



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MÁRI SUMIGAWA KAMINAMI

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E IMUNOLÓGICA DE
SUB-FRAÇÕES DE ANTÍGENO DE ALTA MASSA
MOLECULAR DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS***

Londrina
2006

MÁRI SUMIGAWA KAMINAMI

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E IMUNOLÓGICA DE
SUB-FRAÇÕES DE ANTÍGENO DE ALTA MASSA
MOLECULAR DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS***

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

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano.

Londrina
2006

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

K15c Kaminami, Mári Sumigawa.
Caracterização bioquímica e imunológica de sub-frações de antígeno de alta
massa molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* / Mári Sumigawa
Kaminami. – Londrina, 2006.
40f.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade
Estadual de Londrina, 2006.
Inclui bibliografia.

1. *Paracoccidioides brasiliensis* – Teses. 2. Antígenos de fungos – Teses. 3.
Bioquímica – Teses. 4. Citocinas – Teses. 5. Resposta imune – Teses. I. Itano,
Eiko Nakagawa. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 616.993

MÁRI SUMIGAWA KAMINAMI

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E IMUNOLÓGICA DE
SUB-FRAÇÕES DE ANTÍGENO DE ALTA MASSA
MOLECULAR DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS***

Trabalho desenvolvido no Laboratório de
Imunologia I do Depto. de Ciências
Patológicas, CCB, UEL com apoio
financeiro da FINEP, Fundação Araucária
e PROPG/UEL

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

]

Prof. Dr. Fábio Alexandre Guimarães Botteon

Prof. Dr. Mário Augusto Ono

Londrina, 10 de Março de 2006.

**À
Deus, minha família e
especialmente ao
Nelson,
pelo incentivo, ajuda e
carinho**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, mais que mestre e orientadora, uma verdadeira amiga, minha gratidão e reconhecimento pela compreensão, atenção e orientação.

Aos Prof. Dr. Emerson Jose Venancio, Prof. Dr. Mário Augusto Ono e Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe, pela amizade e grande ajuda.

Ao Prof. Dr. Décio Sabatini Barbosa e funcionário Jair Antonio de Macedo, do Laboratório de Pós-graduação do Hospital Universitário de Londrina, pela valiosa colaboração.

Ao amigo Wander Rogério Pavanelli, meus sinceros agradecimentos, pela sua valiosa colaboração, amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Dirceu Estevão pela amizade e incentivo em minha carreira profissional.

A Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini e Prof. Dr. João Santana pela colaboração.

Aos amigos de laboratório Fernanda A. Nakanishi, Nadia H. Kamiji, Newton Hashimoto, Berenice Tomoko Tatibana, Audrey de Souza Márquez, Solange de Paula Ramos, Luciene Nagashima, Thiago Massuda e Paula C. Leonello pelo incentivo e colaboração.

Aos demais docentes do Departamento de Ciências Patológicas e Departamento de Microbiologia, pela compreensão e ajuda.

A FINEP, Fundação Araucária e PROPG/UEL pelo apoio financeiro.

Aos demais, que direta ou indiretamente motivaram este estudo.

KAMINAMI, Mári Sumigawa. **Caracterização bioquímica e imunológica de sub-frações de antígeno de alta massa molecular de *Paracoccidioides brasiliensis***. 2006. 42f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica progressiva causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. As diferentes formas clínicas da doença estão associadas com vários graus de supressão da imunidade celular dependendo da ativação preferencial de Th1 ou Th2. Objetivo deste trabalho foi caracterizar sub-fração de antígeno de alta massa molecular (hMM) de *P. brasiliensis*, assim como, avaliar a resposta imune humoral e celular a este componente. Inicialmente a fração de hMM (~380 kDa) foi obtida por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 e a seguir tratada papaína. A fração de hMM sem tratamento e tratada com papaína foi submetida a Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As frações foram analisadas por *dot blotting*/ELISA/*western blotting* utilizando pool de soros de pacientes com PCM e a seguir avaliada a resposta imune humoral e celular as frações antigênicas em paracoccidioidomicose experimental em camundongos Balbc. Determinou-se também a concentração de IL-10, IL-4 e INF- γ em sobrenadantes de linfócitos de camundongos estimulados com a fração de hMM e sub componente. Os resultados obtidos demonstraram que a fração de hMM de ~380 kDa pode gerar componentes de MM aproximadamente de ~70kDa e de ~27 kDa, sendo a de 70 kDa com capacidade de interagir com soros de pacientes com PCM. Tanto a fração ~380 kDa como sub-fração de ~70 kDa induziram resposta linfoproliferativa, com aumento de INF- γ , IL-10 e não de IL-4. Concluímos pelo trabalho que as frações de ~380 kDa e de ~70 kDa são antigênicas e apresentam a capacidade de induzir resposta imune celular possivelmente induzindo a ativação da resposta do tipo Th1.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. *Paracoccidioides brasiliensis*. Alta massa molecular. Antígeno, IgG. Resposta imune celular. Citocinas.

KAMINAMI, Mári Sumigawa. **Biochemical and imunological characterization of high-molecular-mass antigen subfractions of *Paracoccidioides brasiliensis***. 2006. 42 f. Dissertation (Master of Patology Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a progressive systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. The different clinical forms of the disease are associated with various degrees of suppression of cellular immunity, depending on the preferential activation of Th1 or Th2. The objective of this investigation was to characterize sub-fraction the antigen high-molecular-mass (hMM) component of *P. brasiliensis*, as well as to asses the humoral and cellular immune response to this component. Initially the hMM fraction (~380 kDa) was obtained by chromatography on a Sephadex G-200 column, and was then treated with papain. The untreated hMM fraction and the papain treated fraction were chromatographed on a high-preformance liquid column (HPLC). The fraction were analysed by *dot blotting*/ELISA/*western blotting* using pooled sera from PCM patients, followed by assessment of the humoral and cellular response to the antigenic fractions in experimental paracoccidioidomycosis in Balbc mice. The concentrations of IL-10, IL-4 and INF- γ in supermatants of lymphocytes of mice stimulated with the hMM fraction and subcomponents were also determined. The results obtained showed that the hMM fraction of ~380 kDa could generate MM components of approximately ~70 kDa and ~27 kDa. The 70 kDa component interacted with sera from PCM patients. Both the ~380 kDa fraction and the ~70 kDa subfraction induced a lymphoproliferative response, with increases in INF- γ and IL-10 but not in IL-4. From these data we conclude that the ~380 kDa abd ~70 kDa fractions are antigenic and capable of inducing a cellular immune response, possibly inducing activation of the Th1 type response.

Keywords: Paracoccidioidomycose. *Paracoccidioides brasiliensis*. High-molecular mass. antigen. Cellular immune response. Citokynes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Perfil espectrofotométrico de CFA Pb0018 por Cromatografia em Coluna de Sephadex G-200.....	26
Figura 2 – Perfil espectrofotométrico do re-fracionamento da fração de hMM (F17) em Coluna de HPLC	27
Figura 3 – Eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida SDS-PAGE da fração e sub-frações de hMM.....	27
Figura 4 – <i>Western blotting</i> da fração e sub-frações de hMM	28
Figura 5 – Produto da digestão de F17 com enzima papaína por cromatografia de HPLC.....	28
Figura 6 – <i>Western blotting</i> de F17 e F17 tratada com enzima papaína	29
Figura 7 – <i>Western blotting</i> do tratamento de F17 com enzima papaína a 37°C em diversos tempos de incubação.....	29
Figura 8 – Índice de proliferação celular em células de camundongos Balbc infectados com Pb18	30
Figura 9 – Avaliação de IgGs específicas em soros de camundongos Balbc	30
Figura 10 – Nível de gp43 solúvel em soros de camundongos Balbc	31
Figura 11 – Análise de IL-10 (pg/ml) em sobrenadante de cultura de linfócitos de camundongos Balbc	31
Figura 12 – Análise de IL- 4 (pg/ml) em sobrenadante de cultura de linfócitos de camundongos Balbc	32
Figura 13 – Análise de INF- γ (pg/ml) em sobrenadante de cultura de linfócitos de camundongos Balbc	33

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
ANOVA	Análise de variância
Anti-IgG	Anticorpo de imunoglobulina G
Anti-gp43	Anticorpo contra a gp43
AS	Antígeno somático
Balbc	Linhagem de camundongo
CFA	Antígeno “ <i>Cell free</i> ”
CFU	Unidade formadora de colônias
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cpm	Contagem por minuto
DAB	Diaminobenzidina
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ExoAg	Exoantígeno
F17	Fração 17
F17-IV	Sub-fração 17-IV
g	Giros
gp	Glicoproteínas
°C	Graus Celsius
h	Hora
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
hMM	Antígeno de alta massa molecular
IDRD	Imunodifusão radial dupla
IgG	Imunoglobulina G
IgE	Imunoglobulina E
INF-γ	Interferon gama
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
kDa	Quilodalton
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar

