissem um valor de densidade óptica a 600nm entre 0,6 e 0,7. A expressão foi induzida pela adição de isopropilthio- β -D-galactosídeo (IPTG; Invitrogen™ Life Technologies) a 0,5mM durante 4 h. Ao final da indução uma alíquota do pré-inóculo foi coletado para avaliar sua expressão.

3.2.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GP43 RECOMBINANTE EM *E. coli*

A alíquota separada durante a indução foi centrifugada e ressuspensa em tampão de lise (Tris 0,1M pH 7,0, EDTA 1mM, lisozima 0,1mg/mL). Após incubação em gelo por 30 min, a mistura foi sonicada por ultra-som em banho de gelo por 6 vezes de 10 seg (Sonopuls Ultrasonic Homogenizers, Bandelin) e novamente centrifugada. O sobrenadante (que contém proteínas solúveis) foi separado para análise. O pellet, que contém proteínas insolúveis, foi ressuspensa em novo tampão (Tris 0,1M pH 8,0, NaCl 1,5M e EDTA 20mM) sonicado em gelo (3 ciclos de 10 seg) e centrifugado restando apenas corpos de inclusão como fração insolúvel. Ao sobrenadante e ao *pellet* foram adicionados tampão de amostra (Tris-HCl 0,025M pH 6,8, 2% SDS, 15% glicerol, 2,5% 2-mercaptoetanol, Azul de Bromofenol 0,004%), e após fervura por 5 min. foram submetidos a eletroforese em gel SDS-PAGE 10% de acordo com protocolo descrito por Laemmli (1970).

Ao término da corrida, os géis foram corados com solução Azul de Coomassie (metanol 50% (v/v), ácido acético glacial 7% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue (BIO-RAD) 0,25% (p/v) por 1 a 2 hrs sob agitação e descorados em solução de metanol 80% (v/v) e ácido acético glacial 20% (v/v) até o desaparecimento da coloração de fundo.

3.2.4 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GP43 RECOMBINANTE

Após confirmação da expressão da proteína, 2% da cultura contendo os plasmídeos recombinantes foram crescidas em 500 mL de LB caldo seletivo. O inóculo foi incubado à 37°C sob agitação até atingir D.O. 600nm entre 0,6 - 0,7 e, após indução com IPTG 0,5 mM por 4 hr, a cultura foi centrifugada. Para um teste inicial de purificação, células provenientes de 50 mL desta cultura foram utilizadas.

A proteína recombinante foi expressa fusionada a uma cauda de poli-histidina (6xHis tag) e purificada em coluna contendo resina de Ni-NTA Agarose (Qiagen®). Previamente, as células foram ressuspensas em tampão A (NaH₂PO₄ 50mM, pH 8,0, NaCl 300mM, lisozima 0,1mg/mL, PMSF 1mM) e incubado em gelo por 30 min. Em seguida, a mistura foi sonicada em gelo (7 ciclos de 10 seg), centrifugada e o *pellet* formado, ressuspensa em tampão (NaH₂PO₄ 100mM, pH 8,0, Tris 10mM e CH₅N₃- HCl 6M) com adição de 5mM de Imidazol (500mM NaCl, 20mM Pbs 60 mM Imidazol, pH 6,0), de modo a solubilizar as proteínas da fração insolúvel e diminuir a concentração de proteínas contaminantes.

Após nova sonicação nas condições descritas acima, e centrifugação, o sobrenadante, contendo as proteínas solubilizadas, foi incubado na proporção 4:1 (v/v) com resina Ni-NTA previamente equilibrada no tampão B com a adição de 5mM Imidazol, e homogeneizado por 1 hr e 30 min, a temperatura ambiente. A coluna foi lavada com tampão C (NaH₂PO₄ 100mM, pH 6,3, Tris 10mM e Uréia 8M) com adição de 5 mM Imidazol e tampão D (NaH₂PO₄ 100mM, pH 5,9, Tris 10mM e Uréia 8M) com adição de 5 mM Imidazol por 10 min. cada, para retirada das proteínas ligadas inespecificamente. Em seguida, foram realizadas duas eluições de 15 min cada com tampão E (NaH₂PO₄100mM, pH 4,5, Tris 10mM e Uréia 8M) e 2 eluições (15 min cada) e 1 eluição de 1 hr com tampão F (NaH₂PO₄, 100mM pH 4,0, Tris 10mM e Uréia 8M). As amostras obtidas das lavagens e das eluições foram coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE 10%.

Para a purificação da proteína recombinante a partir de células provenientes de 100 mL de cultura, foram realizadas duas lavagens adicionais de 10 min cada com o tampão C (pH 6,3) e 5 mM Imidazol e mais duas lavagens de 15 min cada com o tampão de eluição F (pH 4,0), devido à maior quantidade de proteínas expressas presentes na fração insolúvel.

3.2.5 ANÁLISE DA GP43 RECOMBINANTE PURIFICADA

As amostras coletadas das lavagens durante a purificação foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) corado com Comassie Blue. A banda da proteína recombinante apresentou massa aparente de 50 kDa, com posterior quantificação por espectrofotômetro NanoDrop Spectrophotometer Lite (Termo Fisher Scientific, Shangai, China).

3.3 ANÁLISE DA REATIVIDADE PARA GP43 NATIVA E G43 RECOMBINANTE

3.3.1 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE AMOSTRAS SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS DE PACIENTES COM PCM E CANDIDÍASE SISTÊMICA COM EXOANTÍGENO DE *P. brasiliensis* POR IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA (IDRD)

O teste de IDRD foi realizado conforme descrito por Camargo e colaboradores (1988). As lâminas de microscopia (75 x 25 mm) foram preparadas com 3,5 mL de agarose ultra pura (Invitrogen) 1% em tampão PBS. Em seguida, foram realizados orifícios na agarose da seguinte forma: um orifício central e seis orifícios ao redor com distância de 6 mm entre eles e medindo 3 mm de diâmetro cada um. Os orifícios centrais foram preenchidos com 25 µL de exoantígeno de *P. brasiliensis* e as amostras de soro (25 µL) foram adicionadas nos orifícios periféricos.

As lâminas foram incubadas 24 a 48 hrs em câmara úmida à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas e mantidas em solução salina 0,9% durante 48 hrs, com várias trocas neste período. Após secagem, as lâminas foram coradas por 15 min em solução de Azul de Coomassie (metanol 30% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue (BIO-RAD) 0,1% (p/v) e descoradas em solução metanol 30% (v/v) e ácido acético glacial 10% (v/v) até desaparecimento da coloração de fundo.

