



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WANDER ROGERIO PAVANELLI

**PROTEÇÃO INDUZIDA PELA FRAÇÃO DE ALTA MASSA
MOLECULAR DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM
CAMUNDONGOS BALB/c**

Londrina
2005

WANDER ROGERIO PAVANELLI

**PROTEÇÃO INDUZIDA PELA FRAÇÃO DE ALTA MASSA
MOLECULAR DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM
CAMUNDONGOS BALB/c**

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

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano.

Londrina
2005

WANDER ROGERIO PAVANELLI

**PROTEÇÃO INDUZIDA PELA FRAÇÃO DE ALTA MASSA
MOLECULAR DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM
CAMUNDONGOS BALB/c**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eiko Nagakawa Itano
(Orientadora)
Universidade Estadual de Londrina-UEL

Prof. Dr. Jose Daniel Lopes
Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP

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

Londrina, ____ de _____ de 2005.

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo seu infinito amor.

Aos meus pais, pelo incentivo e compreensão durante todos os momentos.

A minha noiva, Pâmela pelo auxílio e principalmente pelo amor dedicado.

Muito Obrigado.

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora Prof^a Dr^a Eiko Nakagawa Itano, pela compreensão, apoio, amizade, dedicação e principalmente orientação durante a realização deste trabalho.

A Mári S. Kaminani e Nilson de Jesus Carlos pelo incentivo e auxílio técnico durante toda a fase experimental deste trabalho.

Aos amigos Solange de Paula Ramos, Juliana Rubira Gerez, Fernanda Akemi Nakanish, Leonardo Mitsuo Kato Ito, Kátia Key Oshiro, Fabrine Sales M. Tristão, Hugo Vinícios Crescêncio, Nádia Hizuru Kamiji, Berenice Tomoko Tatibana, Ebenezer, Luciene e todos, pela força, pela vibração e sem sombra de dúvida pela ajuda para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de turma Wanderley Onofre Shimidtz, Marla Karine, Luciana, Maria Fernanda, Andréia e Ana Karina, pelo incentivo e apoio nas horas difíceis.

A Prof. Dr^a Isabel Cristina Cherici Camargo, Docente da UNESP de Assis-SP, que permitiu a realização das fotografias, em seu laboratório.

Aos demais professores, pela cuidadosa avaliação do texto, pela grande disponibilidade em ajudar e principalmente pela orientação dedicada.

A minha família, pela confiança e motivação.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho e que diretamente ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho científico.

SUMÁRIO

1 RESUMO GERAL	6
2 ARTIGO	12
2.1 INTRODUÇÃO	14
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	16
2.2.1 Animais.....	16
2.2.2 Micoorganismo	16
2.2.3 Obtenção de antígenos de <i>P. brasiliensis</i>	16
2.2.4 Protocolo experimental.....	16
2.2.5 ELISA para detecção de gp 43 solúvel em plasma	17
2.2.6 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia-CFU	17
2.2.7 Reação de Hipersensibilidade Cutânea-DTH.....	18
2.2.8 Análise Histopatológica	18
2.2.9 ELISA para detecção de IgG anti-hMM, IgG Anti gp43 e anti-Exo Ag.....	19
2.2.10 Análise Estatística	19
2.3 RESULTADOS	20
2.3.1 Nível de antígeno solúvel gp43 antigenemia no plasma	20
2.3.2 Análise da proteção da fração de hMM usando a técnica de CFU.....	21
2.3.3 Reação de Hipersensibilidade Tardia-DTH	23
2.3.4 Análise Histopatológica e Morfométrica	24
2.3.5 Nível de IgG anti ExoAg, anti fração de hMM e anti gp43.....	27
2.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	33

1 RESUMO GERAL

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença infecciosa, granulomatosa, causada por um fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*), que cresce, no hospedeiro ou em cultivo a 37°C, sob a forma de levedura ou como micélio (filamentoso) a 25°C. É uma doença restrita à América Latina e com grandes áreas endêmicas no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina [1].

Propágulos fúngicos aéreos constituídos de hifas iniciam a infecção com focos nos pulmões, seguido de disseminação linfática ou hematogênica para os linfonodos, fígado, baço, pele e mucosa [3-4].

Nos pulmões ou nódulos linfáticos os granulomas podem permanecer dormentes por anos ou progredir para desencadear uma doença, dependendo da resposta imune do hospedeiro.

Em virtude do aumento na proporção de doenças fúngicas como a PCM, sobretudo acarretada pela reativação dos focos dormentes, convém à utilização de imunização terapêutica como tentativa para eliminar os organismos dormentes ou propriamente extinguir a infecção [4], especialmente em doenças cujo tratamento é longo, como o caso da PCM, podendo em alguns casos provocar lesões nefrotóxicas e hepatotóxicas.

O maior desafio em experimentos com vacinação contra fungos, de todos os tempos, tem sido identificar substâncias ou partículas inertes fúngicas como proteínas ou carboidratos, que possam ser utilizadas como veículo no processo imunoterápico.

Uma das metas e também uma das dificuldades para geração de uma vacina, é a identificação de uma partícula que possa promover uma resposta imune adequada e efetiva.

Em se tratando da paracoccidioidomicose, também se tem almejado criteriosamente uma proteção, que no decorrer de alguns estudos está correlacionada com a presença de uma exuberante resposta imune mediada por células.

Dados preliminares indicam que imunizações estimulando a liberação de INF- γ e injeções de gp43 possam reduzir a concentração do *P.*

brasiliensis nos pulmões de camundongos inoculados intratraquealmente e diminuir a gravidade da inflamação nos pulmões [3]

Embora diversos estudos tenham sido feito na intenção de obter uma substância que possa ativar principalmente a resposta imune celular protetora, pouco avanços tem sido observados.

No presente trabalho foi introduzido uma nova fração de *P. brasiliensis* de Alta Massa Molecular (high Mass Molecular)-hMM, com os seguintes objetivos específicos:

a) Determinar nível sérico de gp43 solúvel no decorrer da infecção experimental em camundongos imunizados e não imunizados com a fração de hMM.

b) Quantificar a presença de células de *P. brasiliensis* em tecido de camundongos, imunizados e não imunizados com a fração de hMM, utilizando a técnica de CFU-Unidades Formadoras de Colônias.

c) Analisar a Reação de Hipersensibilidade Tardia.-DTH, usando como estímulo a fração de hMM.

d) Analisar as características histopatológicas dos tecidos (Pulmão, Fígado) com relação às lesões granulomatosas no decurso da infecção experimental em camundongos BALB/c, previamente imunizados ou não com a fração de hMM.

e) Determinar os níveis séricos de IgG anti- hMM, IgG anti-gp43 e de IgG anti-ExoAg, no processo de imunização com a fração de hMM, em camundongos BALB/c.

Foi utilizado *P. brasiliensis* (Pb 18) na fase leveduriforme e o Ag CFA obtido de acordo com Camargo [2], modificado pela adição de inibidores de proteases (PMSF). Esta amostra foi fracionada em coluna de Sephadex G200, obtendo-se a fração de hMM, de acordo com (Dissertação de Mestrado-Marquez et al, 2003). Foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c divididos em 4 grupos: a) Controle, b) Infectado, c) Imunizado com 50µg da fração de hMM (F-50) e infectados, d) Imunizados com 100µg da fração de hMMc (F-100) e infectados. A análise dos níveis séricos de gp43 solúvel, de IgG anti-hMMc, IgG anti-gp43, IgG anti-ExoAg foi realizada por ELISA, Contagem de Unidades Formadoras de Colônias-CFU, com amostras de pulmão e fígado, Reação de Hipersensibilidade Tardia-DTH com a fração de hMM e Análise Histopatológica, foram realizadas após 28 e 56 dias da infecção.

