

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL E ANTÍGENOS  
IMUNODOMINANTES EM *Calomys callosus* INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE COM  
*Paracoccidioides brasiliensis***

Gabriele Garcias de Faria

Uberlândia – MG  
Fevereiro – 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL E ANTÍGENOS  
IMUNODOMINANTES EM *Calomys callosus* INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE COM  
*Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada ao  
Colegiado do Programa de Pós-  
graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas como  
requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre

**Gabriele Garcias de Faria**  
Aluna

**Adriano Mota Loyola**  
Orientador

**José Roberto Mineo**  
Co-orientador

Uberlândia – MG  
Fevereiro – 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

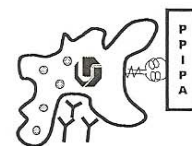
- F224a Faria, Gabriele Garcias de, 1983-  
Avaliação da resposta humoral e antígenos imunodominantes em *Calomys callosus* infectados experimentalmente com *Paracoccidoides brasiliensis* / Gabriele Garcias de Faria. - 2009.
- 81 f. : il.
- Orientador: Adriano Mota Loyola.  
Co-orientador: José Roberto Mineo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
- Inclui bibliografia.
1. Paracoccidiodomicose - Teses. 2. Doenças transmissíveis - Teses. 3. Paracoccidoides brasiliensis - Teses. I. Loyola, Adriano Mota. II. Mineo, José Roberto. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 616.992.282



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
Telefax: (034)3218-2333 E-Mail [coipa@ufu.br](mailto:coipa@ufu.br)  
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



**Gabriele Garcias de Faria**

“Avaliação da resposta humoral e antígenos imunodominantes em *Calomys callosus* infectados experimentalmente com *Paracoccidioides brasiliensis*”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 19 de fevereiro de 2009.

Prof. Dra. Margareth Leitão Gennari Cardoso – UESC

Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola – FOUFU

## **DEDICATÓRIA**

À Deus que me guia e me encoraja nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Dr. Adriano Mota Loyola, pela sabedoria, estímulo e confiança.

Aos meus pais, Elci e Aparecida pelo carinho, amor e apoio dedicados integralmente a mim.

Aos meus irmãos, Ricardo e Aline pelos momentos de alegria e pelo incentivo.

Ao Luciano, pelo amor, incentivo e pela paciência nos momentos mais importantes.

# AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. José Roberto Mineo, pela co-orientação e sugestões que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À profa. Dra. Rosy Iara pelo apoio e ajuda na técnica de *immunoblotting*, inclusive nos finais de semana.

À profa. Dra. Margareth Gennari que me ensinou os primeiros passos no laboratório.

À Dra. Deise Aparecida por me dar dicas que foram de grande ajuda.

À Maria Margarida e ao Alceu Berbert, meus grandes companheiros de trabalho.

Aos colegas de laboratório que mais me ajudaram: Cristina, Deborah, Dâmaso, Leandro, Rafael, Renato e Tatiane.

Aos demais colegas: Alexandre, Ana Cláudia, Arlido, Celene, Cristiano, Danilo, Diego, Janaína, Jorge, Juliana, Julianne, Karine, Lara, Laura, Marcelo, Mariana, Marília, Marco Túlio, Priscila, Sérgio Sargenti, Taísa e Thaís pelos momentos de alegria e companheirismo.

Às secretárias da Pós-graduação, Lucileide e Lucélia, ao secretário do Laboratório de Imunologia, Max e aos secretários do laboratório de Patologia, Adalci e Selma por estarem sempre a disposição.

Aos técnicos: Ângela, Marley e Zilda pela colaboração.

Ao funcionário Junão, pela grande ajuda nas fases iniciais deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>BSA</b>	Soro albumina bovina
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>DAB</b>	3,3'-tetrahydrocloroeto de diaminobenzidina
<b>DO</b>	Densidade ptica
<b>d.a.i.</b>	dias após infecção
<b>EGTA</b>	cido etilenoglicoltetractico
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático ( <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos
<b>gp</b>	Glicoproteína
<b>x g</b>	Veze a gravidade
<b>HCl</b>	cido clorídrico
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrognio
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	cido sulfúrico
<b>IE</b>	ndice ELISA
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgG1</b>	Imunoglobulina G subclasse 1
<b>IgG3</b>	Imunoglobulina G subclasse 3
<b>IgG2</b>	Imunoglobulina G subclasse 2
<b>IgG2a</b>	Imunoglobulina G subclasse 2a
<b>IgG4</b>	Imunoglobulina G subclasse 4
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IL</b>	Interleucina
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>kHz</b>	Quilohertz
<b>M</b>	Molar