3.3.2 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE AMOSTRAS SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS PARA CANDIDÍASE SISTÊMICA COM EXOANTÍGENO DE *P. brasiliensis* E GP43 RECOMBINANTE POR ELISA INDIRETO

A reatividade da rgp43 foi comparada a da proteína nativa gp43 por meio de ELISA indireto. Placas de poliestireno de fundo chato foram sensibilizadas com 10µg/mL de exoantígeno de *P. brasiliensis* ou 10µg/mL de rgp43 em tampão carbonato 0,1M, pH 9,6, por 18 h, a 4°C. Após três lavagens com PBS-tween 0,05%, as placas foram bloqueadas com PBS-leite desnatado 5% por uma hora a 25°C. As placas foram lavadas com PBS-tween 0,05% e em seguida foram acrescentados 100 µL das amostras soropositivos e soronegativos dos pacientes com candidíase sistêmicas diluídos 1:100 em PBS-leite desnatado 1%, por uma hora a 25°C. Após lavagens com PBS-tween 0,05%, foi adicionado conjugado anti-IgG humana-peroxidase (Sigma) na diluição 1:60.000 em PBS-leite desnatado seguido de incubação por 1 h a 25°C. Após lavagens com PBS-tween 0,05% foi adicionada a solução de substrato/cromógeno (TMBZ/H₂O₂), e após 15 min de incubação a reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 4N. A leitura das absorvâncias a 450nm foi realizada em leitora de microplaca iMark™ Microplate Reader (BIO-RAD).

3.3.3 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE AMOSTRAS SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS PARA CANDIDÍASE SISTÊMICA COM GP43 NATIVA E GP43 RECOMBINANTE POR WESTERN BLOT

Inicialmente, foi realizada eletroforese de exoantígeno de *P. brasiliensis* em gel SDS-PAGE 10%, a 100 V em tampão Tris-Glicina pH 8,8. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, em tampão de transferência a 30V, 4°C, *overnight*. Após transferência, a membrana foi bloqueada com PBS-leite desnatado 5% por uma hora, à 25°C.

Seguiram-se três lavagens com PBS-tween 0,05% e adição das amostras soropositivas e soronegativas para PCM e candidemia diluídas 1:100 em PBS-leite desnatado 1% por uma hora, à 25°C. Após lavagens com PBS-tween 0,05% (foi acrescentado o conjugado anti-IgG humana-peroxidase - Sigma) diluído à 1:15.000 em PBS-leite desnatado 1%. Após 1 h, a membrana foi lavada com PBS-Tween 0,05% e a reação foi revelada com solução de DAB (3, 3'-Diaminobenzidina) e a reação foi interrompida com água destilada.

3.3.4 TRATAMENTO DA MEMBRANA DE WESTERN BLOT COM METAPERIODATO DE SÓDIO

Realizou-se eletroforese em gel SDS-PAGE 10% de exoantígeno de *P. brasiliensis*, seguida, de transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose como descrito anteriormente. Após transferência, a membrana foi incubada com 50mM de metaperiodato de sódio por 1hr em câmara escura (Alarcón de Noya et. al., 2000). As etapas seguintes foram realizadas conforme descrito anteriormente (3.4.3).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação da reatividade de amostras soropositivas e soronegativas para candidíase sistêmica com a gp43 nativa foi realizada utilizando o teste T, software Graphpad Prism 6.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia, USA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA GP43 RECOMBINANTE

Os extratos solúveis e os precipitados da *rgp43* pós indução com IPTG, foram analisados por eletroforese em gel SDS-PAGE 10%. Podemos observar a presença da proteína recombinante somente no *pellet* da cultura, indicando que a proteína está na forma insolúvel (Figuras 1, colunas 2, 5), o que podemos comprovar na coluna 6, em que verificamos a ausência da proteína recombinante no sobrenadante. Sendo assim, a purificação da proteína foi realizada sob condições desnaturantes.

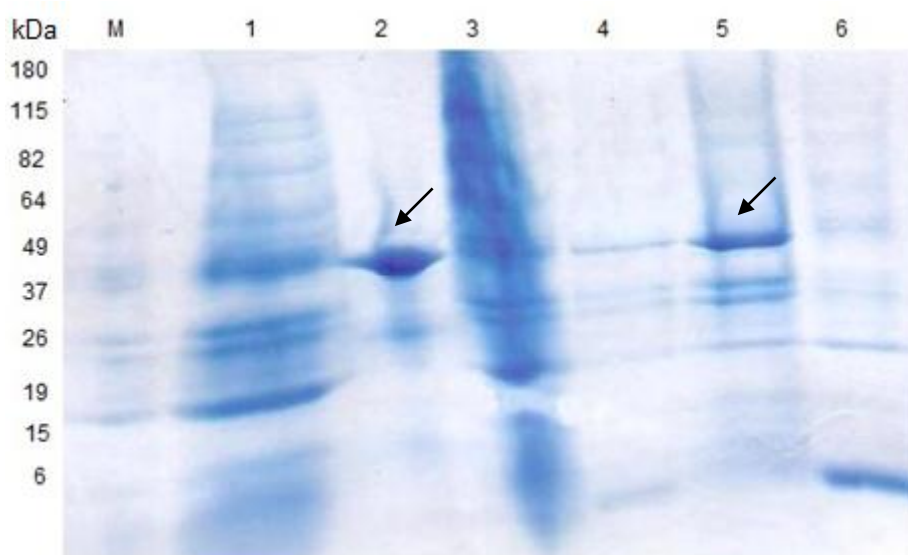


Figura 1. Análise de expressão e solubilidade da *rgp43* em *E. coli* BL21. M – padrão de massa molecular, kDa (BenchMark™Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen). 1 – extrato total de BL21(RP), 2 – *pellet* 4h após a indução, 3 – sobrenadante da cultura antes da indução, 4 – *pellet* da cultura antes da indução, 5 – sobrenadante após sonicação (tampão a e b), 6 – sobrenadante 4h antes da sonicação, Eletroforese em gel SDS-PAGE 10%, corado com Coomassie Brilliant Blue. A *rgp43* está indicada por setas.