Os resultados demonstraram níveis de antígenos solúveis menores ($p < 0,001$) no período de 28 dias, em relação ao grupo infectado, já para o período de 56 dias, somente os animais imunizados com F-100 da fração de hMM, é que apresentam diferenças significativas ($p < 0,001$). Quanto aos níveis de anticorpos IgG anti-ExoAg e anti-gp43, podemos observar que ambos os grupos F-50 e F-100 apresentaram níveis elevados de anticorpos ($p < 0,001$), em relação aos demais, isto para 28 dias, e 56 dias ($p < 0,001$, $p < 0,01$), respectivamente. Já no período de 56 dias, somente o grupo F-100, mostrou valores significantes ($p < 0,05$). Para ambos os órgãos analisados pelo CFU (pulmão e fígado), ambos os grupos F-50 e F-100 da fração hMM, apresentaram valores estatisticamente significantes ($P < 0,001$) (pulmão-28 dias) e $p < 0,05$ (pulmão-56 dias), sendo que para fígado o grupo F-50 apresentou ($p < 0,05$) e F-100 ($p < 0,01$), 28 e 56 dias, respectivamente. A resposta imune celular específica mensurada *in vivo* pelo DTH, foi desenvolvida eficientemente pelos animais que foram previamente imunizados, em ambos os períodos de 28 e 56 dias e grupos F-50 e F-100. A análise das lesões granulomatosas evidenciou, em animais imunizados, um grau de compactação e organização maior, sem a disseminação do fungo para outros órgãos, quando comparado aos animais não imunizados.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an infectious, granulomatosa disease, caused for a thermally dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), that grows in the host or culture 37°C, under the form of leavedurifoms or mycelium (filamentous) 25°C. It is a restricted disease to Latin America and with great endemic areas in Brazil, Colombia, Venezuela and Argentina. Parts fungicus aerial constituted of hifas initiates the infection with focus in the lungs, followed of lymphatic or hematogenics dissemination for the lymph nods, liver, spleens, skin and mucosa. In the lungs or nodules granulomatosis can remain quiescent per years or to progress to unchain a disease, depending on the immune response of the host. In virtue of the increase in the ratio of disease as the PCM, over all caused for the reactivation of the quiescent focus, they use of therapeutically immunization as attempt to eliminate the quiescent organisms or properly to extinguish the infection, especially in disease whose treatment is long, as the case of the PCM, being able in some cases to provoke kidneys and liver lesions. The major challenge in experiments with vaccination against fungus, of all the times, has been to identify to substances or fungus's inert particles as proteins or carboidrats, which can be used as vehicle in the immunotherapy process. One goals and also one of difficulties for generation of a vaccine, is the identification of a particle that can promote adequate a immune response and accomplishes. In treating to paracoccidioidomycosis, also a protection has been longed for criteriously that during some studies are correlated with the presence of exuberant immune response mediated by cells. Preliminary data indicate that immunizations stimulating the release INF- α and injections of gp43 can reduce the concentration of the *P. brasiliensis* in the lungs of inoculated mice and to diminish the gravity of the inflammation in the lungs [3]. An even so diverse study has been made in the intention to get a substance that can activate the immune response mainly cellular protector, few advances have been observed. In the present work high Mass Molecular-hMM was introduced a new fraction of *P. brasiliensis* with the following specific objectives: a) to determine soluble level of gp43 in serum of mice experimental infected and immunized or not immunized with the fraction of hMM. b) Quantified the presence of *P. brasiliensis* cells in organs of mice immunized and not immunized with the fraction of hMM, using the technique of CFU, c) To analyses the reaction of hypersensitivity-DTH, using as stimulation the fraction of hMM. d) To

analyze the histopathology's characteristics of organs (Lung and Liver) with relation to the granulomatous injuries in the continuation of the experimental infection in BALB/c mice, previously immunized or not with the fraction of hMM, e) to determine in serum the levels of IgG anti-hMM, IgG anti-gp43 and of IgG anti-ExoAg, in the process of immunization with the fraction of hMM, in BALB/c mice. *P. brasiliensis* (Pb 18) the leveduriforme phase and gotten CFA in accordance with Camargo [2] was used modified for the inhibitor addition of proteases (PMSF). This sample was fractioned in column of Sephadex G200, having gotten itself it fraction of hMM, in accordance with (Marquez et al, 2003). Female mice BALB/c in 4 groups had been used divided: A) Control, b) Infected, c) Immunized with 50µg of the fraction of hMM (F-50) and infected, d) Immunized with 100µg of the fraction of hMMc (F-100) and infected. The analysis of the levels of gp43 soluble, of IgG anti-hMMc, IgG anti-gp43, IgG anti-ExoAg was carried through by ELISA, Counting of Units formatting of Colonies-CFU, with samples of lung and liver, reaction of hypersensitivity-DTH with the fraction of hMM and Histopathology Analysis had been carried after through 28 and 56 days of the infection. The results had demonstrated lesser soluble antigen levels ($p < 0,001$) in the period of 28 days, in relation to the infected group, already for the period of 56 days, the animals immunized with F-100 of the fraction of hMM, only are that they present significant differences ($p < 0,001$). How much to the levels of IgG antibodies anti-ExoAg and anti-gp43, we can observe that both the groups F-50 and F-100 had presented high levels of antibodies ($p < 0,001$) in relation to excessively, this for 28 days, and 56 days ($p < 0,001$, $p < 0,01$), respectively. In longer period of 56 days, only the F-100 group, showed significant values ($p < 0,05$). For both (lung and liver) the organs analyzed for the CFU, both the groups F-50 and F-100 of the fraction hMM, had presented significant P values ($p < 0,001$) (in lung 28 days) and $p < 0,05$ (lung-56 days), being that for liver the F-50 group presented ($p < 0,05$) and F-100 ($p < 0,01$), respectively. The immune response intensity *in vivo* determined by DTH, was developed efficiently for the animals that previously had been immunized, in both the periods of 28 and 56 days and groups F-50 and F-100. The analysis of the injuries evidenced, in immunized animals, a degree of compacting and bigger organization, without the dissemination of fungus for other organs, when compared with the animals not immunized.

REFERENCIAS

- 1 Brumer E, Castañeda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: na update. Clin Microbiol Revista 1993; 6:89-117.
2. Camargo ZP., Unterkircher C, Travassos LR., Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunobloting. J. Med. Vet. Mycol., Abingdon,1989;2: 407-412.
3. Dixon DM, KleinBS, Medonza L. Travassos L, Deepe GSJr, Developement of vaccines en their sue in the prevention of fungal infections in brazil. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 1998; 40:155-164,.
4. Mcween JG. Et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. J. Med Vet Mycol., Abingdon,1987; 25:165-175.

2 ARTIGO

Proteção induzida pela Fração de Alta Massa Molecular-hMM de *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos BALB/c.

Proteção induzida pela Fração de Alta Massa Molecular-hMM de *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos BALB/c.

W. R. Pavanelli¹, Geres J², M.A. Ono³ e E. N. Itano³

Resumo: A Paracoccidioidomicose é uma doença granulomatosa causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), sendo a resposta imune protetora contra esta micose relacionada com o desenvolvimento do padrão Th-1 de citocinas. Em estudos anteriores foram observados níveis elevados de IgG e não de IgE a fração de alta Massa Molecular (high Mass Molecular)-hMM, em soros de pacientes com PCM, sugerindo ativação do padrão Th-1 de reposta. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo, determinar a atividade protetora da fração de hMM analisando a evolução da infecção através: da presença de antígenos solúveis gp43 no plasma, da resposta imune humoral gerada, das Unidades Formadoras de Colônias-CFU, da Reação de Hipersensibilidade Tardia-DTH, e das características histopatológicas de lesões granulomatosas em camundongos fêmeas BALB/c previamente imunizados e infectados experimentalmente com *P. brasiliensis*, tendo como controles camundongos infectados e não infectados. A utilização da fração de alta Massa Molecular (hMM), obtida pelo fracionamento do CFA, usando a coluna de gel filtração Sephadex G-200, como um processo de imunização terapêutica, mostrou que camundongos previamente imunizados com 50µg (F-50) e 100µg (F-100) da fração de hMM, apresentaram níveis de antígenos solúveis menores ($p < 0,001$) no período de 28 dias de infecção, em relação ao grupo somente infectado, já para o período de 56 dias, somente os animais F-100, é que apresentaram valores significativos ($p < 0,001$). Para ambos os órgãos analisados pelo CFU (pulmão e fígado), ambos os grupos F-50 e F-100, apresentaram valores estatisticamente significantes ($P < 0,001$) (pulmão-28 dias) e $p < 0,05$ (pulmão-56 dias), sendo que para fígado o grupo F-50 apresentou ($p < 0,05$) e F-100 ($p < 0,01$), 28 e 56 dias, respectivamente. A resposta imune celular específica mensurada in vivo pelo DTH, foi desenvolvida eficientemente pelos animais que foram previamente imunizados, em ambos os períodos 28 e 56 dias e grupos F-50 e F-100. A análise das lesões granulomatosas evidenciou, em animais imunizados, um grau de compactação e organização maior, sem a disseminação do fungo para outros órgãos, quando comparado aos animais não imunizados. Ainda quanto aos níveis de anticorpos IgG anti ExoAg e anti gp43, podemos observar que ambos os grupos F-50 e F-100 apresentaram níveis elevados de anticorpos ($p < 0,001$), nos 28 dias, e 56 dias ($p < 0,001/p < 0,01$) pós-infecção, respectivamente. Contudo os níveis de IgG anti fração de hMM, divergiram entre os grupos F-50 e F-100, visto que em 28 dias somente o grupo F-50, apresentou nível significativo ($p < 0,001$) se comparado ao grupo infectado. Já no período de 56 dias, somente o grupo F-100, mostrou valores significantes ($p < 0,05$). Estes dados sugerem que a proteção pode ser induzida em camundongos BALB/c imunizados com a fração de hMM.

¹ Mestrado em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-Pr.

² Especialização em Biologia Aplicada à Saúde, UEL

³ Departamento de Ciências Patológicas, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-Pr.

2.1 INTRODUÇÃO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença infecciosa, granulomatosa, causada por um fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), que cresce, sob a forma de levedura a 37°C, ou como micélio à 25°C, sendo restrita a América Latina, com grandes áreas endêmicas no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina [3]. Acredita-se que cerca de 10 milhões de pessoas estejam infectadas com o fungo, das quais 2% podem vir a desenvolver a doença [17].

Tem se verificado uma correlação entre as formas clínicas da PCM e os padrões de resposta imune em ambos os modelos experimentais de humanos e camundongos. Na forma crônica da PCM humana a imunidade celular é preservada, apresentando boa resposta imune celular específica e resposta moderada de anticorpos, enquanto que a forma aguda apresenta depressão da resposta imune celular e nível elevado de anticorpos. As mesmas características são observadas em camundongos resistentes e susceptíveis, respectivamente [2,14,15].