M	Molar
Min	Minuto
MM	Massa molecular
N	Normalidade
nm	Nanômetro
OPD	O-phenylenediamine Dihydrochloride
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb18	Paracoccidioides brasiliensis cepa 18
PBS	Tampão fosfato de sódio 0,15 molar
PCM	Paracoccidioidomicose
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluoride
pH	Potencial hidrogeniônico
RFC	Reação de fixação de complemento
RPMI	Meio de cultura para linfócitos
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SP	São Paulo
TCA	Ácido tricloacético
Th1	Células T helper um
Th2	Células T helper dois
%	Porcentagem
μl	Microlitro
μg	Micrograma
USA	Estados Unidos da América
V	Voltz
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 OBTENÇÃO DE ANTÍGENO <i>CELL FREE</i> (CFA Pb18)	16
3.2 AMOSTRAS DE SORO	16
3.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX G-200	16
3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	17
3.5 <i>DOT BLOTTING</i> DAS FRAÇÕES DE ALTA HMM POR CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX G-200 E SUB-FRAÇÕES DE ALTA HMM POR COLUNA DE HPLC	17
3.6 ELISA PARA DETECÇÃO DE IGG ANTI-COMPONENTE DE SUB-FRAÇÕES DO HPLC	18
3.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS (SDS-PAGE)	18
3.8 <i>WESTERN BLOTTING</i>	19
3.9 DIGESTÃO DA FRAÇÃO DE HMM COM ENZIMA PAPAÍNA	19
3.10 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALBC	20
3.11 CULTURA DE LINFÓCITOS DE CAMUNDONGOS E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA	20
3.12 ELISA CAPTURA PARA DETECÇÃO DE GP43 SOLÚVEL EM SOROS DE CAMUNDONGOS BALBC	21
3.13 CULTURA DE LINFÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DE CITOCINAS	21
3.14 ESTATÍSTICA	22
4 RESULTADOS	23
4.1 CROMATOGRAFIA DE CFA Pb18 EM COLUNA DE SEPHADEX G-200	23
4.2 RE-FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO F17 EM COLUNA DE HPLC	23
4.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR	23
4.4 <i>WESTERN BLOTTING</i> DAS FRAÇÕES E SUB-FRAÇÕES DE HMM	24
4.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE HPLC DO PRODUTO F17 DIGERIDA COM ENZIMA PAPAÍNA	24

4.6 ANÁLISE DE PRODUTO DE DIGESTÃO DA F17 EM ENZIMA PAPAÍNA POR <i>WESTERN</i> <i>BLOTTING</i>	24
4.7 RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA A F17 E F17-IV EM CAMUNDONGOS BALBC	24
4.8 DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS IGGs ESPECÍFICAS E DE GP43 SOLÚVEL EM SORO DE CAMUNDONGOS BALBC INFECTADOS COM PB18.....	25
4.9 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CITOCINAS IL-10, IL-4 E INF- γ EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE LINFÓCITOS DE CAMUNDONGOS BALBC INFECTADOS COM PB18	25
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa, sistêmica e de evolução crônica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) descrito inicialmente por Lutz, em 1908. A sua distribuição geográfica é limitada à América Latina, com maior incidência no Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina (Restrepo, 1974).

O fungo *P. brasiliensis* apresenta-se na fase leveduriforme quando cultivado entre 35-37°C ou nos tecidos do hospedeiro (Queiroz-Telles, 1994) e na forma miceliana à temperatura ambiente. É facilmente convertido à forma miceliana ou levedura alterando-se a temperatura de cultivo. O processo reversível é dependente da regulação enzimática da síntese de glucanas que causam modificações na parede celular do fungo (San-Blas, 1982).

Presumivelmente, *P. brasiliensis* habita o solo na forma miceliana. Acredita-se que a infecção ocorra através da inalação de propágulos miceliais, podendo o indivíduo infectado desenvolver a doença ou não. Na maioria das vezes ocorre a formação de um complexo primário pulmonar que regride espontaneamente com o estabelecimento da imunidade específica do hospedeiro. Nas lesões residuais de primo-infecção, pulmonares ou extra pulmonares, o fungo pode permanecer viável, em latência por muitos anos. Nas formas progressivas e disseminadas geralmente atingem os pulmões, mucosas, linfonodos, pele, adrenais, ou ainda outro órgão ou sistema (Londero & Del Negro 1986; Padilha-Gonçalves, 1985).

No *International Colloquim of Paracoccidioidomycosis* realizado em fevereiro de 1986, em Medellín, Colômbia, foi definida uma classificação relacionada à história natural da doença PCM: a) infecção; b) doença de forma aguda, ou subaguda (juvenil), ou forma crônica (adulto), ou forma residual (seqüelas). A forma aguda é mais severa e rara e, a forma crônica, pode se apresentar de forma benigna e localizada (unifocal) até casos mais severos e disseminados (multifocal), dependendo da eficiência da imunidade celular do indivíduo (Franco et al., 1987).

Por apresentar ampla gama de manifestações clínicas, o diagnóstico laboratorial é de grande importância no estabelecimento do

diagnóstico e prognóstico. A paracoccidiodomicose é diagnosticada por exames clínicos e radiográficos, exame microbiológico de escarros, raspados de células, pus, exames anatomopatológicos ou cultura do fungo (Custo et al., 1994). No entanto, nem sempre é possível a identificação direta do fungo, sendo necessária a utilização de outros meios diagnósticos, como os testes sorológicos. Os testes mais empregados são: imunodifusão radial dupla (IDRD) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (Lacaz et al., 1962; Restrepo & Moncada, 1974; Camargo et al., 1988; Somensi et al., 1996 e Camargo et al., 1984). Outros métodos são utilizados como: reação de fixação de complemento (RFC), reação de hemaglutinação, aglutinação, imunofluorescência e *western blotting* (Fava Neto, 1955; Taborda. & Camargo, 1993; Somensi, 1996; Cano et al., 1987; Camargo et al., 1991; Silva et al., 1989; Bueno et al., 1997; Hamilton, 1998).

A resposta imune celular é considerada a mais importante forma de defesa do hospedeiro contra este fungo (Burger et al., 1996) e pacientes com infecção disseminada apresentam um teste intradérmico com paracoccidiodina negativo e reações granulomatosas fracamente definidas (Montenegro & Franco, 1994). A resposta imune humoral não é considerada protetora, pois a intensa resposta humoral é correlacionada com a gravidade da doença (Singer-Vermes et al., 1993; Mello et al., 2002). Os indivíduos que apresentam PCM com forma crônica-unifocal geralmente apresentam a resposta imune celular associada a células T-helper 1 (Th1), enquanto os indivíduos que apresentam PCM aguda, crônica- disseminada (multifocal) apresenta resposta T-helper 2 (Th2), baseada na classe ou subclasse de imunoglobulinas G (IgG) e no padrão de citocinas produzidas (Singer-Vermes et al., 1993; Baida et al., 1999).

Diversas glicoproteínas são excretadas/liberadas pelo *P. brasiliensis* para o ambiente extracelular, principalmente as glicoproteínas de 27-kDa (gp27), 43-kDa (gp43), 55-kDa (gp55), 70-kDa (gp70), 87-kDa (gp87) e glicoconjugado polidisperso de alta massa molecular e glicolípídeos, 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 (SA) obtido por ruptura de *P. brasiliensis* (Puccia et al., 1986; Blotta & Camargo, 1993; Toledo et al., 1995; Ortiz et al., 1998; Salina et al., 1998). Alguns componentes de *P. brasiliensis* podem ser importante para a

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

Marquez et al., 2005, observaram altos níveis de IgG e não de IgE a componentes de alta-MM (hMM) de aproximadamente 386 kDa de *P. brasiliensis* no soro de pacientes com PCM na forma crônica mas não na forma aguda da doença, sugerindo a não indução da resposta Th2. Considerando a possibilidade da resposta imune à fração hMM ser benéfica ao hospedeiro, Pavanelli et al., 2004, estudaram atividade protetora da fração de alta massa molecular de *P. brasiliensis* em camundongos Balbc, evidenciando que ocorre imunidade protetora parcial, com diminuição de crescimento de colônias (CFU) e diminuição de antígenos circulantes.

Este trabalho tem como objetivo caracterizar parcialmente o componente de hMM de *P. brasiliensis* e analisar a sua ação imunomoduladora em camundongos Balbc.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

- Caracterizar o componente de alta massa molecular de *P. brasiliensis* e avaliar a sua ação imunomoduladora.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obter frações de componentes de alta massa molecular de *P. brasiliensis*.
- Obter sub-frações de hMM por enzima papaína.
- Determinar a massa molecular de sub-frações de hMM.
- Determinar a antigenicidade.
- Avaliar a resposta imune celular a fração de hMM e sub-fração de hMM em paracoccidiodomicose experimental em camundongos Balbc.
- Determinar nível de IL-4, IL-10 e INF- γ em sobrenadante de cultura de linfócitos estimulados com a fração de hMM e sub-fração de hMM em PCM experimental em camundongos Balbc.
- Avaliar a resposta imune humoral à fração de hMM e sub-fração de ~70 kDa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE ANTÍGENO *CELL FREE* (CFA Pb18) (Camargo et al.,1991)

O antígeno *cell free* foi obtido de *P. brasiliensis* cepa 18 (Pb18), cultivado em Ágar Sabouraud por 5 dias a 35°C. Após cultivo de 5 dias, foi colocado em solução salina-fosfato tamponada (PBS 0,15M e pH 7,4), com inibidor de protease PMSF a 2,5 mM (Sigma) e solução thimerosol a 0,02%. Foi homogeneizada em vortex, durante 15 minutos e a seguir centrifugada a 13.600 g a 4°C. A concentração da proteína foi determinada pela Técnica de Folim (Lowry et al., 1951).

3.2 AMOSTRAS DE SORO

Foram coletados aproximadamente 10 ml de sangue em seringa descartável estéril por punção venosa de pacientes com PCM do Ambulatório de Moléstia Infeciosas do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, após informações ao paciente na participação deste estudo e consentimento do mesmo, foi utilizado formulário de consentimento, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina. O sangue foi centrifugado a 292 g e o soro obtido estocados a -20°C para posterior análise.

3.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX G- 200

Amostra de 9 ml de CFA Pb18 (4 mg/ml) foi aplicada em Coluna de Sephadex G-200 seguida de eluição em PBS 0,15M pH 7,4. As frações obtidas pelo coletor automático de frações, foram analisadas em espectrofotômetro (Spectrum SP-2000UV) a 280 nm.

3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Amostra de 100 μ l da fração F17 (Coluna Sephadex G-200), foi re-fractionada em coluna de HPLC (Varian Pro Star), em coluna semi-analítica C18. Foi utilizado tampão gradiente: 50% tampão acetato de amônio (Merck, Alemanha) 300 mM pH 7,0 e 50% de água bidestilada (Milli Q). A pressão empregada foi 1410 a 97 bars, 2 ml/min. As concentrações das proteínas de sub-frações foram dosadas pela técnica de Folim e armazenadas a -80°C.