Foi realizada uma purificação inicial a partir de células de 50 mL de cultura. A proteína apresentou massa aparente de 50 kDa. A *rgp43* foi observada em maior quantidade na 4ª eluição do Tampão F pH 4,0 resultando na obtenção de 0,698 mg/mL da *rgp43*. A proteína purificada obtidas na 4ª e 5ª eluição do Tampão F apresentaram uma concentração de 1,272 mg/mL, observando apenas a presença da *rgp43* (Figura 2, colunas 4, 5, 9 e 10).

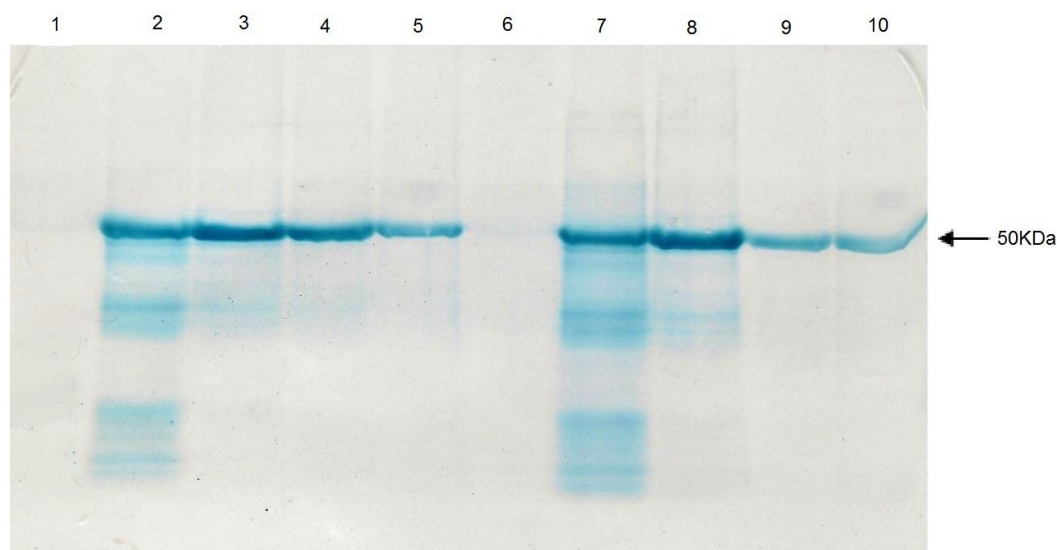


Figura 2. Purificação da rgp43 com adição de 5mM Imidazol.

1 – Tampão Lavagem D (pH 5,9), 2 - 2ª eluição Tampão E (pH 4,5), 3 - 3ª eluição Tampão F (pH 4,0), 4 - 4ª eluição Tampão F (pH 4,0), 5 - 5ª eluição Tampão F (pH 4,0), 6 - Tampão Lavagem D (pH 5,9), 7 - 2ª eluição Tampão E (pH 4,5), 8 - 3ª eluição Tampão F (pH 4,0), 9 - 4ª eluição Tampão F (pH 4,0), 10 - 5ª eluição Tampão F (pH 4,0). A seta indica a banda correspondente a rgp43 (50 kDa). Eletroforese em gel SDS-PAGE 10%, corado com Coomassie Brilliant Blue.

4.2 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA DE AMOSTRAS SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS PARA CANDIDÍASE SISTÊMICA COM GP43 NATIVA E GP43 RECOMBINANTE

4.2.1 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS SOROPOSITIVOS E SORONEGATIVOS DE PACIENTES COM CANDIDÍASE SISTÊMICA COM EXOANTÍGENO DE *P. brasiliensis*

As amostras soropositivas e soronegativas para candidíase sistêmica foram avaliadas por IDRD com exoantígeno de *P. brasiliensis*. Nenhuma das amostras soropositivas e soronegativas de candidíase sistêmica apresentaram linhas de precipitação com exoantígeno de *P. brasiliensis* (Figura 3 – A e B).

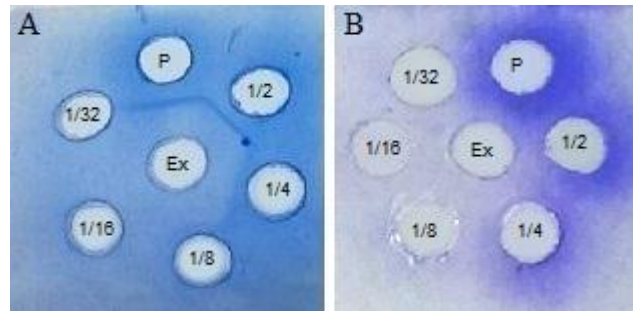


Figura 3. Avaliação da reatividade de uma das amostras soropositivas e para candidíase sistêmica com exoantígeno de *P. brasiliensis*.

A- Amostra soropositiva para PCM; B- Amostra soropositiva para candidíase sistêmica. Ex - Exoantígeno de *P. brasiliensis*, P – Amostra pura; Diluição 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32.

4.2.2 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DAS AMOSTRAS SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS PARA CANDIDÍASE SISTÊMICA PELO TESTE DE ELISA INDIRETO COM EXOANTÍGENO DE *P. brasiliensis* E GP43 RECOMBINANTE

Todas as amostras de soro positivas e negativas para candidíase sistêmica foram avaliadas pelo método de ELISA indireto utilizando exoantígeno de *P. brasiliensis* na sua forma nativa e desnaturado (figura 4), e rgp43. Não foi observada reatividade das amostras soropositivas e soronegativas para candidíase sistêmica com exoantígeno de *P. brasiliensis* na forma nativa e desnaturado pelo calor e com a rgp43.

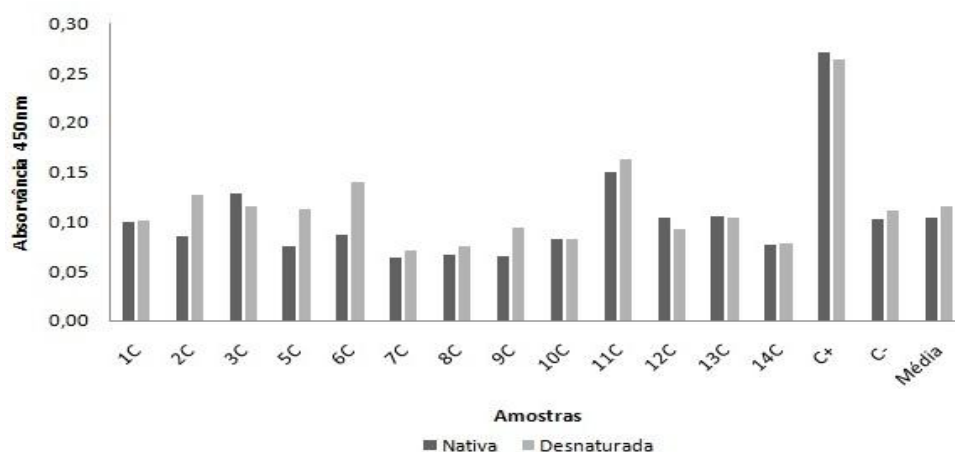


Figura 4. Avaliação da reatividade por ELISA indireto de amostras soropositivas e soronegativas de pacientes com candidíase sistêmica com exoantígeno de *P. brasiliensis* na sua forma nativa e desnaturada pelo calor.