As alternativas terapêuticas vigentes são limitadas para combater esta infecção, sendo empregados principalmente medicamentos derivado de azole e amphotericina-B. Entretanto, a toxicidade e o surgimento de resistência a estes agentes antifúngicos, são problemas potenciais e realçam a necessidade de estratégias para o tratamento alternativo. Assim, há um interesse crescente em identificar formas alternativas e profiláticas, como vacinas ou métodos imunoterapêuticos para o tratamento da PCM.

O equilíbrio entre resposta imune Th-1/Th-2 é importante para uma proteção efetiva contra agentes infecciosos e os componentes do fungo podem modular o perfil das citocinas, promovendo um efeito protetor [3-4].

Existem poucos relatos descrevendo o papel de antígenos de *P. brasiliensis* em indução de resposta imune protetora em PCM experimental.

Diniz et al [11], mostraram que a identificação de componentes do antígeno de *P. brasiliensis* os quais induzem a produção de anticorpo durante o curso de infecção, podem contribuir para um melhor entendimento da doença e dos mecanismos envolvidos na proteção do hospedeiro.

O processo de fracionamento de antígenos de *P. brasiliensis*, gerando uma resposta imune a antígenos menos complexos tem contribuído para uma melhor compreensão de como o sistema imune do hospedeiro funciona [10].

Dentre os antígenos menos complexos, tais como antígenos purificados (F0 e FII) de *P. brasiliensis* apresentam a capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T e de induzir aumento de IFN- γ , IL-10 e TGF- β . [12].

A ativação dos macrófagos em infecções contra fungos sistêmicos com promoção de aumento da imunidade mediado por células e uma imunidade protetora com ativação de linfócitos Th-1 e liberação de INF- γ , tem sido demonstrado com o domínio P10 da gp43, juntamente com Adjuvante de Freund Completo (AFC) [21].

Também tem sido demonstrado proteção em camundongos BALB/c infectados intratraquealmente com cepa virulenta (1914) de *P. brasiliensis*, com indução da resposta imune celular e produção de IFN- γ , IL-12 e TNF- α e ativação de macrófagos, contendo a disseminação e progressão da doença com a utilização de um plasmídeo (VR-gp43), que carrega consigo o gene completo da gp43 [19].

Considerando a possibilidade da fração de alta massa molecular (hMM) de *P. brasiliensis*, em induzir a resposta Th1 [13], o presente trabalho teve como objetivo analisar a atividade protetora da fração de hMM, por meio da análise do nível de gp43 solúvel no sangue, da determinação de Unidades Formadoras de Colônias (CFU) e análise histopatológica. Adicionalmente foi analisada a reação de DTH específica e nível sérico de IgG a fração de hMM, gp43 e ExoAg, em PCM experimental com camundongos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Animais

Camundongos fêmeas adultos BALB/c de 6-8 semanas (20 a 25 g) mantidos no Biotério do laboratório de Imunologia, Departamento de Ciências Patológica.-CCB UEL, foram alimentados *ad Libitum* com ração peletizada e esterilizada.

2.2.2 Microorganismo

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* cepa Pb18, foi mantido a 35 °C, cultivado em ágar Saboraud 4% e repicado a cada cinco dias.

2.2.3 Obtenção de antígenos de *P. brasiliensis*

O antígeno (CFA) foi obtido de acordo com Camargo [6], modificado pela adição do inibidor de protease (PMSF). A fração de hMM foi obtida após o fracionamento do CFA, em Coluna Sephadex-G200 [13].

2.2.4 Protocolo experimental

Camundongos BALB/c foram divididos em 4 grupos: a) Controle, b) Infectado, c) imunizados com 50µg da fração de hMM e infectados, d) imunizados com 100µg da fração de hMM e infectados. Os camundongos imunizados receberam três doses da fração de (hMM), sendo a primeira com adjuvante completo de Freund

e mais duas doses com intervalos de 15 dias, com adjuvante incompleto de Freund , e após 45 dias foram infectados com 1×10^6 células de leveduras de *P. brasiliensis*, por via endovenosa. Os animais controles receberam PBS estéril ou apenas 1×10^6 células de forma leveduriformes de *P. brasiliensis*.

Os animais foram sacrificados após 28 e 56 dias da infecção. Neste mesmo intervalo os animais controle também foram sacrificados.

2.2.5 ELISA para detecção de gp 43 solúvel em plasma

Placas de 96 orifícios sensibilizadas com 100 μ L/orifício de IgG de coelho anti gp43, na concentração de 12 μ g/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato, foram incubadas por 1 hora a 37°C e depois overnight a 4°C. Em seguida foram lavadas 4 vezes em tampão de lavagem (PBS, Tween 20, leite mólico), bloqueadas por uma hora em tampão de bloqueio (PBS, Tween 20, leite mólico), à temperatura ambiente. Após novas lavagens (4 vezes) em tampão de lavagem, as amostras foram distribuídas em duplicatas, 100 μ L/orifícios, diluídas 1:10 em tampão de diluição (PBS, leite mólico) e incubadas por 1 hora, à 37°C.

Após 4 lavagens, foi adicionado 100 μ L/orifícios de anticorpo monoclonal de camundongo anti-gp43, na concentração de 20 μ g/mL e novamente incubados por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem, e adição de 100 μ L/orifícios de conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo, diluído em tampão de diluição a 1:4000, a placa foi incubada novamente por 1 hora a 37°C. Após adição de 100 μ L da solução reveladora (tampão citrato, OPD, H₂O₂). A reação foi interrompida em 15 minutos, com 50 μ L de H₂SO₄ 3N seguida de leitura em Multiskan a 492nm.

2.2.6 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia-CFU

A análise da contagem das Unidades Formadora de Colônias-CFU foi feita utilizando amostras de pulmão e fígado diluídas 1:10 de gramas de tecido para mL

de PBS estéril, maceradas e distribuídas em placas de Petri com meio Mc Veigh Morton Medium (Restrepo & Jimenes, 1989), para isolamento para *P. brasiliensis*. Após 8 dias, foram observadas e quantificadas as colônias formadas nas placas.

2.2.7 Reação de Hipersensibilidade Cutânea-DTH

A reação de DTH foi realizada em todos os grupos de camundongos, sendo que 5µg da fração de hMM foi inoculado na pata traseira esquerda dos camundongos, 24 horas antes do sacrifício dos animais. Foi utilizado um paquímetro para medir o inchaço na pata inoculada (Teste) e a pata sem inoculo (Normal).

2.2.8 Análise Histopatológica

Amostras do pulmão esquerdo e parte do fígado, foram removidos e fixados em solução de formalina tamponada (0,05M NaH₂PO₄, 0,05M Na₂HPO₄, água destilada e 10% de formol 37%). Os órgãos foram submetidos à desidratação em álcool 70% por 30 minutos, álcool 90% por 30 minutos, 4 banhos de álcool absoluto por 30 minutos e 3 passagens de 15 minutos por xilol. A seguir, submetidos a 3 banhos em parafina.

Secções de 5µm em lâminas foram hidratadas em xilol, álcool e xilol e somente álcool absoluto, 90 e 70% e corados com hematoxilina (25 segundos) e eosina (15 segundos) e lavados em água corrente por 10 minutos. A seguir, os cortes corados foram desidratados em álcool e xilol. E por fim analisados em microscopia óptica.

Para a análise morfométrica, foram analisados 10 granulomas por lâminas, de um total de 7 lâminas por órgão analisado (pulmão e fígado), para verificar a quantidade de células intragranulomas e a área do granuloma, utilizando o programa IMAGE PRO-PLUS® MEDIA CYBERNETICS, sendo que as mensurações foram realizadas com objetiva de 20, e os valores estipulados em µm.

2.2.9 ELISA para detecção de IgG anti-hMM, IgG Anti gp43 e anti-ExoAg.

As placas de 96 orifícios, foram sensibilizadas com 100 μ L/orifícios, contendo 25 μ g/mL do hMMc, de ExoAg e de gp-43, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato, e incubadas por 1 hora a 37°C e overnight a 4°C.

As placas foram então lavadas 4 vezes em tampão de lavagem (PBS, Tween 20, leite mólico), e bloqueadas por uma hora em tampão de bloqueio (PBS, Tween 20, leite desidratado), à temperatura ambiente.

. As amostras foram distribuídas em duplicatas, 100 μ L/orifícios, diluídas 1:10 em tampão de diluição (PBS, leite desidratado) e incubadas por 1 hora, à 37°C. Após lavagem (4x com tampão de lavagem), foram adicionados 100 μ L/orifícios de conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo, diluído em tampão de diluição a 1:4000 e em seguida feita à incubação por 1 hora a 37°C.

Após nova lavagem foram adicionados 100 μ L da solução reveladora (tampão citrato, OPD, H₂O₂), e a reação interrompida após 15 minutos, com 50 μ L de H₂SO₄ 3N seguida de leitura da placa em Multiskan a 492nm.