3.5 “DOT BLOTTING” DAS FRAÇÕES DE HMM POR CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX G-200 E SUB-FRAÇÕES DE HMM POR COLUNA DE HPLC

Amostras de 2 μ l de frações e sub-frações de hMM foram pipetadas em membrana de nitrocelulose (Gibco Invitrogen Corporation, Long Island, New York, EUA). A membrana foi bloqueada com solução leite mólico 5% com tween 20 em solução PBS 0,15M, por 1 hora em temperatura ambiente. Lavou-se 4x com tampão de lavagem (leite mólico 0,5% com tween 20 em PBS 0,15M). Em seguida a membrana foi colocada na presença de solução com “pool” de soros de pacientes PCM positivos diluído 1:40, incubando por 2h a 37°C. Após novas lavagens a membrana foi incubada com conjugado peroxidase anti-IgG humano (Sigma 8775) por 1:30 h a 37°C. A reação foi evidenciada com solução de diaminobenzidina (DAB - Sigma) e peróxido de hidrogênio em solução de PBS 0,15M.

3.6 ELISA PARA DETECÇÃO DE IGG ANTI-COMPONENTE DE SUB-FRAÇÕES DE HMM DO HPLC

Immunoplasmas (TPP, Switzerland), foram sensibilizadas com 3,5 µg de sub-fração hMM em tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,0, por 1 h a 37°C e 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com tampão de lavagem (leite molico 0,5% com tween 20 em PBS 0,15M) e bloqueadas com tampão de bloqueio (leite molico 5% com Tween 20 em solução PBS 0,15M), por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas, sendo então adicionado amostra de pool de soros de pacientes com PCM diluído 1:40, e incubadas por 2h a 37°C. Após nova lavagem, foi adicionado conjugado peroxidase anti-IgG humano (Sigma A 8775), diluído 1:12000 em tampão de diluição. Após 1 hora e 30 minutos a 37°C a placa foi lavada e a reação evidenciada com solução OPD (O-phenylenediamine Dihydrochloride - Sigma) em tampão substrato e peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida após 30 minutos, com ácido sulfúrico 4N. A absorvância foi determinada em Aparelho Multiscan a 492 nm. Foram consideradas positivas as frações, em que a leitura em absorvância, apresentaram valores 2 vezes acima do valor de referência (sem anticorpo).

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

Amostras de 20 µl (preparadas previamente v/v em tampão de amostra 2 vezes, fervidas e centrifugadas). As amostras CFA Pb18 (4 mg/ml), fração F17 e sub-fração de hMM-HPLC e padrão de proteína de MM de 10-200 kDa (Invitrogen 1078-010), foram submetidas a eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida de 5-15%.

Após a corrida, em tampão tris glicina 1M (Pharmacia Biotech – Sweden e Sigma Co., Germany), pH 8,2 a 100 V, o gel foi colocado em solução de TCA [Ácido tricloroacético (Sigma Co, USA)] a 10% por 30 minutos. Foi realizada lavagens de 10 minutos com solução de etanol 10% (Vetec, Rio de

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

3.8 WESTERN BLOTTING

Após a corrida eletroforética, as amostras foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Gibco Invitrogen Corporation, Long Island, New York, USA) em tampão tris-HCl-metanol a 23 V por 18 horas e 100 V por 1 h. A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio, por 1 h à temperatura ambiente, seguida de lavagem com tampão de lavagem. Foi adicionado solução de “pool” de amostras de soros de pacientes com PCM (soros positivos por ELISA com exoantígeno) diluído 1:40 por 2h a 37°C, seguida de lavagens com tampão de lavagem e adição de conjugado peroxidase anti-IgG humano diluído 1:3000 (Sigma A-8775, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), por 1:30 h a 37°C. A membrana foi novamente lavada, a qual foi revelada com DAB (diaminobenzidina-Sigma Co., USA) em PBS 0,15M e peróxido de hidrogênio.

3.9 DIGESTÃO DA FRAÇÃO DE HMM COM ENZIMA PAPAÍNA

10 mg de papaína (Sigma) foram adicionados em 50 µl de 0,3M tampão iodoacetamida (Sigma) contendo 50 µl da fração de hMM (2 µg). Para determinar-se o melhor tempo de digestão da molécula de hMM, foi realizada várias incubações a 37°C: 0', 15', 30', 60', 90', 2 h, 4 h, 8h e 24 h.

3.10 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALBC

Foram utilizados 16 camundongos Balbc machos de 4 a 6 semanas, alimentados “ad libitum”. Dez camundongos foram infectados por via endovenosa com 1×10^6 céls./ml de *P. brasiliensis* (Pb18) e 6 camundongos controles foram inoculados com solução de PBS 0,15M estéril. Os camundongos, foram manipulados conforme normas e autorização do Comitê de ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Londrina.

3.11 CULTURA DE LINFÓCITOS DE CAMUNDONGOS E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA

Os camundongos foram sacrificados, após 28 dias de infecção, com éter etílico, sendo o baço retirado assepticamente e macerado. A suspensão celular foi tratada com tampão de Cloreto de amônio 0,14M pH 7,2, para hemácias, centrifugadas e lavadas com PBS estéril. As células obtidas foram ressuspendidas em meio RPMI (Sigma Co., USA) completo (L-glutamina, Hapes, gamicina e 10% de soro bovino fetal) na concentração de 1×10^6 células/ml, adicionando-se: F17(100 µg/ml), ou F17-IV (50 µg/ml), ou gp43 (50 µg/ml), ou exoantígeno (50 µg/ml) com 100 µl de suspensão celular, incubando-se por 120 horas. Dezoito horas antes das células serem colhidas, foi adicionado 3,5µl de timidina tritiada. O índice de estimulação das respostas linfoproliferativa foi calculado através da liberação da radioatividade incorporada em líquido de cintilação, contadas em aparelho cintilador Beckmann LS 6.800. O índice de proliferação foi calculado pela média de leitura das triplicatas da resposta linfoproliferativa a antígeno, em contagem por minuto (cpm), dividida pela média de leitura das triplicatas da resposta linfoproliferativa na ausência de antígeno.

3.12 ELISA CAPTURA PARA DETECÇÃO DE GP43 SOLÚVEL EM SORO DE CAMUNDONGOS BALBC

Immunoplasacas (TPP, Switzerland), foram sensibilizadas com 12,5 µg/ml de IgG coelho anti-gp43 em tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,0, por 1 h a 37°C e 18 horas 4°C. As placas foram lavadas com tampão de lavagem e bloqueadas com solução de bloqueio, por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas, sendo então adicionado solução de soros de camundongos diluído 1:10 e incubadas por 1 hora e 30 minutos a 37°C. Após lavagens, foi adicionada IgG monoclonal anti-gp43 a 30 µg/ml por 1 hora e 30 minutos a 37°C. Após nova lavagens, foi adicionado conjugado anti-IgG de camundongo peroxidase (Sigma A 8924), diluído 1:12000 em tampão de diluição. Após 1 hora e 30 minutos a 37°C a placa foi lavada e a reação evidenciada com solução OPD (O-phenylenediamine Dihydrochloride - Sigma) em tampão substrato e peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida após 30 minutos, com ácido sulfúrico 4N. A absorbância foi determinada em Multiscan a 492 nm. Foram consideradas positivas as frações em que a leitura em absorbância apresentaram valores 2 vezes acima do valor.

3.13 CULTURA DE LINFÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DE CITOCINAS

A cultura foi realizada como descrito no item 11, porém com tempo de incubação de 72 horas. Amostras de sobrenadantes foram colhidas e armazenadas a -20°C para posterior análise.

Anticorpos anti-IL-10, anti-IL-4 e anti-INF- γ na concentração de 3 µg/ml (50 µl) foram diluídos em tampão bicarbonato 0,06M pH 9,6, adicionados em immunoplasacas (TPP, Switzerland) e incubadas por 18 horas a 4°C em câmara úmida. As placas foram lavadas com tampão de lavagem, seguida de bloqueio com 100 µl de tampão PBS contendo soro bovino fetal 10% com pH 7.0; 0,05% de tween 20 e leite molico 5%. Após incubação por 1 hora a temperatura ambiente, foram lavadas e adicionados 50 µl/orifício de padrões de IL-10, IL-4 e

INF- γ , iniciando-se com uma diluição seriada de 2ng/ml em PBS/SFB 10% de pH7,0. Foram adicionados 50 μ l de sobrenadante de cultura, incubadas por 2h a temperatura ambiente. Após lavagens, foi adicionando 50 μ l/orifício de anti-IL-10, anti-IL-4 e anti- INF- γ biotinilado, incubando-se por 1h a temperatura ambiente. Após nova lavagens adicionou-se 50 μ l do conjugado avidina-peroxidase, incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente e no escuro. A reação foi revelada com solução de OPD em tampão substrato e peróxido de hidrogênio, leitura realizada a 450 nm no aparelho Molecular Devices Emax (*precision microplates reader*).

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado análise de variância (ANOVA) teste Tukey-Kramer. Os valores descritos pela média \pm desvio padrão, e os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

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

O perfil espectrofotométrico das frações de CFA Pb18 em Coluna de Sephadex G-200, a 280 nm na figura 1. O primeiro pico (tubo 17) foi considerada fração de hMM, denominada de F17 (~380 KDa), de acordo com Marquez et al., 2005.

4.2 RE-FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO F17 EM COLUNA DE HPLC

O re-fracionamento de 100 µl de F17(116,8 µg/ml) em Coluna de HPLC, resultou no perfil espectrofotométrico a 280 nm demonstrado na figura 2. A análise das frações eluídas por “dot blotting”, resultou em frações reativas com pool de soros de pacientes com PCM. Estas frações foram misturadas formando os Pools I a V: F17-I (fração 6 a 9), F17-II (fração 10 a 15), F17-III (fração 16 a 19), F17-IV (fração 20 a 26) e F17-V (fração 27 a 45). Como padrões de MM, foram utilizadas ovoalbumina (3,34 µg/ml) (45 kDa) e IgG humano (40,89 µg/ml) (150 kDa). Os pools das sub-frações foram testados utilizando pool de soros de pacientes com PCM, verificando a fração com maior positividade na fração F17-IV.