4.2.3 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE AMOSTRAS SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS PARA CANDIDÍASE SISTÊMICA COM GP43 NATIVA E GP43 RECOMBINANTE POR WESTERN BLOT

Para o teste de *Western blot* foram utilizadas a gp43 nativa e rgp43 purificada. Os resultados mostraram que 8 de 11 amostras soropositivas para candidíase sistêmica reagiram com a gp43 nativa de *P. brasiliensis* mostrando reação cruzada com a gp43 nativa. Enquanto 3 amostras soropositivas para candidíase sistêmica não reagiram com a gp43 nativa. Apenas uma de 10 das amostras soronegativas para candidíase sistêmica reconheceu a gp43 nativa, e 9 amostras soronegativas para candidíase sistêmica não reagiram com a gp43 nativa. Enquanto todas as amostras soropositivas e soronegativas de pacientes com candidíase sistêmica não reagiram com rgp43 (Figura 5).

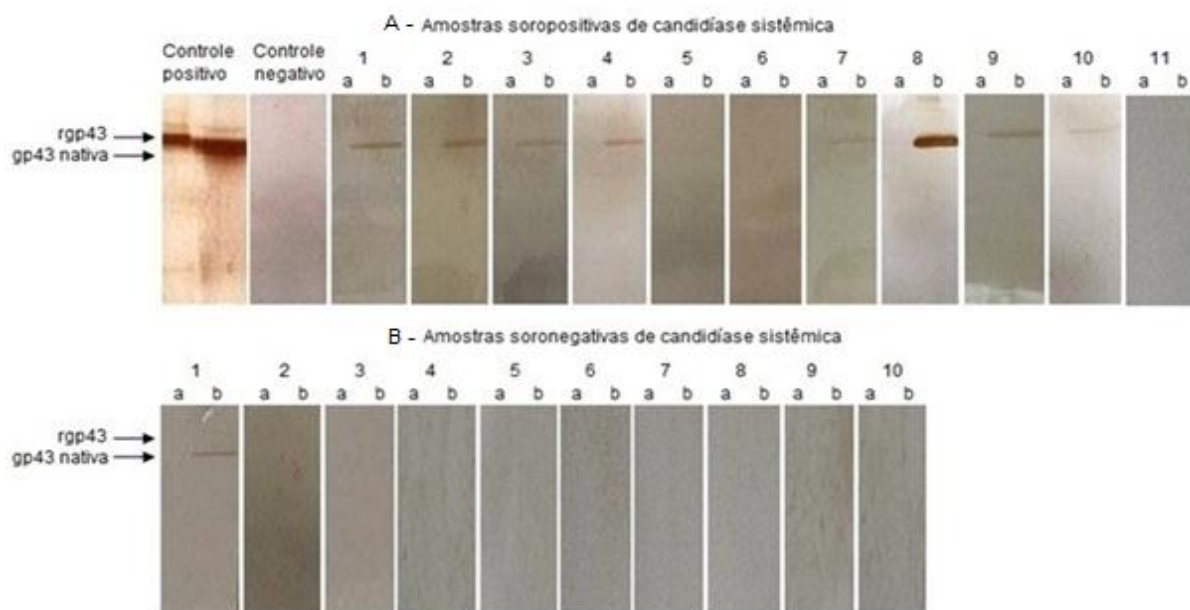


Figura 5. Análise da reatividade de amostras A- soropositivas (n=11) e B- soronegativas (n=10) para candidíase sistêmica com rgp43 (a) e gp43 nativa (b) por *Western blot*. Controle Positivo - amostra soropositiva para PCM, Controle negativo - amostra soronegativa para PCM.

Os resultados da reatividade das amostras soropositivas e soronegativas para candidíase sistêmica avaliados pelos testes de IDR, ELISA indireto e *Western blot* descritos anteriormente estão expostos na Tabela 1. As amostras soropositivas para candidíase sistêmica apresentaram reatividade significativamente maior com a gp43 nativa por *Western blot* que as amostras soronegativas.

Tabela 1. Análise comparativa dos resultados obtidos pelos métodos de IDR, ELISA indireto e *Western blot*.

Candidíase Sistêmica	IDRD exoantígeno		ELISA exoantígeno		ELISA rgp43		Western blot gp43 Nativa		Western blot rgp43	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Positivos (n= 11)	0 (0%)	11 (100%)	0 (0%)	11 (100%)	0 (0%)	11 (100%)	8 (72,7%) ^{****}	3 (27,3%)	0 (0%)	11 (100%)
Negativos (n=10)	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	10 (100%)	1 (10%)	9 (90%)	0 (0%)	10 (100%)

Para avaliar se a reatividade cruzada com a gp43 nativa estava relacionada com epítomos carboidrato, após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram tratadas com metaperiodato de sódio seguido de incubação de cada uma das 9 amostras previamente positivas no *Western blot*. Os resultados demonstraram uma redução na reatividade com a banda da gp43 das amostras soropositivas e soronegativas de pacientes com candidíase sistêmica no *Western blot* após o tratamento da membrana com metaperiodato de sódio (Figura 6).



Figura 6. Comparação da reatividade cruzada de amostras soropositivas de pacientes com candidíase sistêmica com gp43 nativa por *Western blot*, antes e após tratamento da membrana de nitrocelulose com metaperiodato de sódio.

5 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas vários estudos foram realizados para obtenção de antígenos mais sensíveis e específicos para utilização no imunodiagnóstico da PCM (BLUMER; JALBERT; KAUFMAN, 1984; RESTREPO *et al.*, 1984; CAMARGO *et al.*, 1988). Com o objetivo de reduzir as reações cruzadas, pesquisadores têm utilizado técnicas de biologia molecular para produção de antígenos recombinantes, entre eles a gp43 de *P. brasiliensis* (TABA *et al.*, 1989; CISALPINO *et al.*, 1996; DINIZ *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2008). Tais antígenos podem ser produzidos em larga escala em sistemas heterólogos, facilitando o processo de padronização e reduzindo reações-cruzadas em ensaios sorológicos, uma vez que proteínas recombinantes expressas em bactérias não são glicosiladas (DINIZ *et al.*, 2002).