2.2.10 Análise Estatística

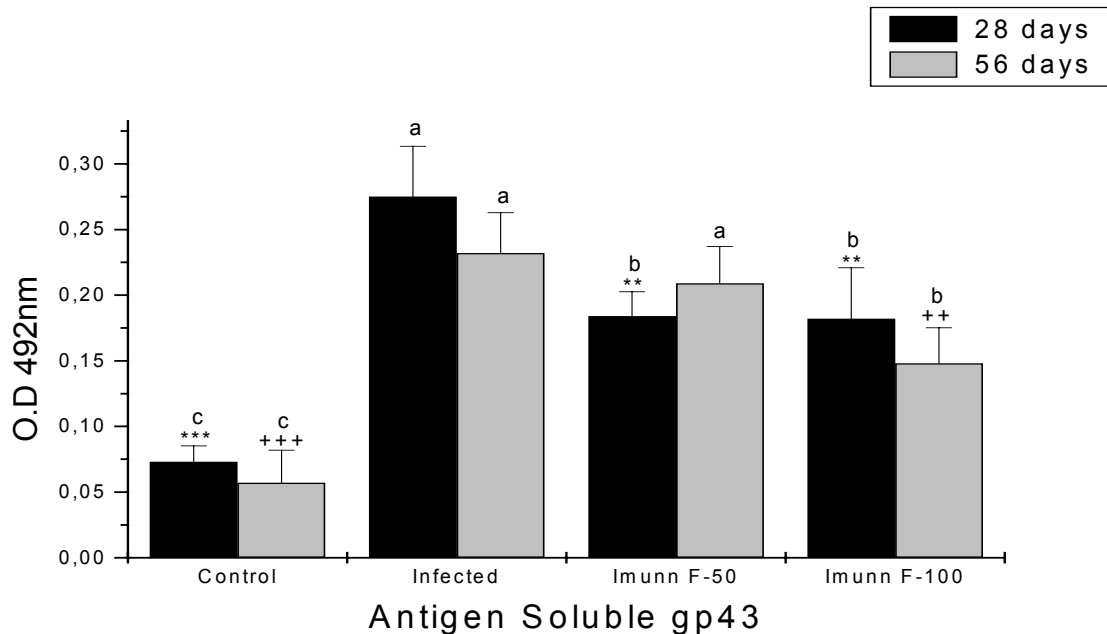
As comparações estatísticas foram realizadas através da análise da variância (ANOVA) e teste de Tukey. Todos os valores são relatados como Média e Desvio Padrão da média, com valores significativos quando $p < 0.05$. A reação de DTH foi avaliada utilizando o programa de STATISTIC 6.0 e teste de Tukey.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Nível de Antígeno Solúvel-gp-43 (Antigenemia) no Plasma

Os animais imunizados com a fração de hMM (F-50 e F-100), apresentaram níveis inferiores de antígeno solúvel (gp43), quando comparados com o grupo de

camundongos infectados (28 dias) $p < 0.01$. Com relação ao período de 56 dias, apenas o grupo de camundongos imunizados com F-100 da fração de hMM, evidenciou níveis significativos em relação ao grupo de infectados $p < 0.01$, demonstrando haver uma relação dose dependente ao longo da infecção. (Fig 1).



Nível de Antígeno Solúvel-gp-43 (Antigenemia) no Plasma

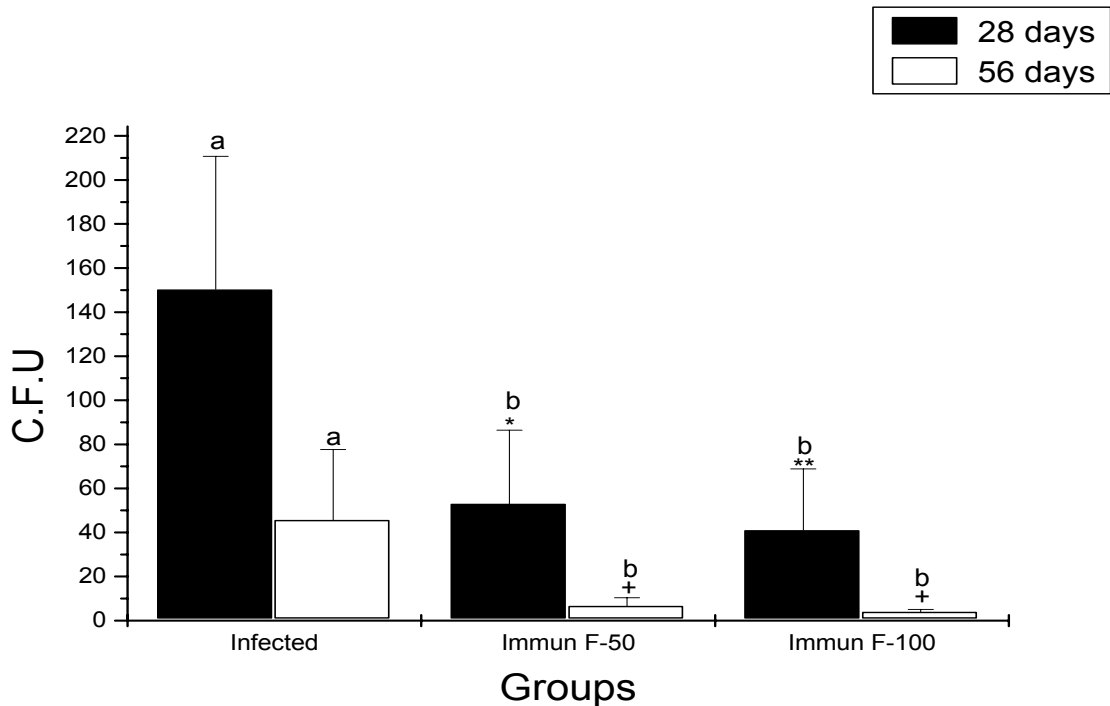
Fig1– Detecção de antígeno gp43 solúvel em soro de camundongos Controle, Infectado e Imunizados com 50 e 100 μ g da fração de hMM, determinados por ELISA 28 e 56 dias após a infecção i.v com *P.brasiliensis* (Pb 18). Dados são informados como densidade óptica (OD), sendo à diluição do soro 1:10 em cada grupo experimental (n=7). Valores significativos quando (***) $p < 0.001$ e (**) $p < 0,01$ tempo 28 dias e (+++) $p < 0.001$ e $p < 0,01$ tempo 56 dias), obtidos quando camundongos Imunizados e Controle foram comparados em relação aos Infetados.

► Letras indicam comparações entre grupos do mesmo período.

2.3.2 Análise da proteção da fração de hMM usando a técnica de CFU

Os resultados de CFU de pulmão dos camundongos que foram previamente imunizados com a fração de hMM (F-50 e F-100), apresentaram números inferiores de colônias, se comparado com o grupo de camundongos infectados, para ambos os

tempos (28 e 56 dias), com um $p < 0,001$ para o período de 28 dias e $p < 0,05$ para o período de 56 dias. (Fig 2)

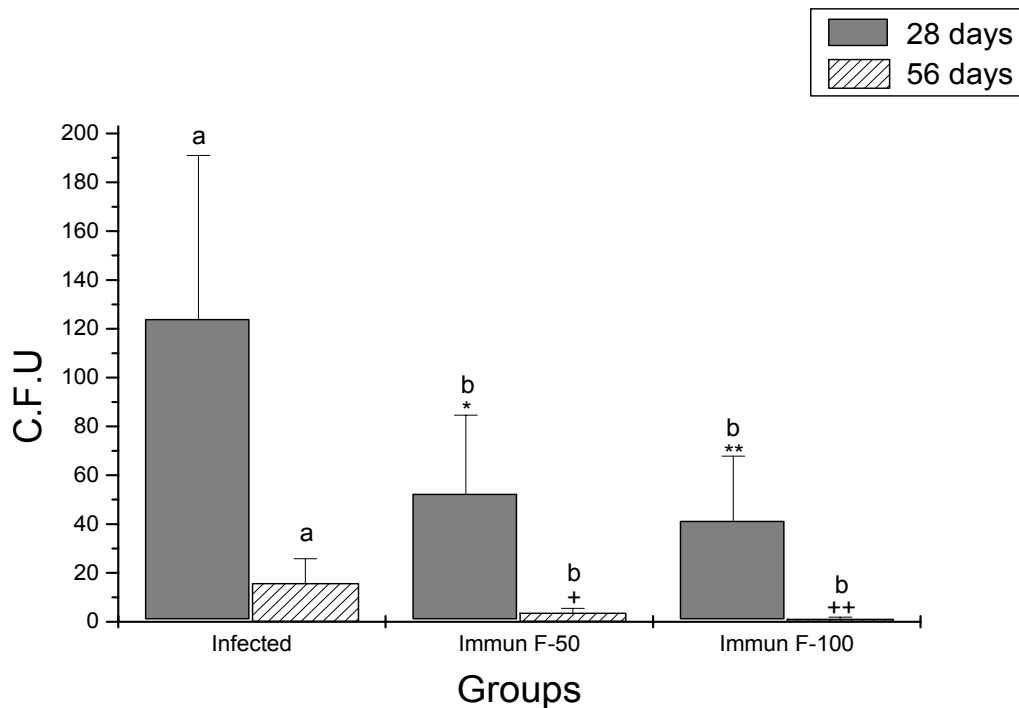


Análise da proteção da fração de hMM usando a técnica de CFU Pulmão.

Fig 2 - Efeito protetor da imunização com F-50 e F-100 da fração de hMM antígenos de *P. brasiliensis* em camundongos. O CFU de pulmão foi calculado 28 e 56 dias após a infecção com *P. brasiliensis* Pb 18. Os dados são informados como média±S.D. em cada grupo experimental (n=8). Valores significativos quando (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ tempo 28 dias e + $p < 0,05$ tempo 56 dias), sendo obtidos quando camundongos Imunizados foram comparados aos Infetados.