4.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

O resultado de SDS-PAGE utilizando gel gradiente de 5-15%, demonstrou na fração F17 a presença de um componente de ~ 380 kDa e em sub-fração F17-IV componentes de ~70 kDa e ~27 kDa (Figura 3).

4.4 WESTERN BLOTTING DAS FRAÇÕES E SUB-FRAÇÕES DE HMM

Os resultados de *western blotting* demonstraram bandas reativas com anticorpos de pacientes com PCM. Na fração F17 foi observada banda de ~380 KDa e na sub-fração F17-IV banda de ~380 KDa e de ~70 KDa. (Figura 4).

4.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE HPLC DE PRODUTO F17 DIGERIDA COM PAPAÍNA

O perfil espectrofotométrico a 280 nm do produto de digestão da F17 com enzima papaína em coluna de HPLC é apresentada na figura 5. As frações reativas com soros de pacientes com PCM por dot blotting foram denominadas de F17_I (tubos 2 a 11) e F17_{II} (tubos 23 a 25).

4.6 ANÁLISE DE PRODUTO DE DIGESTÃO DA F17 COM ENZIMA PAPAÍNA POR WESTERN BLOTTING

Para selecionar tempo de digestão da F17 pela enzima papaína a 37°C, a fração foi incubada nos tempos de 1h, 2h, 4h, 8h e 24h. Não se observou nenhuma diferença nas bandas, entre os tempos de incubação, conforme figura 7. O resultado de “western blotting”, da F17 (918,8 µg/ml), e F17 tratada com enzima papaína, a 37°C durante 4 horas (2), demonstrou banda de ~380 kDa e ~70 kDa, enquanto que o controle CFA demonstrou várias bandas (Figura 6).

4.7 RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA A F17 E F17-IV EM CAMUNDONGOS BALBC

A resposta linfoproliferativa na cultura de linfócitos de camundongos Balbc, foi significativamente maior com as frações F17 (100 µg/ml),

F17-IV (50 µg/ml), gp43 (50 µg/ml) e exoAg (50 µg/ml), ($p < 0,05$) em relação ao controle (Figura 8). Os resultados expressos em índice de proliferação foram: F17i= 10,44; F17-IVi= 5,23; gp43i= 3,81; ExoAg= 8,45; e RPMI= 1. O índice de proliferação celular foi maior com as células de camundongos infectados com Pb18 em relação ao controle ($p < 0,05$). Por outro lado não houve resposta linfoproliferativa com gp43 ($p > 0,05$).

4.8 DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G ESPECÍFICAS E DE GP43 SOLÚVEL EM SORO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM PB18

Na figura 9, observamos que o grupo de camundongos infectados apresentaram maior quantidade de IgGs específicos em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Sendo para as correlações dos grupos F17i; F17-IVi; gp43i e ExoAgi. E a presença de grande quantidade de gp43 solúvel circulante, está demonstrada na figura 10. A correlação entre o grupo infectado e grupo normal foi de $p < 0,0001$.

4.9 DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE CITOCINAS IL-10, IL-4 E INF- γ EM SOBRENADANTE DE CULTURA E LINFÓCITOS

O resultado da análise dos níveis de IL-10, no sobrenadante de cultura de células de baço de animais infectados com Pb18 em resposta a F17, F17-IV e gp43 demonstrou diferenças significativas em relação aos animais controles, ou controle sem estímulo ($p < 0,05$), Figura 11. Em IL-4, com os mesmos antígenos utilizados para o experimento, descrito acima, produziram menor quantidade de IL-4 (figura 12), não havendo diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$). Foi observado apenas nível elevado de INF- γ , no sobrenadante de cultura de linfócitos estimulados com F17 e F17-IV, em relação aos outros estímulos e ao controle ($p < 0,05$), Figura 13.

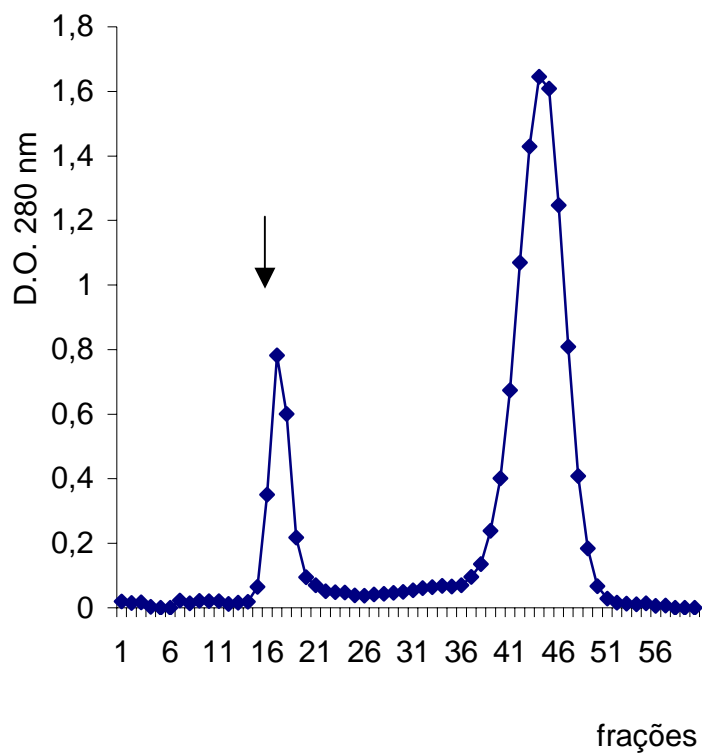


Figura 1 – Perfil espectrofotométrico a 280 nm de CFA de Pb18 por cromatografia em coluna Sephadex G-200. (↓) (fração 17) corresponde ao antígeno de hMM, determinado F17.

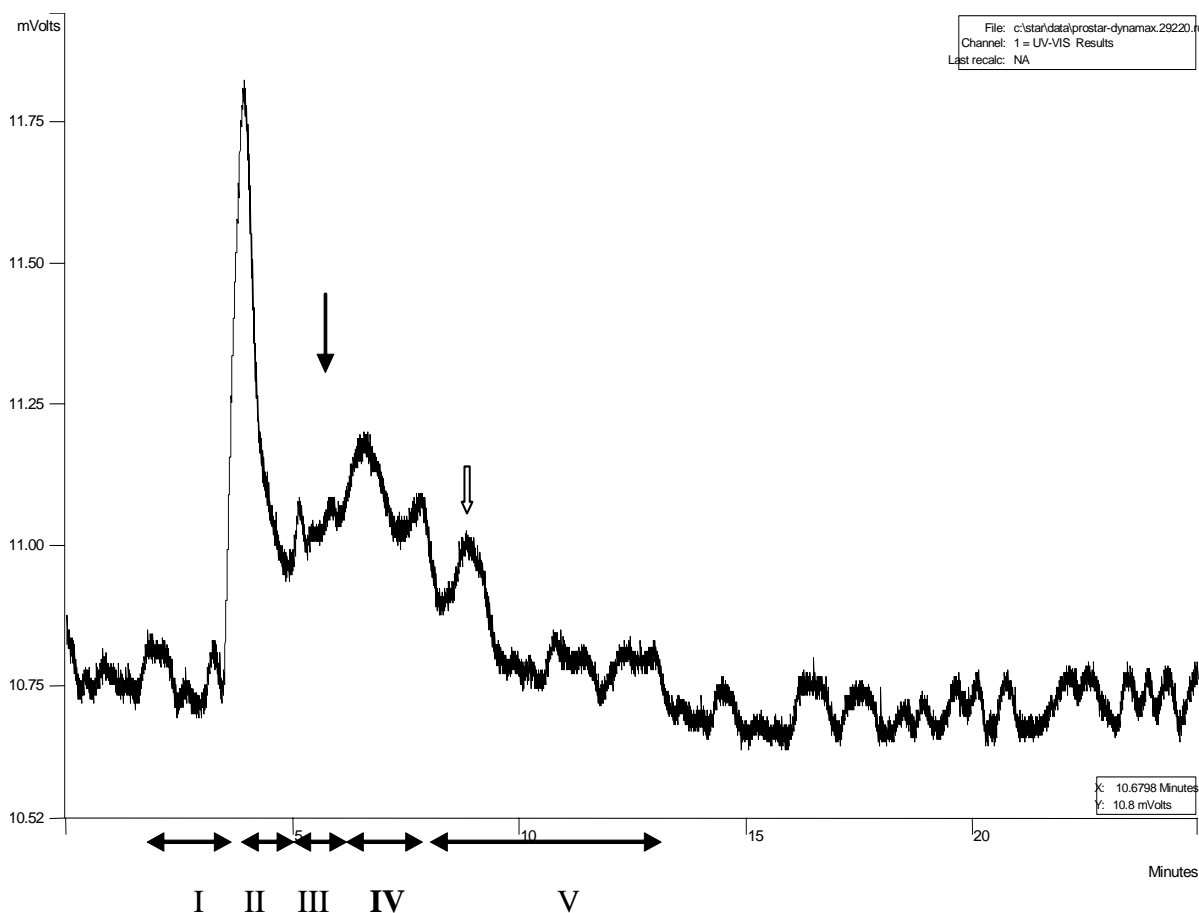


Figura 2 – Perfil espectrofotométrico a 280 nm da fração de hMM (F17) refractionada em Coluna C18 de HPLC. Padrões: ovoalbumina 45 kDa (↓) e IgG humana de 150 kDa (⇓). A sub-fração hMM (F17-IV), foi positiva em ELISA, utilizando pool de soros de pacientes com PCM