Vários trabalhos descreveram a produção e caracterização de gp43 recombinante com o objetivo de aumentar a especificidade no imunodiagnóstico da PCM (TABA *et al.*, 1989; CISALPINO *et al.*, 1996; DINIZ *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2008). Taba e colaboradores (1989) realizaram o primeiro estudo com a gp43 produzida em *E. coli*, demonstrando o reconhecimento da gp43 recombinante por soros de pacientes com PCM. Cispalino e colaboradores (1996) caracterizaram, clonaram a gp43 produzida em *E. coli*, avaliando por *Western blot* a reatividade da gp43 recombinante com soros de pacientes com PCM.

Diniz e colaboradores (2002) avaliaram a reatividade da gp43 recombinante (retirando-se 35 aminoácidos da porção N-terminal) produzida em *E. coli* e todos os soros de pacientes com PCM testados reconheceram a gp43 recombinante no ensaio de *Western blot*. Em nosso laboratório Assunção (2012) clonou e expressou a gp43 recombinante em *E. coli*. A rgp43 se apresentou insolúvel e com massa molecular de aproximadamente 50 kDa pois possui alguns aminoácidos do vetor fusionados a proteína clonada. Neste trabalho, avaliamos a reatividade cruzada da gp43 nativa e rgp43 com amostras soropositivas e soronegativas para candidíase sistêmica nos testes mais utilizados para o imunodiagnóstico da PCM (IDRD, ELISA e *Western blot*).

As amostras soropositivas e soronegativas para candidíase sistêmica foram analisadas por IDRD, e não apresentaram reatividade com exoantígeno de *P. brasiliensis*. Uma possível explicação para a não reatividade observada na IDRD seria devido à menor sensibilidade desse teste.

A IDRD é a principal técnica utilizada no diagnóstico e monitoramento de pacientes em tratamento com PCM. É um método de baixo custo, porém é menos sensível, podendo

apresentar resultados falso-negativos (TABORDA; CAMARGO, 1994; CAMARGO; FRANCO, 2000; ELIAS-COSTA *et al.*, 2000).

Del Negro e colaboradores (1995) relataram a não reatividade de algumas amostras de soro de pacientes com PCM com a gp43 de *P. brasiliensis* por IDR, porém as mesmas amostras foram positivas por *Western blot*. Takahachi e colaboradores (1999) analisaram 78 soros de pacientes com suspeita clínica de PCM, negativas por IDR, e verificaram que por *Western blot*, 51 amostras reagiram com a gp43 de *P. brasiliensis*.

O *Western blot* é um método de custo médio a elevado, de procedimento longo, que possui alta sensibilidade e especificidade, permitindo o reconhecimento de antígenos alvo. Devido a sua alta sensibilidade e especificidade este método tem sido avaliado como alternativa para o diagnóstico da PCM humana e no monitoramento dos pacientes em tratamento (TABORDA; CAMARGO, 1994).

No *Western blot* as frações antigênicas são separadas eletroforéticamente segundo sua massa molecular, expondo desta forma os epítomos imobilizados na membrana de nitrocelulose, favorecendo, a ligação com o anticorpo (CAMARGO; FRANCO, 2000; ELIAS-COSTA *et al.*, 2000). Além disso, a detecção da reação antígeno-anticorpo é amplificada pelo conjugado imunoenzimático, permitindo a detecção de baixos níveis de anticorpos. A maior sensibilidade do *Western blot*, em relação à IDR, permite a detecção de anticorpos mesmo em casos recentes de infecção e/ou soroconversão (MENDES-GIANNINI; MELHEM, 2001; CAMARGO, 2008).

A reatividade das amostras soropositivas e soronegativas para candidíase sistêmica com gp43 nativa proveniente de exoantígeno de *P. brasiliensis* e rgp43 foi avaliada por meio dos métodos de ELISA indireto e *Western blot*.

Quando analisadas por ELISA indireto nenhuma das amostras soropositivas e soronegativas para candidíase apresentou a reatividade cruzada com exoantígeno de *P. brasiliensis* e com rgp43.

No entanto, quando avaliada a reatividade cruzada da gp43 nativa por *Western blot*, verificamos que a gp43 nativa foi reconhecida por 72,7% das amostras soropositivas e 10% das amostras soronegativas para candidíase. Esses resultados sugerem que os anticorpos presentes nas amostras soropositivas para candidíase sistêmica reconhecem epítomos de carboidrato presentes na gp43 nativa. A positividade por *Western blot* de uma das amostras soronegativas, por sua vez, provavelmente se deve ao contato prévio do indivíduo com *P. brasiliensis*.

Embora a gp43 seja o antígeno mais utilizado no diagnóstico da PCM pode apresentar reatividade cruzada com antígenos de outros patógenos devido a epítomos carboidrato (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991).

A reatividade cruzada na detecção de anticorpos por ensaios imunoenzimáticos é freqüentemente encontrada entre diferentes micoses como PCM, aspergilose, histoplasmose e candidíase, visto que os patógenos causadores destas enfermidades compartilham componentes antigênicos (KAUFMAN; STANDARD, 1988).

A rgp43 obtida neste trabalho demonstrou bons resultados quanto à eliminação da reatividade cruzada quando avaliada por *Western blot*, pois as amostras soropositivas e soronegativas de pacientes com candidíase sistêmica não apresentaram reatividade com rgp43, demonstrando sua especificidade para PCM.

A não reatividade das amostras soropositivas para candidíase sistêmica com exoantígeno de *P. brasiliensis* no ELISA, provavelmente se deve a diferenças conformacionais dos epítomos, pois no ensaio de *Western blot* ocorre a desnaturação das proteínas, enquanto que no ELISA as proteínas encontram-se na forma nativa.

Como foi observada reatividade cruzada com gp43 nativa no *Western blot*, foi realizado o teste de ELISA indireto utilizando exoantígeno de *P. brasiliensis* desnaturado pelo calor. Embora tenha ocorrido um pequeno aumento nas absorvâncias, ainda permaneceram abaixo do valor de corte, sugerindo que os epítomos responsáveis pela reatividade cruzada não são de natureza protéica. Acreditamos no ensaio de *Western blot* os epítomos de carboidrato tornam-se mais acessíveis aos anticorpos.