<b>mg/mL</b>	Miligrama/Mililitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>N</b>	Normal
<b>NK</b>	Célula exterminadora natural ( <i>Natural Killer</i> )
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OPD</b>	Orto-fenilenodiamina
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfatos
<b>PBS-T</b>	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 ( <i>Polyoxyethylene-sorbitan nonolaurate</i> )
<b>PBS-TM</b>	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e de Molico
<b>PCM</b>	Paracoccidiodomicose
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
<b>T.A.</b>	Temperatura ambiente
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento e transformação $\beta$
<b>Th1</b>	Linfócito T <i>helper</i> 1
<b>Th2</b>	Linfócito T <i>helper</i> 2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>Treg</b>	Célula T reguladora
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b><math>\mu</math>g/mL</b>	Micrograma/Mililitro
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrômetro



## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1. Aspectos gerais sobre o <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	11
1.2. Paracoccidioidomicose humana .....	12
1.2.1. Epidemiologia .....	12
1.2.2. Transmissão, formas clínicas e resposta imune .....	13
1.3. Aspectos estruturais e componentes antigênicos do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e sua relação com a interação fungo-hospedeiro .....	17
1.4. Modelos experimentais no estudo da paracoccidioidomicose .....	22
1.5. <i>Calomys callosus</i> como modelo experimental de doenças infecciosas .....	26
1.5.1. Paracoccidioidomicose experimental em <i>Calomys callosus</i> .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	29
2.1. Objetivo geral .....	29
2.2. Objetivos específicos .....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
3.1. Animais .....	30
3.2. Obtenção do inóculo de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	30
3.2.1. Cultivo de leveduras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	30
3.2.2. Desenvolvimento da infecção experimental .....	31
3.3. Análise Histológica .....	31
3.4. Avaliação da resposta humoral e da imunodominância antigênica .....	32
3.4.1. Produção do antígeno solúvel de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (AgPb) .....	32
3.4.2. Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA) para detecção e quantificação de IgG, IgG1 e IgG2a específicas para <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	33
3.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e <i>immunoblotting</i> .....	34
3.5. Análise estatística .....	35
3.6. Normas de biossegurança e considerações éticas .....	36
<b>4. RESULTADOS</b> .....	37
4.1. Análise Histopatológica .....	37
4.2. Ensaio ELISA .....	39
4.3. Perfis protéico e antigênico do antígeno solúvel de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ...	42
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64
<b>ANEXO 1</b> .....	81

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Secção histológica do pulmão de *C. callosus* inoculado com  $0,6 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis* (A) 7 dias após infecção: parênquima pulmonar saturado por um infiltrado inflamatório misto (HE, objetiva 40 x). (B) 120 dias após infecção: Granulomas frouxos e coalescentes apresentando coleções de macrófagos permeados por células fúngicas (seta), combinados com focos esparsos de linfócitos (HE, objetiva 40 x) (C) Coloração de Grocott mostrando numerosas leveduras dentro de infiltrado granulomatoso observado aos 120 dias após infecção (objetiva 40 x)..... 38.

**Figura 2.** Níveis de anticorpos (IgG, IgG1 e IgG2a) específicos a *P. brasiliensis* expressos em Índice ELISA (IE). *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn foram infectados intraperitonealmente com  $0,6 \times 10^5$  leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*. Amostras de soro foram coletadas aos 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias após infecção. Valores são indicados como média  $\pm$  erro padrão da média. A linha pontilhada indica os valores positivos de IE (IE > 1,2). Letras diferentes acima das barras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos dentro do mesmo período ( $p < 0,05$ ). Os símbolos \*, # e + indicam aumento estatisticamente significativo dos níveis de anticorpos, em relação aos 7 dias após a infecção, nos *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn respectivamente ( $p < 0,05$ )..... 41.

**Figura 3.** Perfil protéico do antígeno solúvel de *P. brasiliensis* em SDS-PAGE (8-22%) com marcação por *Coomassie brillante blue* (A) e *immunoblottings* (B) representativos para os perfis de reconhecimento dos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti- *P. brasiliensis* em amostras de soro de cada grupo experimental aos 120 dias após infecção. *C. callosus* (linha 1), camundongo B10.A (linha 2), e camundongo A/Sn (linha 3). Marcadores de massa molecular (Mr) estão expressos em kiloDaltons (kDa).....42.

**Figura 4.** Intensidade média das bandas antigênicas de 117kDa (●), 110kDa (■), 95-100kDa (→), 70kDa (↗), 43kDa (✱), 36kDa (✚), 29kDa (→) e 24kDa (⊕), reconhecidas pelos anticorpos IgG1 e IgG2a dos soros dos *Calomys callosus*, camundongos B10.A e A/Sn..... 52.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Bandas antigênicas (massa molecular aparente) reconhecidas pelo menos uma vez pelos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a nos soros dos *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn infectados intraperitonealmente com  $0,6 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis*..... 44.