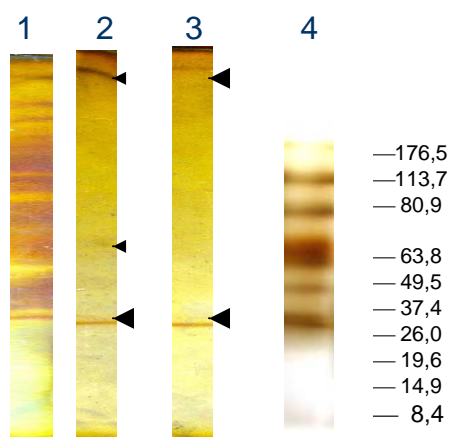


Figura 3 – Perfil de eletroforese de gel gradiente de poliácridamida de 5-15%, coloração por Nitrato de prata das seguintes amostras: 1) CFA Pb18, 2) F17, 3) F17-IV e 4) Padrão de massa molecular de 10-200 KDa (Invitrogen 1078-010). (a) ~ 380 kDa, (b) ~70 kDa e (c)~27 kDa

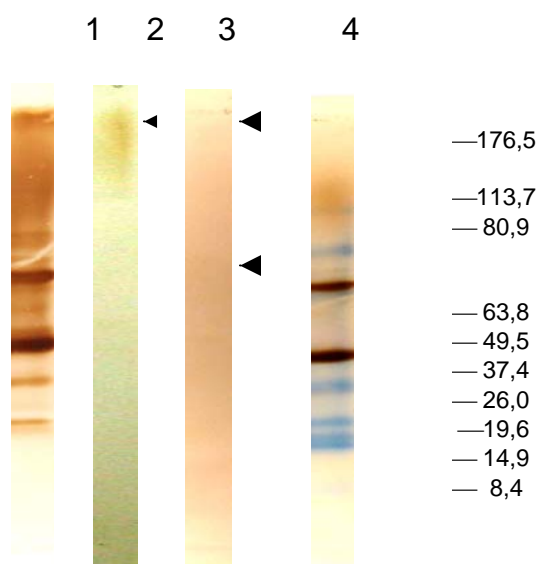


Figura 4 – Resultado de “western blotting” das amostras: 1) CFA Pb18, 2) F17, 3) F17-IV e 4) Padrões de MM de 10-200), reativos com “pool” de soros de pacientes com PCM. (a) ~ 380 kDa e (b) ~70 kDa

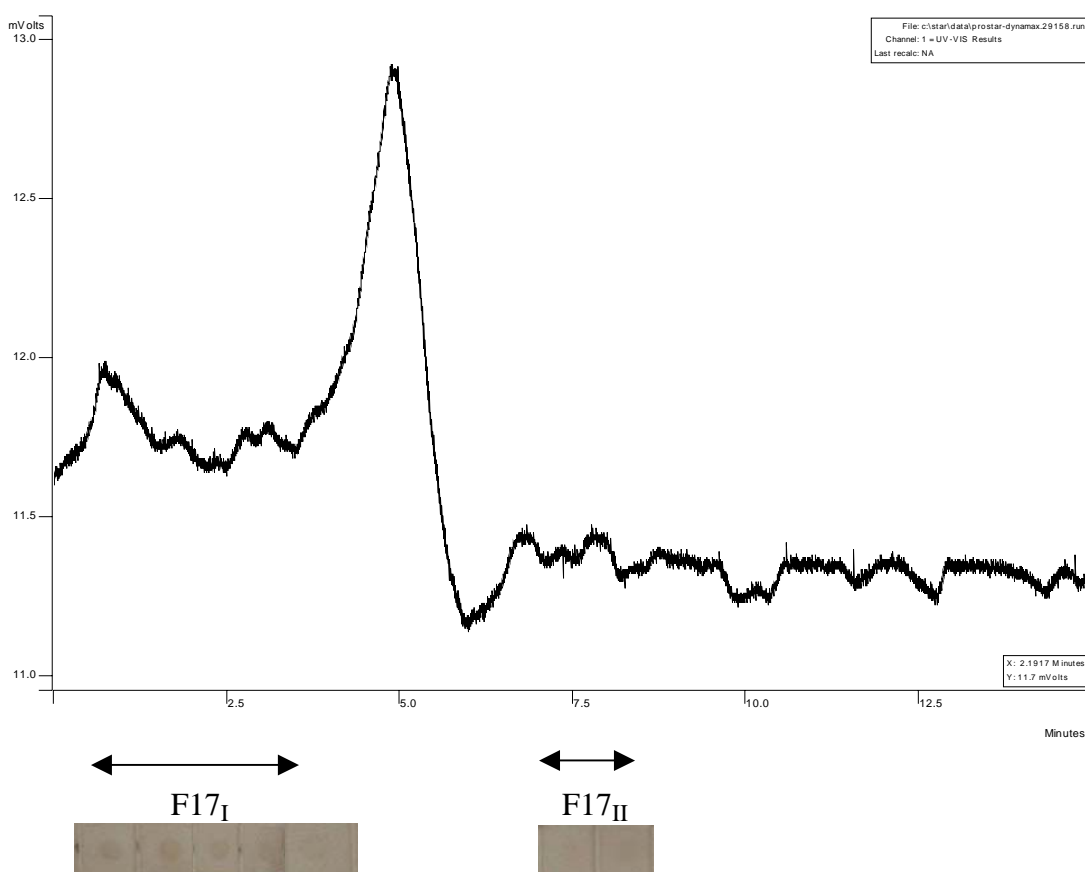


Figura 5 – Perfil espectrofométrico a 280 nm do produto de digestão da F17 com Papaína em HPLC. Positividade em “dot blotting” com pool de soros de pacientes com PCM, foram denominadas F17_I e F17_{II}.

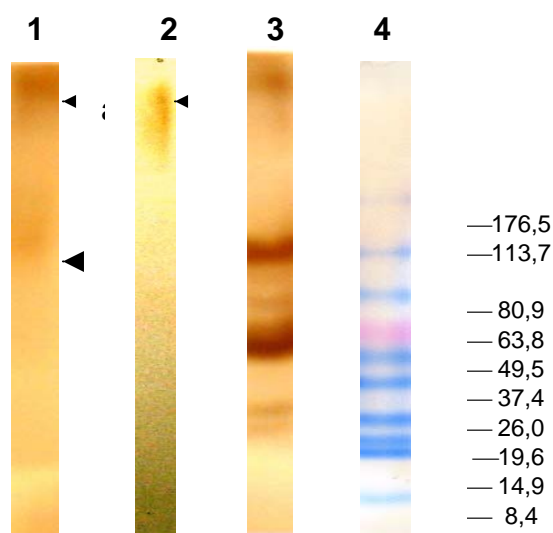


Figura 6 – Resultado de *Western blotting* de F17 e F17 tratada com enzima papaína F17 + papaína; 2) F17; 3) CFA Pb18 e 4) Padrão de MM (a) ~380 kDa e (b) ~70 kDa

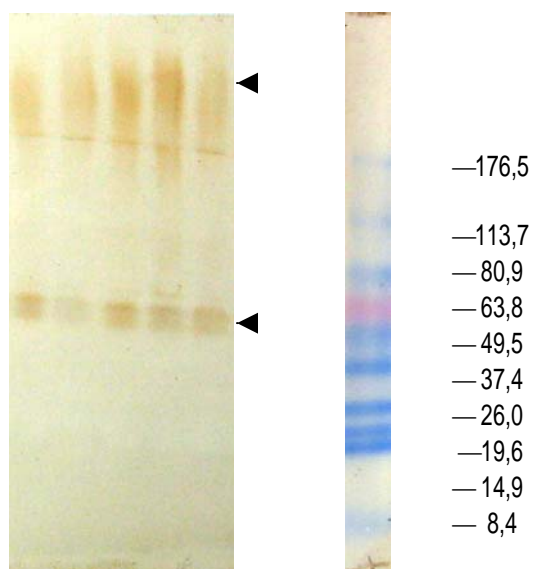


Figura 7 – *Western blotting* da F17 tratada com enzima Papaína a 37°C nos tempos de 1h, 2h, 4h, 8h e 24h. Apresentaram mesmas bandas nos diferentes tempo de incubação. (a) ~380 kDa e (b) ~70 kDa

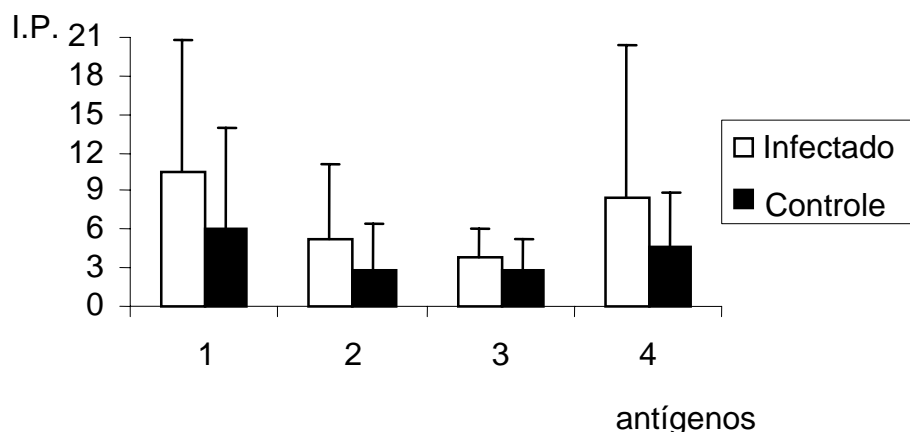


Figura 8 – Índice de proliferação celular de linfócitos de baço de camundongos infectados com Pb18 (n=10) e camundongos normais (n=6), em resposta ao estímulo com os antígenos: 1) F17 (100 µg/ml); 2) F17-IV (50µg/ml); 3) gp43 (50µg/ml) e 4) Exoantígeno (50µg/ml).
 F17 x RPMI $p < 0,05$
 F17-IV x RPMI $p < 0,05$
 ExoAg x RPMI $p < 0,05$