Puccia e Travassos (1991) avaliaram a reatividade de soros de pacientes com PCM, histoplasmose e lacaziose frente à gp43 purificada de *P. brasiliensis*. Os autores observaram que os soros de pacientes com PCM apresentavam reatividade com epítomos peptídicos, enquanto que os soros de pacientes com histoplasmose e lacaziose ligaram-se, preferencialmente, aos epítomos ricos em carboidratos, contendo resíduos de galactose.

Pizzini e colaboradores (1999) demonstraram que a porção carboidrato esta intimamente ligada à reatividade cruzada com soros de pacientes com aspergilose, coccidioomicose e histoplasmose.

Carvalho e colaboradores (2008) avaliaram a aplicabilidade de isoformas recombinantes de gp43 produzidas por *P. pastoris* pelo método de *dot blot*, verificando reação cruzada com outras micoses, a qual foi eliminada após deglicosilação do antígeno.

Mendoza e colaboradores (2008) relataram que na técnica de *Western blot* ocorreu reação cruzada da gp43 de *P. brasiliensis* com soros positivos para lacaziose. Passos (2012)

observou pela mesma técnica, reatividade cruzada entre gp43 de *P. brasiliensis* e amostras de soro de pacientes com histoplasrose e aspergilose, enquanto nenhuma dessas amostras foi reagente para PCM por IDRDR.

Para avaliar se a reatividade com a gp43 nativa estava relacionada com epítomos carboidrato, realizamos o *Western blot* após o tratamento das membranas de nitrocelulose com metaperiodato de sódio. Os resultados demonstraram que após o tratamento da membrana de nitrocelulose com metaperiodato de sódio houve uma redução na reatividade cruzada com as amostras soropositivas e soronegativas para candidíase sistêmica, sugerindo que os anticorpos são dirigidos aos epítomos de carboidratos.

Zancopé-Oliveira e colaboradores (1994) analisaram por *Western blot* a reatividade cruzada do antígeno de histoplasma após oxidação dos epítomos de carboidrato com metaperiodato de sódio com amostras de soro de pacientes com PCM e aspergilose, no entanto, verificaram que o processo de oxidação dos epítomos de carboidrato do antígeno pode reduzir a reatividade cruzada em soros de pacientes com histoplasrose, sem, no entanto, eliminá-la.

Taborda e Camargo (1994) avaliaram a oxidação de epítomos carboidrato da gp43 através do tratamento com metaperiodato de sódio e observaram aumento na sensibilidade e na especificidade.

Albuquerque, Silva e Camargo (2005) avaliaram se o tratamento da gp43 com metaperiodato de sódio poderiam eliminar a reatividade cruzada, entretanto este procedimento foi insuficiente para eliminar a reatividade cruzada.

A proteína glicosilada demonstrou ser específica para PCM no teste de imunodifusão, porém no ensaio de *dot blot* só foi alcançado 100% de especificidade após tratamento com metaperiodato ou após a deglicosilação enzimática (CARVALHO *et al.*, 2008).

Embora o *Western blot* com gp43 nativa tenha sido utilizado em outros estudos como método diagnóstico e de monitoramento para PCM, os nossos resultados sugerem que a utilização da gp43 nativa pela técnica de *Western blot* pode levar a reações falso-positivas com amostras soropositivas para candidíase sistêmica, o que não ocorreu quando utilizado a rgp43, demonstrando sua sensibilidade e especificidade para PCM.

6 CONCLUSÃO

Amostras soropositivas para candidíase sistêmica não apresentam reatividade com a gp43 nativa e gp43 recombinante de *P. brasiliensis* no ensaio de IDRD E ELISA, porém no ensaio de *Western blot* podem apresentar reação cruzada com a gp43 nativa de *P. brasiliensis*.

As amostras soropositivas e soronegativas para candidíase sistêmica não reagem com a rgp43, sugerindo que este antígeno é melhor que a gp43 nativa para o diagnóstico da PCM humana por *Western blot*.

7 REFERÊNCIAS

ALARCÓN DE NOYA, B. *et al.* *Schistosoma mansoni*: Immunodiagnosis Is Improved by Sodium Metaperiodate Which Reduces Cross-reactivity Due to Glycosylated Epitopes of Soluble Egg Antigen. **Experimental Parasitology**, v. 95, p. 106-112, 2000.

ALBUQUERQUE, C. F.; SILVA, S. H. M.; CAMARGO, Z. P. Improvement of the Specificity of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1944-1946, 2005.

ALONSO-VALLE, H.; ACHA, O.; GARCIA-PALOMO, J. D.; FARINAS-ALVAREZ, C.; FERNANDEZ-MAZARRASA, C.; FARINAS, M. C. Candidemia in tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**, v. 22, p. 254-7, 2003.

ALVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

ANDRÉ, D. C.; LOPES, J. D.; FRANCO, M. F.; VAZ, C. A.; CALICH, V. L. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 549-558, 2004.

ARRAES, F. B.; BENOLIEL, B.; BURLET, R. T.; COSTA, P. L.; GALDINO, A. S.; LIMA, L. H.; MARINHO-SILVA, C.; OLIVEIRA, L. P.; PFRIMER, P. General metabolism of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 2, p. 290-308, 2005.

ASSUNÇÃO, T. R. S. Desenvolvimento de método para diagnóstico da paracoccidioidomicose humana utilizando antígeno recombinante de *Paracoccidioides brasiliensis*. 2012. 69 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. **Candidíases**. *Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis*, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BERNI, A. D. M.; JUNIOR, E.; ARAO FILHO, A.; PANIAGO, A. M. M. Protein-losing enteropathy in paracoccidioidomycosis identified by scintigraphy: report of three cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.14, n. 5, p.540-543, 2010.

BINELLI, C. A.; MORETTI, M. L.; ASSIS, R. S.; SAUAIA, N.; MENEZES, P. R.; RIBEIRO, E.; GEIGER, D. C.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M.; OLIVEIRA, M. S. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 6, p. 538-43, 2006.

BLOTTA, M. H.; MAMONI, R. L.; OLIVEIRA, S. J.; NOUÉR, S. A.; PAPAIOORDANOU, P. M.; GOVEIA, A.; CAMARGO, Z. P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and Epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 3, p. 390-394, 1999.