► Letras indicam comparações entre grupos do mesmo período

O mesmo resultado foi observado para o CFU de fígado, com valores significativos em relação ao grupo dos animais infectados, com variações dos valores de $p < 0,01$ e $p < 0,05$ para ambos os grupos F-50 e F-100, e períodos.(Fig 3)



Análise da proteção da fração de hMM usando a técnica de CFU Fígado

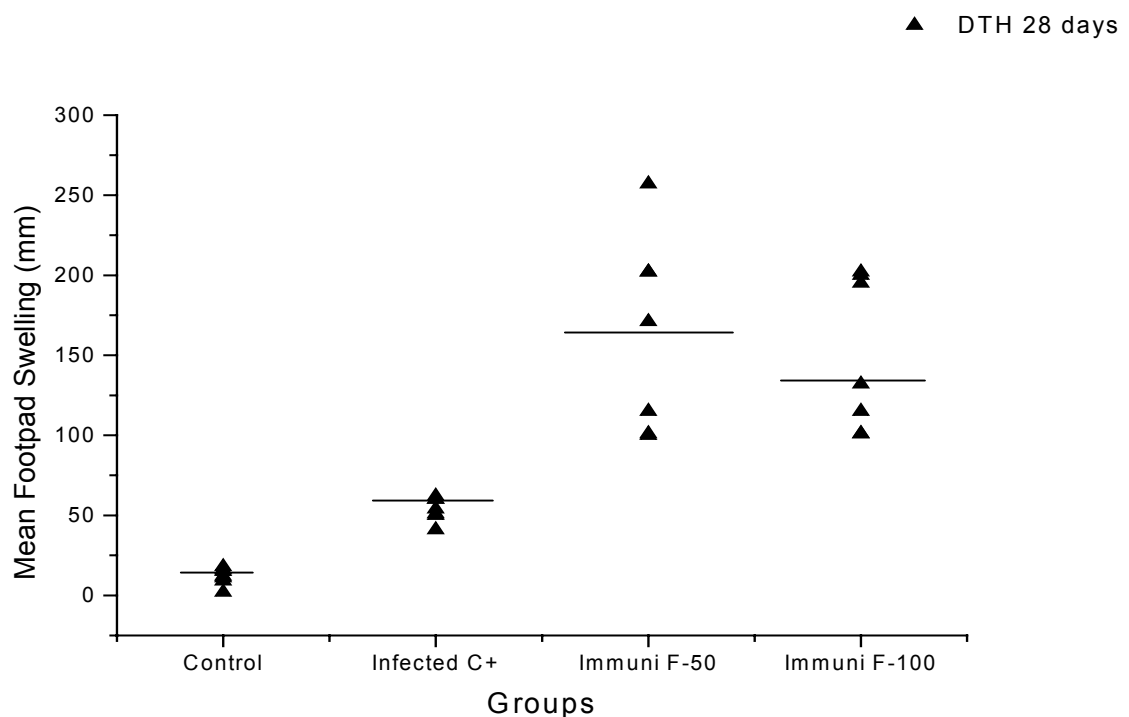
Fig 3- Efeito Protetor da imunização com F-50 e F-100 μ g da fração de hMM, antígenos de *P. brasiliensis* em camundongos. O CFU de fígado foi calculado 28 e 56 dias após a infecção com *P. brasiliensis* Pb 18. Os dados são informados como média \pm S.D. em cada grupo experimental (n=8). Valores significativos quando (**p<0,01, *p<0,05 tempo 28 dias e **p<0,01, +p<0,05 tempo 56 dias), sendo obtidos quando camundongos imunizados foram comparados aos Infetados.

► Letras indicam comparações entre grupos do mesmo período

2.3.3 Reação de Hipersensibilidade Tardia-DTH

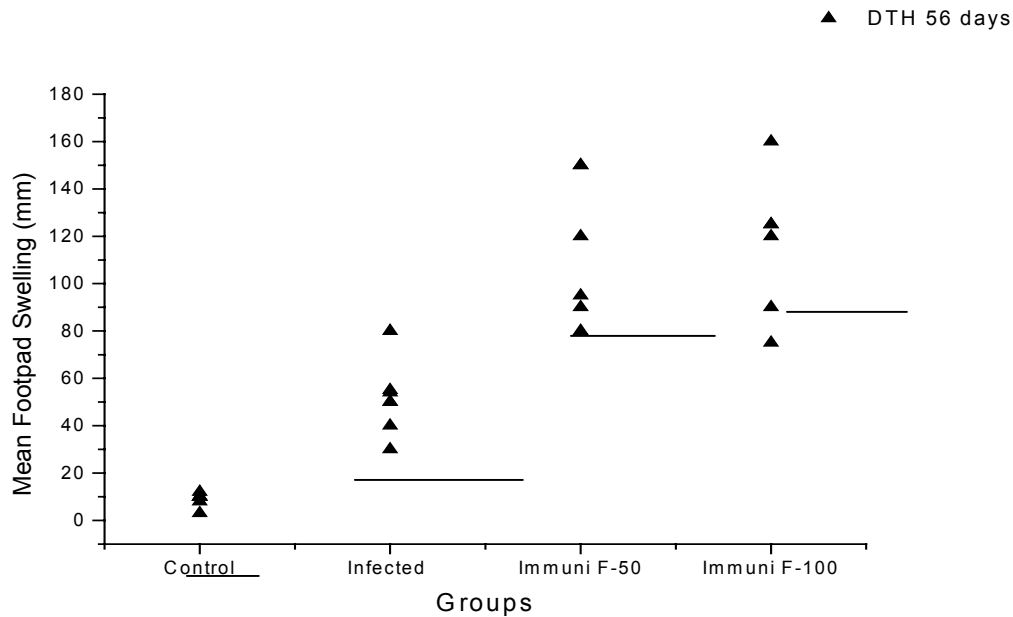
Camundongos imunizados demonstraram em ambos os períodos um

aumento do edema na pata que recebeu a fração de hMM. Os valores avaliados pela média foram os seguintes, para os respectivos grupos: grupo imunizado com 100µg (período de 28 e 56 dias), é $0,142\pm 0,048$ e $0,115\pm 0,029$, já para o grupo imunizado com 50µg $0,154\pm 0,061$ e $0,114\pm 0,030$, já para o grupo de animais infectados foram observados os seguintes valores $0,059\pm 0,019$ e $0,048\pm 0,019$, e grupo controle com valores de $0,011\pm 0,005$ e $0,006\pm 0,005$, respectivamente. (Fig-4 e Fig-5).



Efeito *in vivo* da fração de hMM na resposta do DTH-28 dias

Fig 4 - O DTH foi calculado 28 dias após a infecção com *P. brasiliensis* Pb18, como descrito em Material e Métodos. Dados são informados como média em cada grupo experimental (n=5), sendo obtidos quando camundongos imunizados foram comparados em relação aos Infetados e Controle.



Efeito *in vivo* da fração de hMM na resposta do DTH-56 dias

Fig 5- O DTH foi calculado 56 dias após a infecção com *P. brasiliensis* Pb 18, como descrito em Material e Métodos. Dados são informados como média em cada grupo experimental (n=5), sendo obtidos quando camundongos imunizados foram comparados em relação aos Infetados e Controle.

2.3.4 Análise Histopatológica e Morfométrica

Camundongos imunizados com (F-50) da fração de hMM, com 28 dias após a infecção apresentaram formação de lesões exudativas com granulomas compactos, com algumas células de *P. brasiliensis*, observados em pulmão e fígado, não havendo disseminação para o baço. Contudo, aos 56 dias foram observados granulomas pequenos e com poucas células fúngicas. Os animais imunizados com (F-100) período 28 e 56 dias, apresentaram granulomas pequenos e compactos, com poucas ou nenhuma célula presente no fígado e baço. Entretanto para os animais infectados e não imunizados, em ambos os períodos, podemos verificar a presença de granulomas gigantes com inúmeras células de *P. brasiliensis* viáveis no pulmão e fígado, ainda uma extensa destruição do tecido com granulomas epitelióides exudativos. (Fig-6 e Fig-7) e Tab-1.