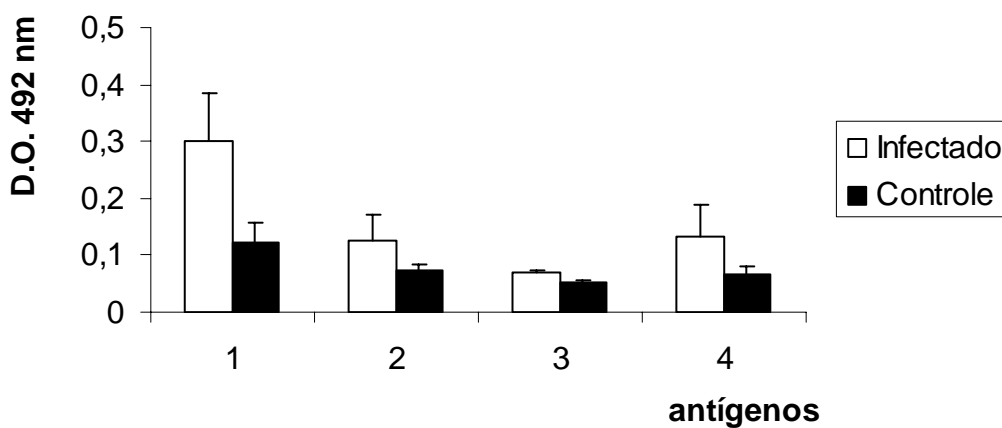


Figura 9 – ELISA para avaliar IgG em soro de camundongos Balbc infectados com Pb18 e grupo normal, com os seguintes antígenos: 1) F17, 2) F17-IV, 3) gp43 e 4) ExoAg.
 Immune x Control $p < 0,05$
 1 x 2,3, 4 $p < 0,0001$

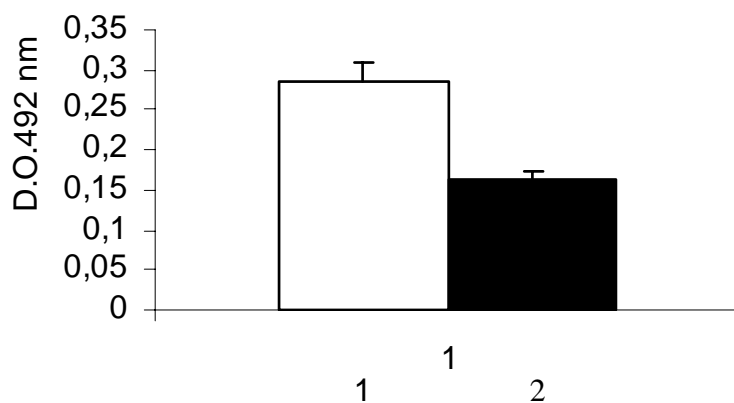


Figura 10 – Nível de gp43 solúvel em soro de camundongos Balbc infectados (n=10) e normais (n=6), por ELISA captura. 1= Infectado e 2= Controle 1x 2 p<0,001.

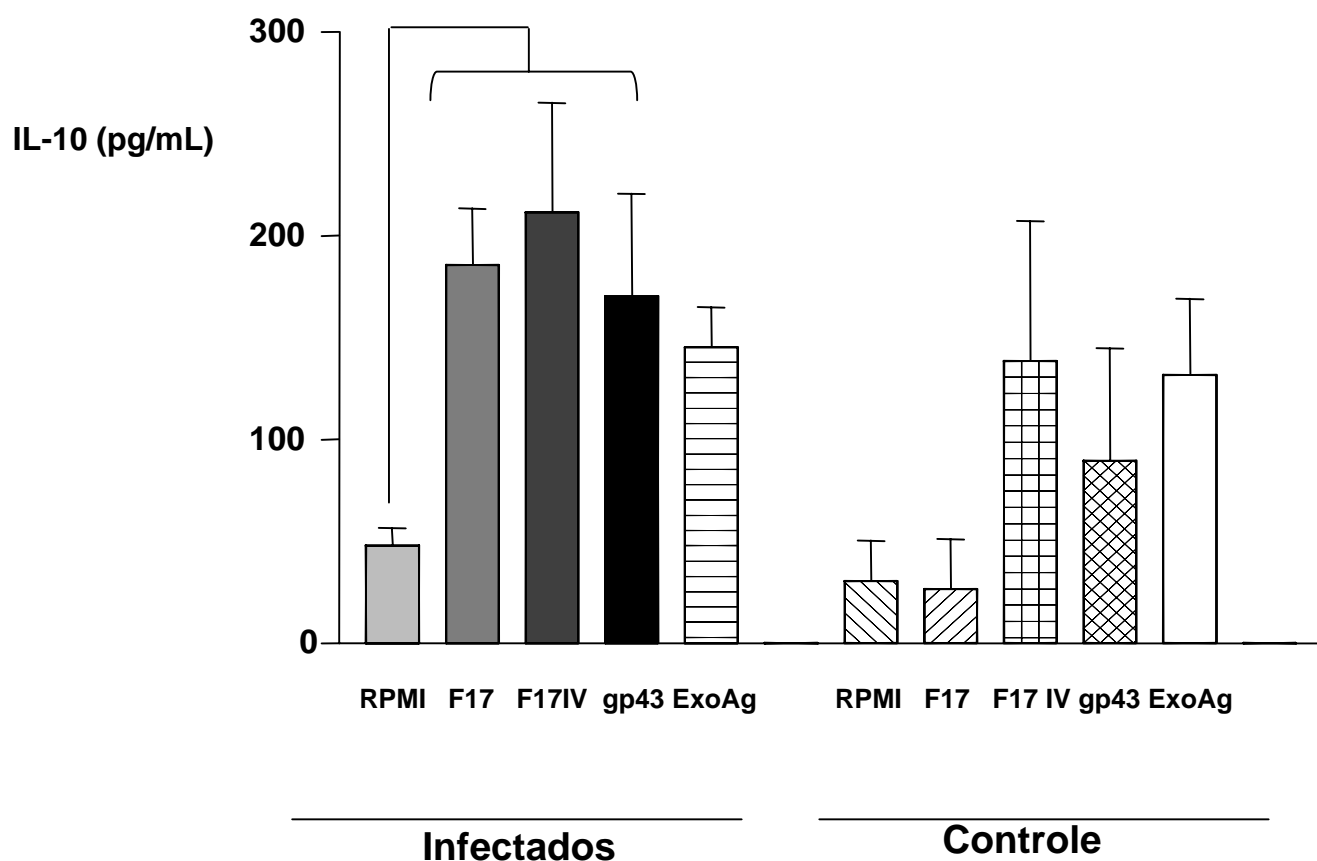


Figura 11 – Resultado da análise de nível IL-10 em sobrenadante de cultura celular de camundongos Balbc, grupo infectado com Pb18 (n= 10) e grupo controle (n=6) por ELISA com: 1) RPMI; 2) F17; 3) F17-IV; 4) gp43 e 5) Exoantígeno.
RPMI x F17, F17-IV p<0,05

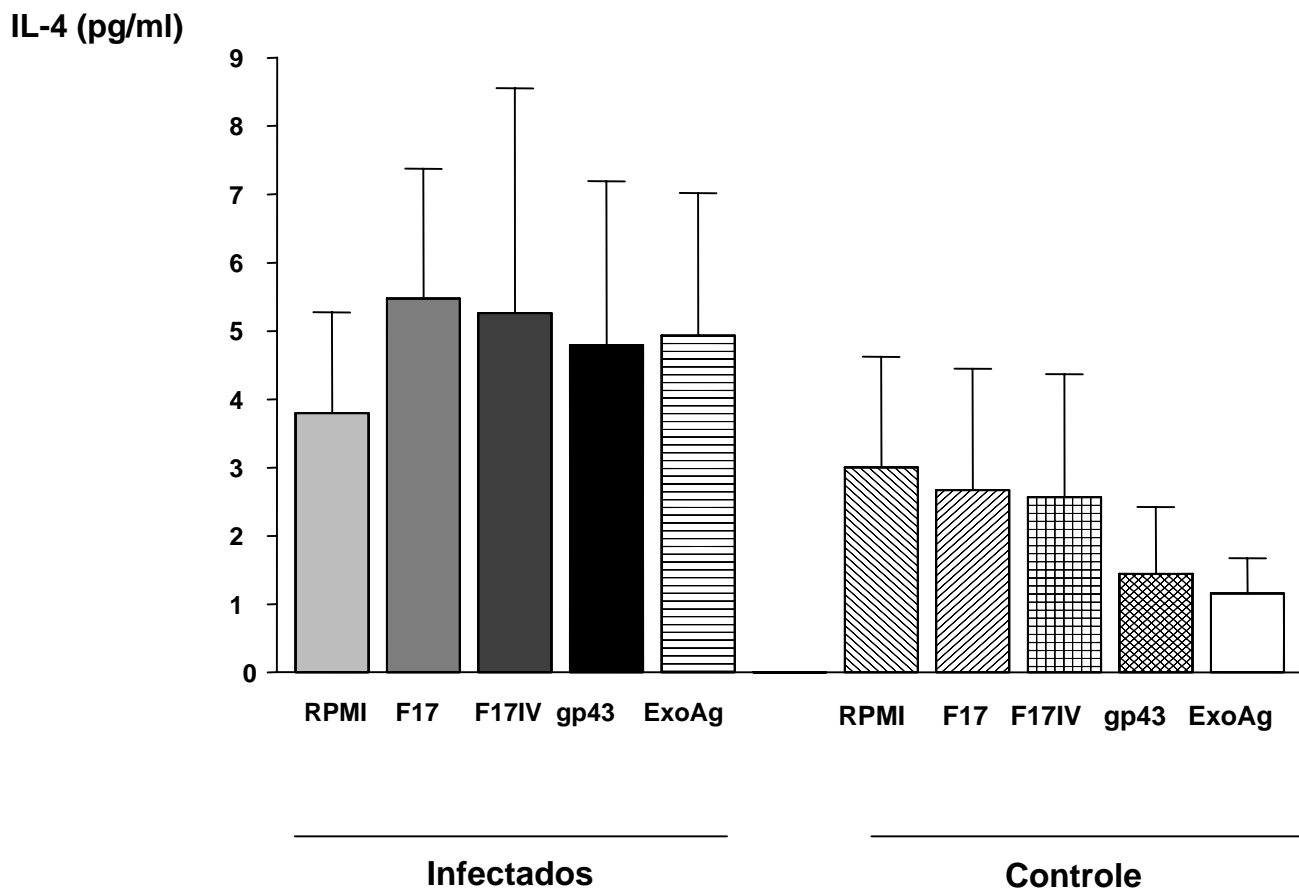


Figura 12 – Resultado da análise de nível de IL-4 (pg/ml) em sobrenadante de cultura celular de baço de camundongos Balbc, grupo infectados com Pb18 (n=10) e grupo controle (n=6) por ELISA. Meio RPMI (controle) e F17, F17-IV, gp43 e exoantígeno. RPMI x F17, F17-IV, gp43, ExoAg $p > 0,05$.