BLUMER, S. O.; JALBERT, M.; KAUFMAN, L. Rapid and realible method for production of a specific *Paracoccidioides brasiliensis* immunodiffusion test antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 404-407, 1984.

BOTTEON, F. A. CAMARGO, Z. P.; BENARD, G.; COELHO, R. F.; CHAMONE, D. A.; ITANO, P. T. Paracoccidioides brasiliensis-reactive antibodies in Brazilian blood donors. **Medical Mycology**, v. 40, n. 4, p. 387-391, 2002.

BRITO, L. R.; GUIMARAES, T.; NUCCI, M.; ROSAS, R. C.; PAULA ALMEIDA, L.; DA MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 44, n. 3, p. 261-6, 2006.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.

CACERE, C. R.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FONTES, C. J.; KONO, A.; DUARTE, A. J.; BENARD, G. Altered expression of the costimulatory molecules CD80, CD86, CD152, PD-1

and ICOS on T-cells from paracoccidioidomycosis patients: Lack of correlation with T-cell hyporesponsiveness. **Clinical Immunology**, v. 129, p. 341-349, 2008.

CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S. P.; TRAVASSOS, L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 10, p. 2147-2151, 1988.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 41-48, 2000.

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

CARVALHO, K. C.; VALEJO, M. C.; CAMARGO, Z. P.; PUCCIA, R. Use of Recombinant gp43 Isoforms Expressed in *Pichia pastoris* for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 4, p. 622-629, 2008.

CISALPINO, P. S.; PUCCIA, R.; YAMAUCHI, L. M.; CANO, M. I.; DA SILVEIRA, J. F.; TRAVASSOS, L. R. Cloning, Characterization, and Epitope Expression of the Major Diagnostic Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 8, p. 4553-4560, 1996.

COLOMBO, A. L.; GUIMARAES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.5, p.599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; BRANCHINI, M. L.; GEIGER, D.; SCHIMIDT, A. L.; PIGNATARI, A. C.; FISCHMAN, O. Gastrointestinal translocation as a possible source of candidemia in an AIDS patient. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, n.3, p.197-200, 1996.

COSTA, P. F.; FERNANDES, G. F.; DOS SANTOS, P. O.; AMARAL, C. C.; CAMARGO, Z. P. Characteristics of environmental *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia**, v. 169, p. 37-46, 2010.

COUTINHO, Z. F.; Silva, D.; Lazéra, M.; Petri, V.; Oliveira, R. M.; Sabroza, P. C. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441-1441, 2002.

DEL NEGRO, G. M.; BERNARD, G.; DE ASSIS, C. M.; VIDAL, M. S.; GARCIA, N. M.; OTANI, C.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; LACAZ, C. S. Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. **Journal Medical and Veterinary Mycology**, v. 33, p. 113-116, 1995.

DEL NEGRO, G. M.; PEREIRA, C. N.; ANDRADE, H. F.; PALACIOS, S. A.; VIDAL, M. M.; CHARBEL, C. E.; BERNARD, G. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 37-46, 2000.

DINIZ, S. N. CARVALHO, K. C.; CISALPINO, P. S.; SILVEIRA, J. F.; TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R. 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**, v. 9, n. 6, p. 1200-1204, 2002.

ELIAS-COSTA, M. R., LACAZ, C. S.; KAWASAKI, M.; DE CAMARGO, Z. P. Conventional versus molecular diagnostic tests. **Medical Mycology**, v. 38, n. 1, p. 139-145, 2000.

ENLOE, B.; DIAMOND, A.; MITCHELL, A. P. A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, p. 5730-5736, 2002.

FEJA, K. N.; W. U, F.; ROBERTS, K.; LOUGHREY, M.; NESIN, M.; LARSON, E.; DELLA-LATTA, P.; HAAS, J.; CIMIOTTI, J.; SAIMAN, L. Risk factors for candidemia in critically ill infants: a matched case-control study. **Journal of Pediatrics**, v. 147, n. 2, p. 156-161, 2005.

FRANÇA, J. C. B; RIBEIRO, C. E. L; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e susceptibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 23-28, 2008.

GIANNINI, M. J. S. M.; MELHEM, M. S. C. Infecções Fúngicas. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2a . ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, cap.33, p.334-403.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GUERRERO, R. T.; SILVEIRA, R. M. B. **Glossário ilustrado de fungos, termos e conceitos aplicados à Micologia**. 2.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2003.

HELJIC, S. HUKIĆ, M.; DZINOVIĆ, A.; DOZIĆ, M.; BABIĆ. M. Fungal colonization of newborn in neonatal intensive care unit: a prospective study. **Journal Medical Archives**, v. 59, n. 4, p. 211-213, 2005.

JOUAULT, T. SARAZIN, A.; MARTINEZ-ESPARZA, M.; FRADIN, C.; SENDID, B.; POULAIN. D. Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1007–1015, 2009.

KAUFMAN, E. D.; STANDARD P. **Fungal exoantigens**. In Drouhet E, Cole GT, Repentigny L, Latge JP, Dupont B. eds. Fungal antigens. Isolation, 192 purification and detection. New York and London: Plenum Press, p.111-112, 1988.

LACAZ, C. S. PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; TAKAHASHI DE MELO, N. **Tratado de Micologia Médica**. 9a . ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LOOSE, D.S.; STOVER, E. P., RESTREPO, A.; STEVENS, D. A.; FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, p. 7659-7663, 1983.

LUTZ, A. Uma micose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hypho-blastomicoses americanas. **Brasil Medico**, 22: 141-144, 1908.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: Atualização Epidemiológica, Clínica e Terapêutica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, n. 2, p. 135-150, 2003.

MELLADO, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; REGADERA, J.; GONZÁLEZ, M.; DÍAZ-GUERRA, T. M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Sustained gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* in adult mice. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, n. 1, p. 21-28, 2000.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MELHEM, M. S. C. **Infecções fúngicas. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p. 334-403.

MENDOZA, L.; BELONE, A. F. F.; VILELA, R.; REHTANZ, M.; BOSSART, G. D.; REIF, J. S.; FAIR, P. A. Use of sera from humans and dolphins with lacaziosis and sera from experimentally infected mice for *Western blot* analyses of *Lacazia loboi* antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15 p. 164–167, 2008.

MOCHON, A. B.; YE, J.; KAYALA, M.A.; WINGARD, J.R.; CLANCY, C.J. Serological Profiling of a *Candida albicans* Protein Microarray Reveals Permanent Host-Pathogen Interplay and Stage-Specific Responses during Candidemia. **PLOS Pathogens**, 2010.