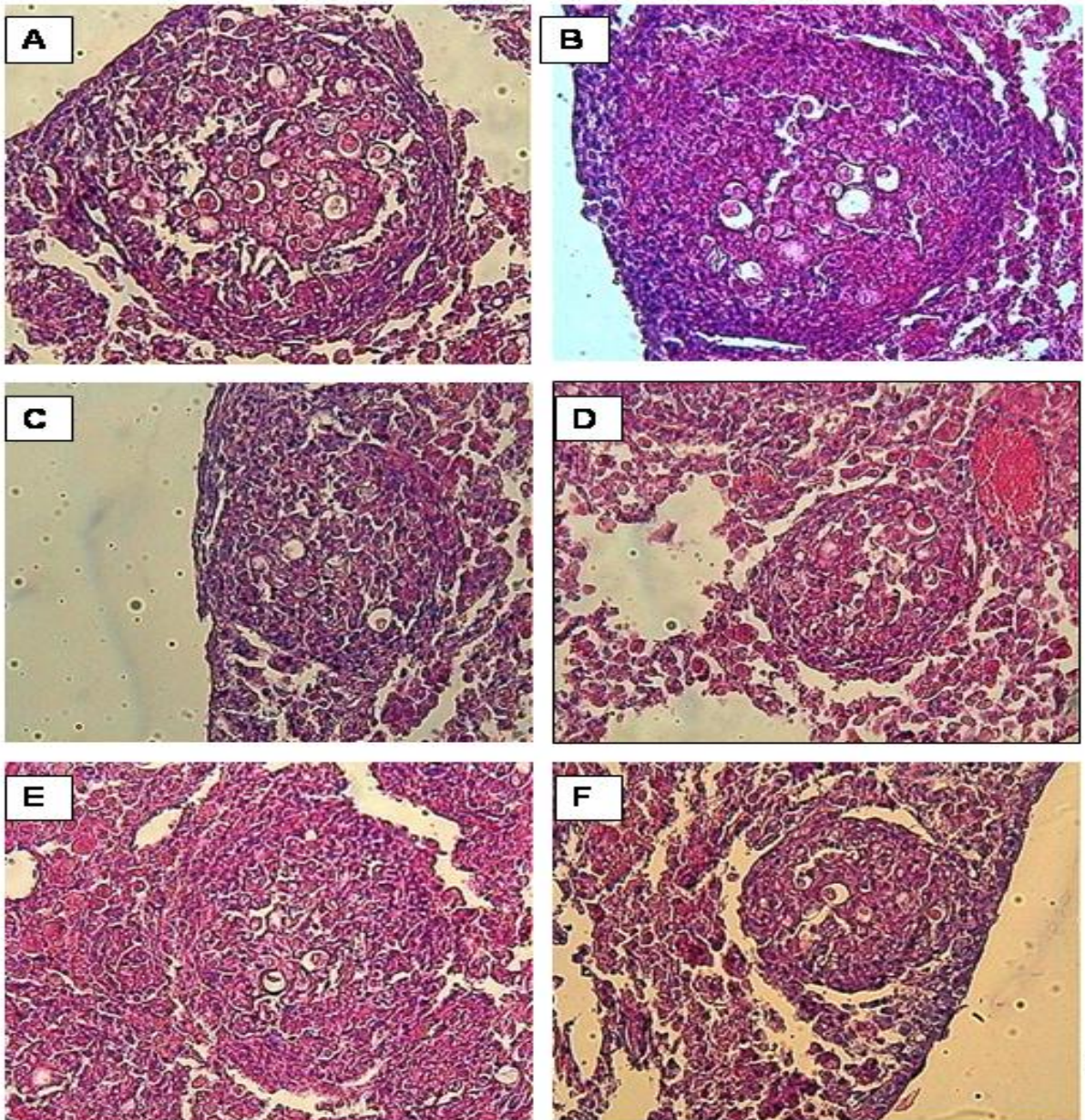


Fig 6- Lesões Histopatológicas representadas em camundongos imunizados com a fração de hMM (F-50 e F-100) de *P. brasiliensis* em pulmão. Seções A e B de camundongos que receberam apenas PBS, mostrando granuloma confluyente com muitas células de leveduras viáveis e uma destruição extensa do tecido com exudato e granulomas epitelióides. Seções de camundongos imunizados com F-100 (C-D) mostrando granuloma aparentemente resolvido, pequeno, compactado e com algumas células do fungo. Seções de tecido de camundongo imunizados com F-50 apresentando granuloma aparentemente resolvido e pequeno, contendo algumas células do fungo em ambas as seções analisados (E-F). [28 dias de A,C,E- e 56 dias de B,D,F]

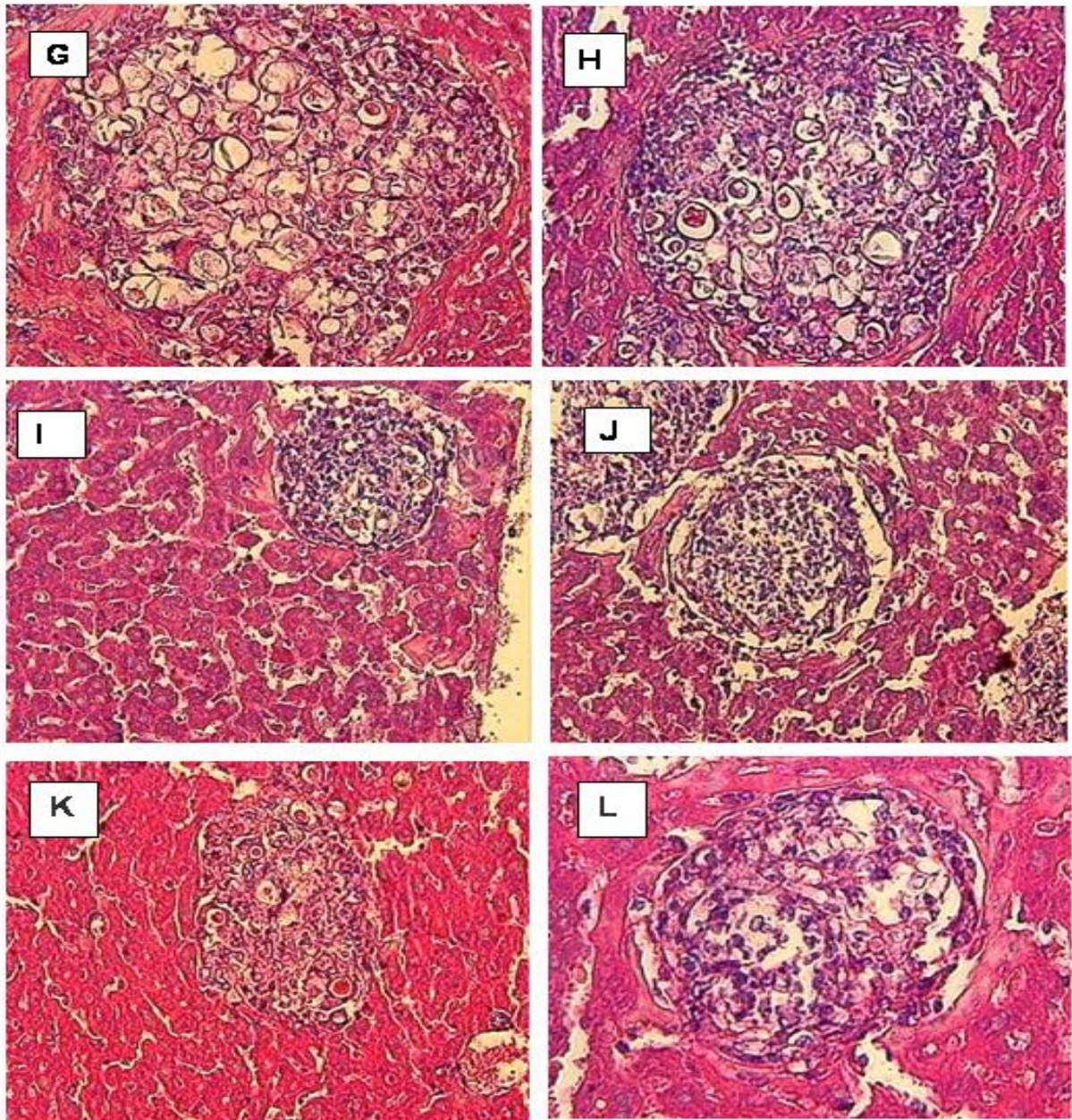


Fig 7- Lesões Histopatológicas representadas em camundongos imunizados com a fração de hMM, grupos F-50 e F-100, de *P. brasiliensis* em fígado. Seções G e H camundongos imunizados apenas com PBS mostrando granuloma confluyente com muitas células de leveduras viáveis. Seções de (I-J) camundongos imunizados F-100, mostrando granuloma aparentemente resolvido, pequeno e compactado, com poucas células do fungo. Seções de tecido de camundongos imunizados F-50, apresentaram granuloma aparentemente resolvido e pequeno, contendo algumas células do fungo nas seções analisadas (K-L). [28 dias G,I,K e H,J,L - 56 dias]

Tabela 1-- Análise Morfométrica quanto ao número de células Fúngicas e Area do granuloma

Tabela 1- Análise da extensão das lesões granulomatosas formada em tecidos de camundongos BALB/c após imunização e infecção com *P. brasiliensis*