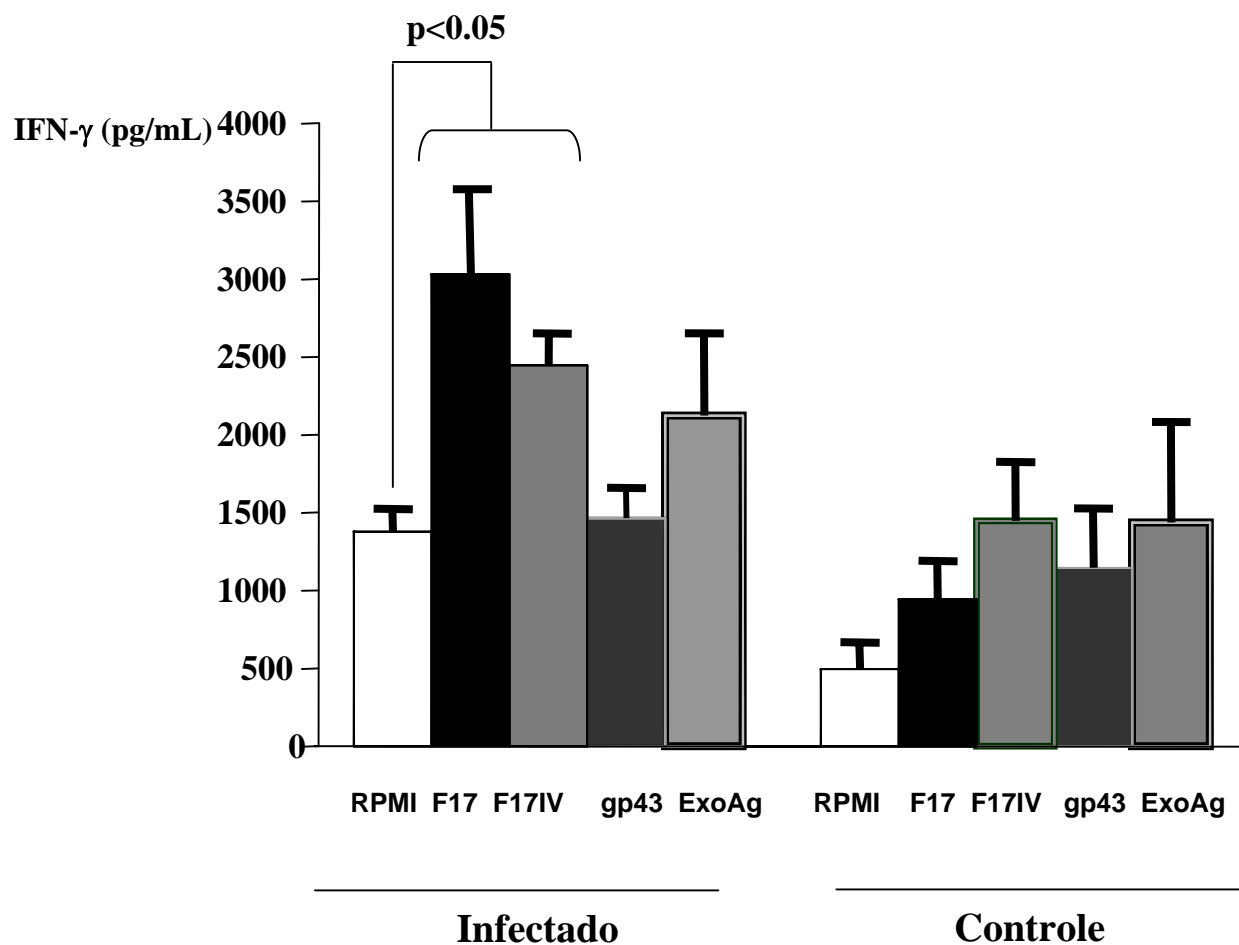


Figura 13 – Resultado da análise de nível IFN- γ (pg/ml) em sobrenadante de cultura celular de baço de camundongos Balb/c, grupo infectados com Pb18 (n=10) e grupo controle (n=6) por ELISA. Meio RPMI (controle) e F17, F17-IV, gp43 e ExoAg.
RPMI x F17, F17-IV $p < 0,05$

5 DISCUSSÃO

Diversas glicoproteínas são excretadas/liberadas pela levedura de *P. brasiliensis*, como as gp27, gp43, gp55, gp70, gp87 e glicoconjugado polidisperso de alta massa molecular e glicolipídeos, observados em CFA, exoantígeno e lisado (SA) (Puccia et al., 1986; Blotta & Camargo, 1993; Toledo et al., 1995; Ortiz et al., 1998; Salina et al., 1998).

Dentre estes componentes a gp43 é a mais estudada por ser liberada pelo fungo em maior quantidade, por ser reconhecida por 100% de soros de pacientes com PCM e por ser considerado Ag específico (Silva et al., 2004). No presente trabalho foi analisado nível de gp43 solúvel circulante como controle de que os camundongos efetivamente foram infectados. A gp43 e a gp70 atuam como fatores de virulência (Benard et al., 2001) e possivelmente induzem a resposta celular mediada por Th2 (Márquez, 2003; Biselli et al., 2001).

Considerando que a resposta protetora na PCM é mediada pela resposta do tipo Th1, seria importante o estudo de algum componente de *P. brasiliensis* que induzisse este tipo de resposta. Neste sentido Marquez et al. (2005) estudando níveis de IgG e IgE em soros de pacientes com PCM na forma crônica e na forma aguda evidenciaram a não indução da resposta Th2 pela fração hMM e posteriormente Pavanelli, 2004 estudou atividade protetora da fração hMM na PCM experimental.

No presente trabalho foi observada intensa resposta linfoproliferativa a fração de hMM sugerindo que a mesma induz resposta imune celular. A resposta imune celular é considerada contra infecções fúngicas (Polonelli et al., 2000). Por outro lado, não observamos a resposta linfoproliferativa com a gp43, concordante com os dados da literatura (Benard et al., 1997).

Além disso a análise de sobrenadante de cultura demonstrou nível elevado de INF- γ , sugerindo resposta do tipo Th1, portanto concordante com a observação de Marquez et al. (2005) e também com a proteção observada na PCM experimental (Pavanelli 2004).

Considerando a possibilidade da existência de enzimas proteolíticas autólogas no preparado de CFA, foi utilizado inibidor de protease

PMSF. No entanto mesmo com a presença deste inibidor foi observada geração de sub-componente de MM aproximada de 70 kDa a partir da fração de hMM de ~380 kDa evidenciada por SDS-PAGE.

Adicionalmente a análise de eluato correspondente a fração de hMM, obtida por HPLC demonstrou positividade entre a fração de 45 kDa (ovoalbumina) a 150 kDa (IgG) reativa com pool de soros de pacientes com PCM, possivelmente correspondente a fração de 70 kDa observada por SDS-PAGE.

Como ocorre liberação de componente de hMM no preparado CFA, não podemos descartar a possibilidade de ocorrer a liberação deste componente no hospedeiro durante uma infecção e também ocorrer a geração de produto de menor MM (70 kDa) no hospedeiro.

A análise desse produto de ~70 kDa demonstrou que a mesma apresenta a capacidade de induzir a resposta linfoproliferativa de linfócitos de camundongos Balbc infectados com *P. brasiliensis*. E ainda, da mesma forma que a fração de hMM o produto de ~70 kDa também foi capaz de induzir síntese de INF- γ em nível elevado quando os linfócitos de camundongos infectados foram estimulados com o referido produto. Por outro lado quando os linfócitos foram estimulados com gp43 foi observado baixo nível de INF- γ . O mesmo resultado tem sido demonstrado com os linfócitos de pacientes tanto da forma aguda como da crônica de PCM em resposta a gp43 (Benard et al., 1997).

No presente trabalho também foi observada nível elevado de IL-10 em sobrenadante de cultura de linfócitos de camundongos infectados e estimulados tanto com a fração de hMM, como fração de menor MM (F17-IV), possivelmente de ~70 kDa, bem como com a gp43.

A IL-10 apresenta atividade anti-inflamatória e imunossupressora. Benard et al.(2001) demonstraram nível elevado de IL-10 em pacientes com PCM em resposta a gp43, concomitante com o nível baixo de INF- γ . Possivelmente nível elevado de IL-10 e baixo nível de INF- γ deve modular a resposta do tipo Th2. No entanto, como a resposta a fração de hMM e F17-IV ocorre concomitantemente aumento de INF- γ e a IL-10, assim a IL-10 deve regular a resposta imune evitando a hiper-reatividade da resposta Th1.

Embora por SDS-PAGE possa ser evidenciada duas bandas de MM aproximadamente de 70 kDa a partir da fração hMM obtida em coluna de

Sephadex G-200, no resultado de análise de produtos de degradação por western blotting foi observada uma banda de ~70 kDa além da banda ~380 kDa.

Não podemos descartar a hipótese de associação de gp70 com o componente de alta MM e que possa dissociar durante os processos cromatográficos. No entanto acreditamos que se trata de um componente distinto por induzir a resposta imune celular evidenciada pela resposta linfoproliferativa e pela sua capacidade de induzir aumento de INF- γ , indicativo de indução da resposta Th1.