NEUFELD, P. M. Caracterização taxonômica e susceptibilidade a antifúngicos de leveduras isoladas de infecção hospitalar. 2009. 256 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? **Clinical Infectious Diseases**, v.33, n.12, p.1959-67, 2001.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T, TIRABOSCHI, I. N.; CORTES, J.; ZURITA, J. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PLoS ONE**, 2013.

OLIVEIRA, G. G.; SILVEIRA, L. H.; ITANO, E. N.; SOARES, R. M.; FREIRE, R. L.; WATANABE, M. A.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil. **Mycopathologia**, v. 171, p. 197-202, 2011.

PASSOS, A. N. Avaliação da aplicabilidade da técnica de *immunoblotting* para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*Paracoccidioides brasiliensis* e anti-*Histoplasma capsulatum* em laboratório de Saúde Pública. 2011. 231 p. Dissertação (Mestrado em Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública) – Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20 n. 1, p. 133-163, 2007.

PINZAN, C. F. RUAS, L. P.; CASABONA-FORTUNATO, A. S.; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Immunological Basis for the Gender Differences in Murine *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **Plos One**, v. 5, p. 1-10, 2010.

PIZZINI, C. V. ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; REISS, E.; HAJJEH, R.; KAUFMAN, L.; PERALTA, J. M. Evaluation of a *western blot* test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 1, p. 20-23, 1999.

POIKONEN, E.; LYYTIKÄINEN, O.; ANTTILA, VJ; KOIVULA, I; LUMIO, J; KOTILAINEN, P; SYRJÄLÄ, H; RUUTU, P. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 312, 2010.

PÓTON, J. Microbiological non-culture methods for the diagnosis of invasive candidíases: usefulness of surrogate markers. **Revista Iberoamericana de Micologia**, p. 2023:2025, 2006.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A.; TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 1, p. 199-206, 1986.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. 43-Kilodalton Glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: Immunochemical Reactions with Sera from Patients with

Paracoccidioidomycosis, Histoplasmosis, or Jorge Lobo's Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 1610-1615, 1991.

REIS, B. S.; BOZZI, A.; PRADO, F. L.; PEREIRA, M. C.; FERREIRA, F. E.; GODOY, P.; MORO, L.; PEDROSO, E. P.; LEITE, M. F.; GOES, A. M. Membrane and extracellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* (Mexo): Identification of a 28-kDa protein suitable for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 307, p.118-126, 2005.

RESTREPO, A. CANO, L. E.; OCHOA, M. T. A yeast-derived antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* useful for serologic testing. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 22, p. 23-29, 1984.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 23, p. 323-334, 1985.

RESTREPO, A.; BENARD, G.; DE CASTRO, C. C.; AGUDELO, C. A.; TOBÓN, A. M. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 29, n. 2, p. 182-197, 2008.

ROMANO, C. S. MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE, A. J.; BENARD, G. The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its h2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. **Clinical Immunology**, v.114, p. 86-94, 2005.

SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 711-713, 1988.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v. 40, n. 3, p. 225-242, 2002.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, v. 165, p. 183-195, 2008.

SHIKANAI-YASUDA M. A. TELLES, F. Q. F.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidiodomicose. **Consenso em paracoccidiodomicose. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J.; BEZERRA, L. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, p. 287, 1999.

SILVA, S. H. M.; COLOMBO, A. L.; BLOTTA, M. H.; LOPES, J. D.; QUEIROZ-TELLES, F.; PIRES DE CAMARGO, Z. Detection of Circulating gp43 Antigen in Serum, Cerebrospinal Fluid, and Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Paracoccidiodomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3675-3680, 2003.

SILVA V.; M CRISTINA DÍAZ J.; NALDY FEBRÉ Y. Red De Diagnóstico En Micología Médica. Vigilancia De La Resistencia De Leveduras A Antifúngicos. **Revista Chilena de Infectología**, v.19 n. 2, 2002.

STOVER, E. P.; SCHÄR, G.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A.; FELDMAN, D. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, v. 51, p. 199-203, 1986.

TABA, M. R. M. CARVALHO, K. C.; CISALPINO, P. S.; SILVEIRA, J. F.; TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R. Expression in *Escherichia coli* of a gene coding for epitopes of a diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Experimental Mycology**, v. 13, p. 223-230, 1989.

TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. Diagnosis of Paracoccidiodomycosis by Dot Immunobinding Assay for Antibody Detection Using the Purified and Specific Antigen gp43. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 554-556, 1994.

TAKAHACHI, G. Importância do *western blot* no diagnóstico seguro da Paracoccidiodomicose. **VII Encontro Internacional sobre Paracoccidiodomicose**; Campos do Jordão, São Paulo; 1999. p. 87.

TAPIA, G. G.; RAZONABLE, R. R.; ECKEL-PASSOW, J.; LAHR, B. D.; AFESSA, B.; KEEGAN, M. T.; CATANIA, J.; BADDOUR, L. M. A scoring model of factors associated with *Candida glabrata* candidemia among critically ill patients. **Mycoses**, 21 jul. 2011.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; DE CARVALHO, M. J.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; HAHN, R. C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 273- 283, 2009.

TELES, F. R. R.; MARTINS, M. L. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. **Talanta**, v. 85, p. 2254-2264, 2011.

TROFA, D.; GÁCSEER, A.; NOSANCHUK, J. D. Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606-625, 2008.

VERDUYN LUNEL, F. M.; MEIS, J. F.; VOSS, A. Nosocomial fungal infections: candidemia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 34, p. 213–220, 1999.

VIDIGAL, PG; SVIDZINSKI, TIE. Leveduras nos tratos urinários e respiratório: infecção fúngica ou não? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 1, p. 55-61, 2009.

VIUDES, A.; PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; UBEDA, P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; GOBERNADO, M. Candidemia at a terciary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 21, p. 767-74, 2002.

WALTHER, A.; WENDLAND, J. An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Current Genetics**, v.42, p. 339-343, 2003.

WANKE, B.; AIDÊ, M. A. Paracoccidioidomicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1245-1249, 2009.

WENZEL, RP; GENNINGS, C. Bloodstream infections due to Candida species in the intensive care unit: Identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 389-393, 2005.

WISPLINGHOFF, H.; BISHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospital analysis of 24179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 309-317, 2004.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M., BRAGG, S. L.; REISS, E.; WANKE, B.; PERALTA, J. M. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 1, n. 4, p. 390-393, 1994.