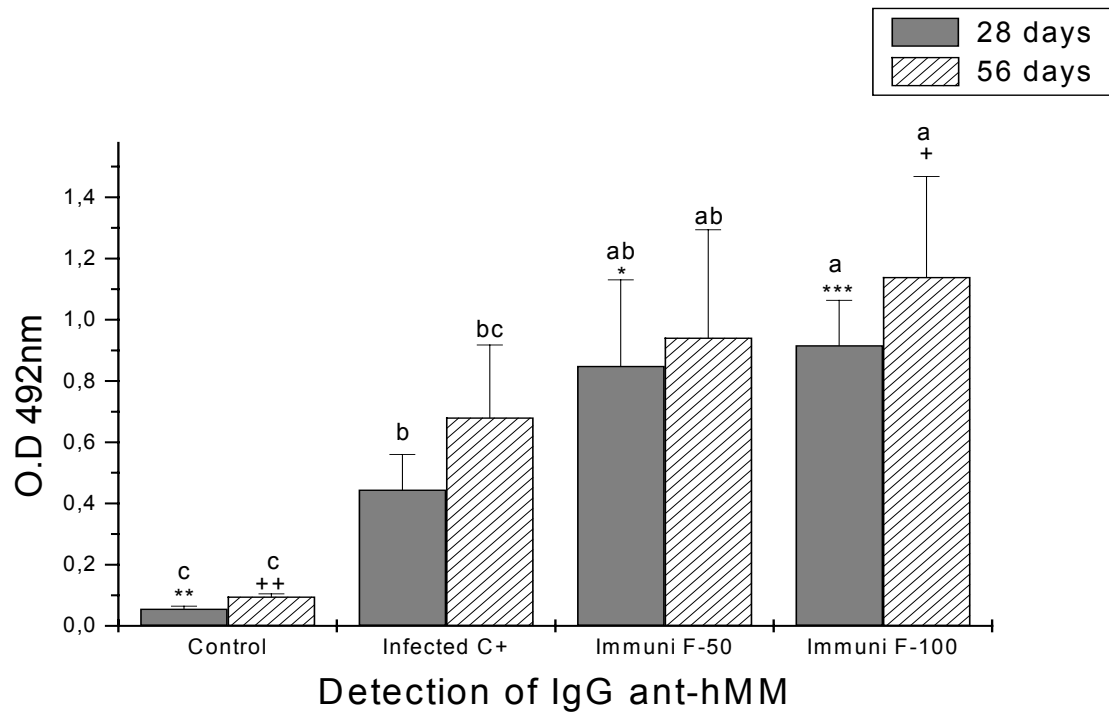
	<u>Organs/Period</u>				
	Lung/28days	Liver/28days	Lung/56 days	Liver/56 days	
<u>Nº of célls Fungics intragranuloma</u>	8***	6.8***	2.7***	1.3***	Fc-100µg
	15.3**	9**	4***	3.3***	Fc-50µg
	34.2	23.2	19.6	19.5	Infected
	14,254.10**	13,988.05***	8,253.14***	8,197.17***	Fc-100µg
<u>Area (µm)</u>	33,447.08	18,533.04*	10,287.15**	9,249.18***	Fc-50µg
	37,226.06	33,891.02	48,841.12	39,056.16	Infected

- ▶ Representações das lesões em pulmão e fígado causadas por *P. brasiliensis* em camundongos imunizados ou não imunizados com a fração de hMM (F-50 e F-100).
- ▶ Os valores foram calculados comparando não imunizados e infetados à animais imunizados e infectados. Valores significativos quando (**p<0,001, ***p<0,01, *p <0,05), sendo obtidos quando camundongos imunizados foram comparados aos Infetados.
- ▶ Cada grupo é constituído de 6 animais.

2.3.5 Nível de IgG anti ExoAg, anti fração de hMM e anti gp43

Os resultados de ELISA para a detecção de anticorpos anti fração de hMM expresso em Densidade Óptica (O.D), foram altamente significativos para os grupos de camundongos imunizados com a fração de hMM (F-50 e F-100) após 28 dias, em relação aos camundongos infectados. Porém para o período de 56 dias, foi observado que somente os camundongos imunizados com F-100 da fração de hMM,

induziram aumento significativo dos níveis de IgG, comparado ao grupo de infectados. (Fig 8)

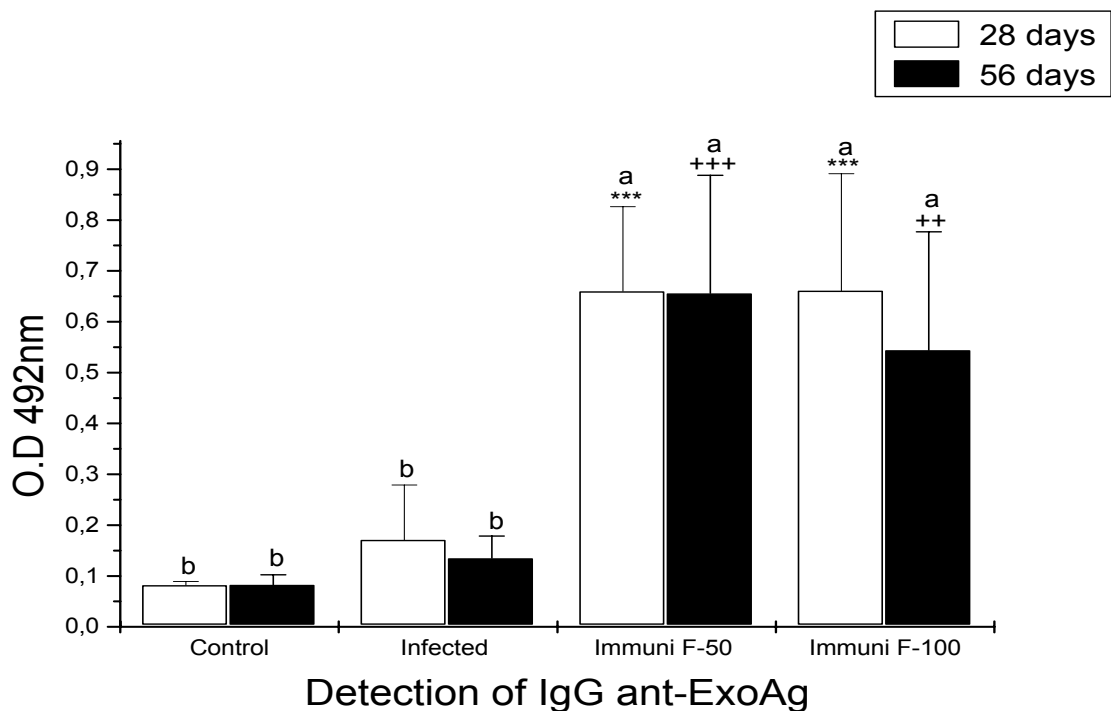


Nível de IgG anti fração de hMM

Fig 8 - Resposta dos anticorpos contra fração de hMM de *P. brasiliensis* em camundongos Controle, Infectado e Imunizados F-50 e F-100, com a fração de hMM, determinados por ELISA, 28 e 56 dias após a infecção i.v com *P. brasiliensis* (Pb 18). Dados são informados como densidade óptica (OD), sendo a diluição do soro 1:10 em cada grupo experimental (n=7). Valores significativos quando (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ tempo 28 dias e +++ $p < 0,01$, ++ $p < 0,05$ tempo 56 dias), sendo obtidos quando camundongos imunizados e controle foram comparados em relação aos Infetados.

► Letras indicam comparações entre grupos do mesmo período

Os resultados de anticorpos anti ExoAg, demonstraram que os grupos de camundongos imunizados com (F-50 e F-100) da fração de hMM, em ambos os períodos (28 e 56 dias), apresentaram valores estatisticamente significativos de IgG, quando relacionados com o grupo de camundongos infectados.(Fig 9)

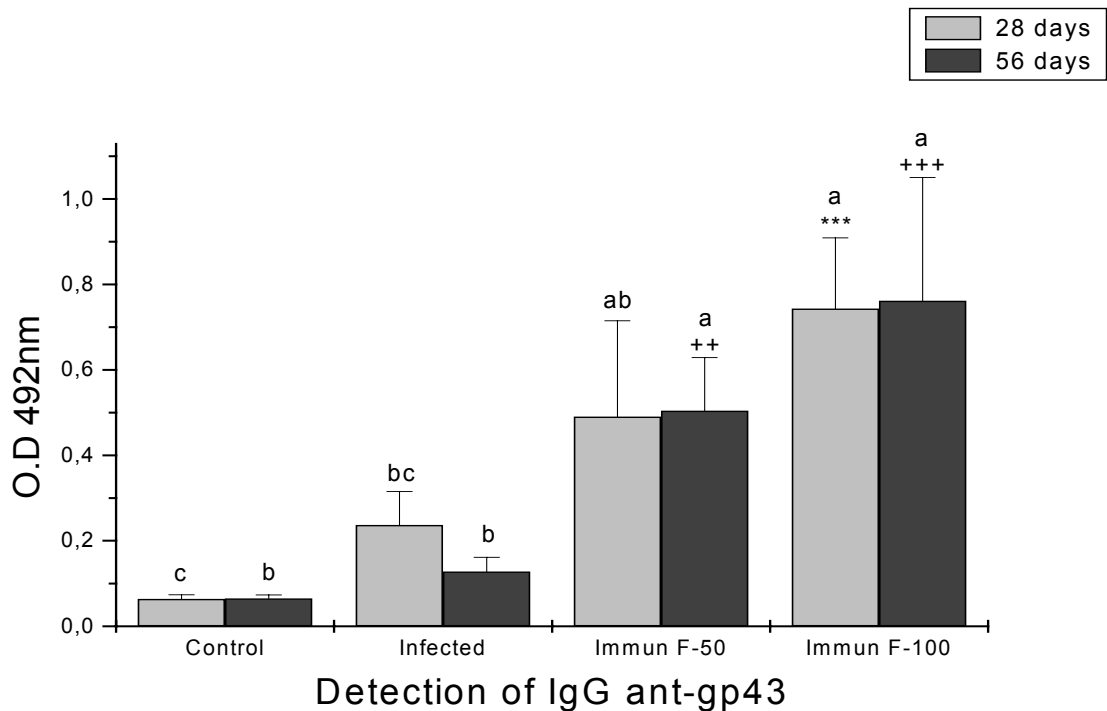


Nível de IgG anti ExoAg

Fig 9- Resposta dos anticorpos contra ExoAg de *P. brasiliensis* em camundongos Controle, Infectado e Imunizados F-50 e F-100, com a fração de hMM, determinados por ELISA, 28 e 56 dias após a infecção i.v com *P. brasiliensis* (Pb 18). Dados são informados como densidade óptica (OD), sendo a diluição do soro 1:10 em cada grupo experimental (n=7). Valores significativos quando (***) $p < 0,001$ tempo 28 dias e (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ tempo 56 dias), sendo obtidos quando camundongos Imunizados e Controle foram comparados em relação aos Infetados.