No presente trabalho foi observado uma produção aumentada de IgG após estimulação com a fração de hMM, a sub-fração de ~70 kDa e a exoAg. A imunidade humoral não tem sido considerada protetora uma vez que intensa resposta imune humoral é correlacionada com a severidade da doença (Singer-Vermes et al., 1993; Mello et al., 2002). No entanto tem sido relatado também a importância de alguns anticorpos na proteção, tais como anticorpos a polissacarides de *Cryptococcus neoformans* ou a componentes de parede celular de *Candida albicans* (Polonelli et al., 2000). Considerando que os anti-fúngicos são nefrotóxicos (Graybill et al., 2000; Gubbins, 2005) e ainda considerando que o tratamento de PCM requer um período longo (Mendes et al., 1994) o estudo de componentes de *P. brasiliensis* é muito importante como terapia alternativa.

6 CONCLUSÕES

- 1) A fração de hMM de aproximadamente 380 kDa pode gerar componentes de MM inferior por degradação ou por ação da enzima papaína.
- 2) Os sub-componentes de hMM apresentam MM de ~70 kDa e ~27 kDa.
- 3) A sub-fração de ~70 kDa e não a de ~27 kDa apresenta antigenicidade.
- 4) A resposta linfoproliferativa a fração de ~380 kDa e sub-fração de ~70 kDa, indica indução da resposta imune celular em PCM experimental em camundongos Balbc.
- 5) Ocorre aumento no nível de INF- γ , IL-10 e não de IL-4 em sobrenadante de cultura de linfócitos de camundongos Balbc infectados, em resposta a fração de ~380 kDa e sub-fração ~70 kDa, sugerindo indução da resposta imune do tipo Th1.
- 6) As IgGs anti-fração de ~380 kDa e anti-fração ~70 kDa são encontradas em níveis elevados em PCM experimental, todavia se esta resposta é protetora ou não, requer estudos adicionais.
- 7) O sub-componente de ~70 kDa provavelmente é um componente distinto da gp70 descrita na literatura, por induzir aumento de INF- γ ,

REFERÊNCIAS

BAIDA, H.; BISELLI, P.J.C.; JUVENALE, P.J.; DEL NEGRO, G.M.B.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.S.; BENARD, G. Differential antibody isotype expressem to major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes Infec.**, Paris, v.1, p. 273-278, 1999.

BENARD, G.; ROMANO, C.C.; CACERE, C.R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.; DUARTE, A.J. Imbalance of IL-2, INF- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, n. 4, p. 248-252, 2001.

_____ ; MENDES-GIANNINI, M.T.; JUVENALE, M.; MIRANDA, E.T.; DUARTE, A.J. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporeponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **The J. of Infect. Dis.**, 175 (5): 1263-1267, 1997.

BISELLI, P.J.C.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.S.; BENARD, G. IgE antibody response to the main antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in patients with paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, 39: 475-478, 2001.

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

BUENO, J.P.; MENDES-GIANNINI, M.J.; DEL NEGRO, G.M.; ASSIS, C.M.; TAKIGUTI, C.K.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. IgG, IgM and IgA response for the diagnosis and follow-up paracoccidioidomycosis: comparison of counterimuno electrophoresis and complement fixation. **J. Med. Vet. Mycol.**, n. 35, p. 213-217, 1997.

BURGER, E.; VAZ, C.C.A.; SANO, A. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. **Am. J. Trop. Med.**, v.55, n.4, p. 391-398, 1996.

CAMARGO, Z.P.; GUESDON, J.L.; DROUHET, E. AND IMPROVISI, L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the PCM. Comparison with counterimmuno electrophoresis and erythro-immunoassay. *Mycopathologia*, 88: 31-37, 1984.

_____; TADORDA, C.P.; RODRIGUES, E.G.; TRAVASSOS, L.R. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **J. Med. Vet. Mycol.**, Abingdon, v. 29, p. 31-38, 1991.

_____; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S.P. and TRAVASSOS, L.R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigen for immunodiffusion tests. **J. Clin. Microbiol.**, 26: 2147-2151, 1988.

CANO, L.E.; RESTREPO, A. Predictive values of serologia tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 20, 0. 276, 1987.

ENGLISH, D.; ANDERSEN, B.R. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. **J. Immunol. Methods**, v.5, p. 249-252, 1974.

FAVA NETO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arq. Cirurg. Clin. Exp.**, 18: 197-254, 1955.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUEZ, S.A.; DILTON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of this clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, v. 20, p. 129, 1987.

GRAYBILL, J.R.; TOLLEMAR, J.; TORRES-RODRIGUES, J.M.; WALSH, T.J.; ROILIDES, E.; FARMAKI, E. Antifungal compounds: controversies, queries and conclusions. **Med. Mycol.** 38, supplement I, 323-333, 2000.

GUBBINS, P.O.; AMSDEN, J.R. Drug-drug interactions of antifungal agents and implications for patient care. **Exp. Op. Pharm.** 6(13): 2231-2243, 2005.

HAMILTON, A.J. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and peniciliosis marneffeii; current status and future trends. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 351-364, 1998.

LACAZ, C.S.; FERRI, R.G.; FAVA NETO, C. AND BELFORT, A.E. Aspectos imunoquímicos na blastomicose sul-americana e blastomicose queloidiana. **Med. Cirurg. Farm.**, 298: 63-74, 1962.

LONDERO, A.T. e DEL NEGRO, G. Paracoccidioidomycose **J. Pneumol.**, 12: 41-60, 1986.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Colorimetric assays: Lowry's method for protein determination. **J. Biol. Chem.**, 193, p. 265-275, 1951.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hipoblastomicoses americanas. **Brazil-méd.**, 13: 121-124; 141-144, 1908.

MARQUEZ, A.S.; VICENTINI, A.P.; ONO, M.A.; WATANABE, M.A.E.; CAMARGO, Z.P.; ITANO, E.N. Reactivity of antibodies from patients with acute and chronic paracoccidioidomycosis to a high molecular mass antigen from *P. brasiliensis*. **J. Clin. Lab. Analysis**, 19: 199-204, 2005.

MARQUEZ, A.S. "Reatividade de anticorpos a componentes de alta massa molecular de *Paracoccidioides brasiliensis*: em soros de pacientes com paracoccidioidomicose aguda e crônica". Dissertação de Tese de Mestrado em Microbiologia, 2003.

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

MENDES, R.P.; NEGRONI, R. & ARECHAVALA, A. Treatment and Control of Cure. In: Franco M., Lacaz C.S., Restrepo-Moreno A., Del-Negro G. Paracoccidioidomycosis. **Ist. Ed. Boca Raton**. Fc: CRC Press, 373-392, 1994.

MONTENEGRO, M.R. & FRANCO, M. Pathology. In: Franco M., Lacaz C.S., Restrepo-Moreno A., Del-Negro G. **Paracoccidioidomycosis**. Ist ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994, p. 67-86.

ORTIZ, B.L.; DIEZ, S.; URAN, M.E.; RIVAS, J.M.; ROMERO, M.; CAICEDO, V.; RESTREPO, A.; Mc EWEN, J.G. 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.

PADILHA-GONÇALVES, A. Paracoccidioidomicose. **An. Bras. Dermatol.**, 60: (supl. 1) 180-271, 1985.

PAVANELLI, W.R. "Proteção induzida pela fração de alta massa molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos BALB/c". Dissertação de Tese de Mestrado em Patologia Experimental, 2004.

POLONELLI, L. CASADEVALL, A.; HAN, Y.; BERNARDIS, F.; KIRKLAND, T.N.; MALTHUEWS, R.C.; ADRIANI, D.; BOCCANERA, J.; BURNIE, P.; CASSONE, A.; CONTI, S.; CUTLER, J.E.; FRAZZI, R.; GREGORY, C.; HODGETTS, S.; ILLIDGE, C.; MAGLIANI, W.; RIGG, G e SANTONI, G. The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections. **Med. Mycol.**, 38: 281-292, 2000.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect. Immunol.**, Bethesda Md., v. 53, p. 199-206, 1986.

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

RESTREPO, A.; MONCADA, L.H. Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for PCM. **Appl. Microbiol.**, v. 28, p. 138-144, 1974.

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

SAN-BLAS, G. The cell wall of fungal human pathogens: Its possible role in host-parasite relationship. **Mycophatol.**, 79, 159-184, 1982.

SILVA, S.H.M.; QUEIROZ-TELLES, F.; COLOMBO, A.L.; BLOTTA, M.H.S.L.; LOPES, J.D.; CAMARGO, Z.P. Monitoring gp43 Antigenemia in Paracoccidioidomycosis Patients during Therapy. **J. Clin. Microb.**, v. 42, n.6, p. 2419-2424, 2004.

SILVA, M.I.C.; CHAMMA, L.G.; FRANCO, M. Reação de Imunodifusão em gel de agar no diagnóstico sorológico da paracoccidioidomicose. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 31, n. 40-43, p. 40-43, 1989.

SINGER-VERMES, L.M.; CALDEIRA, C.B.; BURGER, E.; CALICH, L.G. Experimental murine paracoccidioidomycosis relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clin. Exp. Immunol.**, v.94, p. 75-79, 1993.

SOMENSI, C.C.; CAMARGO, Z.P.; OLIVEIRA, O.L.P.; INOUE, M.M.Z.; PONTELLO, R. & ITANO, E.N. Reavaliação e proposta de um protocolo de sorologia para paracoccidiodomicose. **Rev. Bras. de An. Clín.**, 28 (2): 49-52, 1996.

SOMENSI, C.C. A paracoccidiodomicose na Região Norte do Paraná: Avaliação Imunodiagnóstica. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 1996.

SPOSTO, M.R.; MENDES-GIANNINI, M.J.; MORAES, R.A.; BRANCO, F.C.; SCULLY, C. Paracoccidiodomycosis manifesting as oral lesions: clinical, cytological and serological investigation. **J. Oral Pathol. Med.**, 23: 85-87, 1994.

TABORDA, C.P.; AND CAMARGO, Z.P. Diagnosis of Paracoccidiodomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen-gp43. **J. Med. Vet. Mycol.**, 31, 155-160, 1993.

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