► Letras indicam comparações entre grupos do mesmo período

Com relação aos anticorpos anti gp43, observamos que para o período de 28 dias, somente o grupo de animais F-100, apresentou valores significativos em relação ao grupo de animais infectados. Já para o período de 56 dias ambos os grupos F-50 e F-100, apresentaram níveis significativos de anticorpos em relação ao grupo de camundongos infectados. (Fig 10)



Nível de IgG anti gp43

Fig 10- Resposta dos anticorpos contra gp43 de *P. brasiliensis* em camundongos Controle, Infectado e Imunizados F-50 e F-100, com a fração de hMM, determinados por ELISA, 28 e 56 dias após a infecção i.v com *P. brasiliensis* (Pb 18). Dados são informados como densidade óptica (OD), sendo a diluição do soro 1:10 em cada grupo experimental (n=7). Valores significativos quando (***) $p < 0,001$ tempo 28 dias e (***) $p < 0,001$, (++) $p < 0,01$ tempo 56 dias), sendo obtidos quando camundongos Imunizados e Controle foram comparados em relação aos Infetados.

► Letras indicam comparações entre grupos do mesmo período

2.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O conhecimento de mecanismos que possam regular e modular uma resposta imune adequada e efetiva, levando ao controle da infecção, poderão contribuir para o desenvolvimento de processos imunoterápicos no tratamento da PCM, doença que afeta milhões de pessoas na América Central e do Sul.

É neste contexto e considerando o potencial de utilização a fração de hMM de *P. brasiliensis* como vacina, baseado no isotipo de imunoglobulina observado em pacientes com PCM na fase aguda e crônica [10], que o presente trabalho analisou a atividade protetora da fração de hMM em PCM experimental em camundongos BALB/c.

A capacidade protetora foi evidenciada pelo menor nível de antígeno solúvel em soros de camundongos imunizados com a fração de hMM e comprovado pelo menor número de fungos viáveis em pulmão e fígado, observados pela análise de CFU. Estas metodologias, antigenemia [16] e a CFU [20], tem sido utilizadas como parâmetros para discriminar camundongos resistentes e suscetíveis.

Considerando que o nível de gp43 solúvel em grupo imunizado com 100µg da fração de hMM foi menor tanto em 28 quanto em 56 dias, o mesmo não ocorrendo com 56 dias do grupo imunizado com 50µg da fração de hMM, sugere-se que a dose de 100µg é mais eficiente que a dose de 50µg. A eficiência dessa maior dose também pode ser observada no resultado de CFU de Pulmão e Fígado de 28 e 56 dias, com maior significância de F-100 em relação a F-50. O adjuvante utilizado também pode ter contribuído na proteção, via aumento na resposta imune, no entanto as diferenças observadas acima, com as duas doses, sugerem que a fração de hMM apresenta efeito protetor, e estudos com maior dose poderia evidenciar melhor esse efeito protetor.

Concordando com os dados de antigenemia e CFU, a análise histopatológica de pulmão e fígado, demonstrou em ambos os períodos, redução do número de células fúngicas nos granulomas. Além disso, as lesões granulomatosas formadas foram de tamanho e número reduzidos, com maior grau de compactação e organização nos animais imunizados.

A morfologia das lesões granulomatosas está relacionada com a resposta imune celular do hospedeiro e a formação de granulomas compactos, com poucas

células fúngicas é observada em pacientes com doença crônica localizada e já em pacientes com a forma aguda, as lesões em geral são desorganizadas. O mesmo ocorre em animais imunossuprimidos com baixos níveis de INF- γ , produção de citocinas Th-2 e doença progressiva com a presença de muitas lesões granulomatosas e desorganizadas [1, 8, 9, 14,18].

Concordando com os resultados de análise histopatológica a resposta imune celular específica, mensurada *in vivo*, pelo DTH, foi desenvolvida eficientemente pelos animais que foram previamente imunizados, em ambos os períodos 28 e 56 dias e grupos (F-50 e F-100), sendo ainda confirmado pela análise da proliferação celular *in vitro*, (dados não demonstrados).

Tem sido observada uma correlação entre reação positiva de DTH e baixa gravidade da doença ou mesmo baixa reação de DTH e/ou resposta imune celular e alta quantidade de CFU em órgãos de camundongos susceptíveis [5,20, 7], bem como uma correlação de DTH e baixa gravidade da doença em humanos [3].

Adicionalmente, no presente trabalho, foi verificado altos níveis de IgG a gp43, ExoAg e a fração de hMM. A resposta imune humoral não é importante na defesa do hospedeiro à *P. brasiliensis*, sendo que altos títulos de anticorpos em geral estão associados à depressão da resposta imune celular-DTH [20].

Este aumento pode ser devido a sub-classe de IgG ligada a Th1, uma vez que houve desenvolvimento da resposta imune celular nesses animais. Para confirmação desta hipótese são necessários estudos adicionais.

Baseado nos resultados de antigenemia, de CFU, de histopatologia e DTH concluímos que a fração de hMM apresenta efeito protetor na paracoccidiodomicose experimental em camundongos BALBc, adicionando-se assim mais um candidato de antígeno de *P. brasiliensis* com potencial imunoterápico em PCM.

REFERÊNCIAS

- 1- Almeida SR, Moraes JZ, Camargo ZP, Gesztesi JL, Mariano M, Lopes JD. Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by Antigen-presenting Cells. *Cell immune* 1998;190:68-76.
- 2- Arango M, Yarzabal L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in Paracoccidioidomycosis. *Micopatologia* 1982;79:115-123.
- 3- Brummer E, Castañeda E, and Restrepo A. Paracoccidioidomycosis an update. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993;6:89-117.
- 4- Burger E, Vaz CC, Sano A, Calich VL, Singer-Vermes LM, Xilieh CF, Kashino SS, Nishimura K, Myagi M. Histopathology of paracoccidioidomycotic infection in athymic and euthymic mice: a sequential study. *American Journal Of tropical Medicine and Hygiene.* Aug 1996; 55:235-242.
- 5- Calich VL, Vaz CA, Burger E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol.* May-Jun, 1998;149: 407-417
- 6- Camargo ZP., Unterkircher C, Travassos LR., Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. *J. Med. Vet. Mycol., Abingdon,*1989;2: 407-412.
- 7- Cano LE, Singer-vermes LM, Vaz CA, Russo M, Calich VLG. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotopes patterns. *Infect Immun* May 1995;63:1777-1783.
- 8- Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, de Franco MF. Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in mice: morphology and correlation of lesions with humoral and cellular immune response. *Mycopathologia.* 1982 Jan 15;77(1): 3-11.
- 9- Defaveri J, Martin LC, Franco M. Histological and ultrastructural study of the inflammation evoked by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in previously immunized mice. *Mycopathologia.* 1989 Jan;105(1): 53-8.
- 10- Diniz SN, Cisalpino PS, Koury MC, Andrade GMQ, Nogueira MGS, Góes AM. In vitro Human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. *Microbes and infection.* 1995;1:353-360.
- 11- Diniz SN, Cisalpino PS, Freire AT, Silva-Teixeira DN, Contigli C, Rodrigues Junior V, Goes AM. In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Hum Immunol.* Aug 2001;62:799-808.

- 12- Diniz SN, Reis BS, Goes TS, Zouain CS, Leite MF, Goes AM, Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* 2004;22:485-492.
- 13- Dissertação de Mestrado em Microbiologia, com o Título “Reatividade de Anticorpos a componentes de Alta Massa Molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* em soros de Pacientes com Paracoccidioidomicose Aguda e Crônica. Audrey De Souza Marques, 2003.
- 14- Dixon DM, Klein BS, Mendoza L, Travassos L, Deepe GS Jr, Development of vaccines en their sue in the prevention of fungal infections in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, 1998;40:155-164.
- 15- Franco MV, Goes AM, Koury MC. Model of in vitro granulomatous hypersensitivity in human paracoccidioidomycosis. *Micopathologia*. 1997;36:129-137.
- 16- Garcia MM, Singer-Vermes LM, Calich VLG, Burger E. Antigenemia in the isogenic murine model of paracoccidioidomycosis, in “13th Congress of the International Softy for human an Animal Mycology” (pp 183, Abst p419), 1997.
- 17- McEwen JG, Garcia AM, Ortiz BL, Boterro S, Restrepo A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res* 1995;26:305-306.
- 18- Murphy JW, Bistoni F, Deepe GS Jr et al. Type I and Type II cytokines from basic science to fungal infections. *Med Mycol* 1998; 1 (Supplement 1):109-118.
- 19- Pinto AR, Puccia R, Diniz SN, Franco MF, Travassos LR. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* 2000; 18: 3050-3058.
- 20- Singer-Vermes LM, Caldeira CB, Burger E, Calich LG. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol*. 1993, Oct;94(1):75-9.
- 21- Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, Franco MV, Travassos LR, Mapping of the T-Cell Epítope in the Major 43-Kilodalton Glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 Response Protective against Fungal Infection in Balb/c Mice. 1998;6: 786-793.