**Tabela 2.** Bandas antigênicas (massa molecular aparente) reconhecidas pelo anticorpo IgG total em pelo menos 50% dos soros dos *C. callosus*, e dos camundongos B10.A e A/Sn, infectados intraperitonealmente com  $0,6 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis*, distribuídas segundo os diferentes animais investigados e os diferentes períodos de observação do experimento (7, 15, 30, 60, 90, 120 dias de infecção)..... 47.

**Tabela 3.** Bandas antigênicas (massa molecular aparente) reconhecidas pelo anticorpo IgG1 em pelo menos 50% dos soros dos *C. callosus*, e dos camundongos B10.A e A/Sn, infectados intraperitonealmente com  $0,6 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis*, distribuídas segundo os diferentes animais investigados e os diferentes períodos de observação do experimento (7, 15, 30, 60, 90, 120 dias de infecção)..... 48.

**Tabela 4.** Bandas antigênicas (massa molecular aparente) reconhecidas pelo anticorpo IgG2a em pelo menos 50% dos soros dos *C. callosus*, e dos camundongos B10.A e A/Sn, infectados intraperitonealmente com  $0,6 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis*, distribuídas segundo os diferentes animais investigados e os diferentes períodos de observação do experimento (7, 15, 30, 60, 90, 120 dias de infecção)..... 49.

**Tabela 5.** Intensidade média de reatividade de IgG1 e IgG2a específicas com as bandas imunodominantes na infecção experimental dos *C. callosus* com o isolado Pb18 do *P. brasiliensis*, distribuídas de acordo com a cronologia de observação do experimento..... 50.

**Tabela 6.** Intensidade média de reatividade de IgG1 e IgG2a específicas com as bandas imunodominantes na infecção experimental dos camundongos B10.A com o isolado Pb18 do *P. brasiliensis* distribuídas de acordo com a cronologia de observação do experimento..... 51.

**Tabela 7.** Intensidade média de reatividade de IgG1 e IgG2a específicas com as bandas imunodominantes na infecção experimental dos camundongos A/Sn com o isolado Pb18 do *P. brasiliensis* distribuídas de acordo com a cronologia de observação do experimento..... 51.

## RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, é a principal micose sistêmica da América Latina. Modelos experimentais são importantes no estudo da PCM. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta humoral específica (IgG, IgG1 e IgG2a) de *Calomys callosus* experimentalmente infectados com *P. brasiliensis* e identificar padrões de reconhecimento antigênico comparativamente aos dos camundongos considerados susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn) à infecção. Os animais foram infectados com  $0,6 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis* (isolado Pb18). Pulmão, fígado, baço e amostras de soro foram coletados aos 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias após a infecção. Nos achados histológicos a infecção evoluiu gradativamente nos grupos estudados, com uma inflamação mais proeminente nos *C. callosus*, sobretudo nos pulmões. No ensaio ELISA, os níveis de IgG e IgG1 foram similares para os três grupos, mas quando o anticorpo IgG2a foi considerado, *C. callosus* apresentou os níveis mais baixos. Nos ensaios de *immunoblotting* as bandas (antígenos) imunodominantes comuns aos três grupos de animais reconhecidas por IgG1 foram as de 117, 110, 95-100, 70, 43, 36 e 24kDa, e por IgG2a foram as de 95-100, 43 e 29kDa. Considerando a resposta de IgG2a, a frequência de reconhecimento antigênico pelos soros dos *C. callosus* e também intensidade das bandas foram menores do que nos camundongos B10.A e A/Sn. Em conclusão, *C. callosus* inoculado com  $0,6 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis*, apresentou uma maior susceptibilidade à infecção, com um alto grau de lesões teciduais, uma menor resposta do anticorpo IgG2a e um menor reconhecimento das frações antigênicas com uma intensidade menor, quando comparado aos modelos experimentais murinos.

**Palavras chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomicose, infecção experimental, *Calomys callosus*, resposta humoral, *immunoblotting*, IgG, IgG1, IgG2a.

## ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) caused by a dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, is the main systemic mycosis of Latin America. Experimental models are important in the PCM study. The objective of this study was evaluate the specific humoral response (IgG, IgG1 and IgG2a) of *Calomys callosus* infected experimentally with *P. brasiliensis* and to identify patterns of antigenic recognition comparatively to susceptible (B10.A) and resistant (A/Sn) mice. The animals were infected with  $0.6 \times 10^5$  yeasts de *P. brasiliensis* (Pb18 isolate). Lung, liver, spleen and serum samples were collected at 7, 15, 30, 60, 90 and 120 days after infection. We noticed that in the histological findings the infection evolved gradually in the studied groups, with more prominent inflammation in *C. callosus*, especially in the lung. In ELISA assay, the levels of IgG and IgG1 were similar for the three groups, but when we consider the IgG2a levels, *C. callosus* presented the lowest levels. In immunoblotting assays, the immunodominant bands (antigens) that were common to the three animals groups recognized by IgG1 were 117, 110, 95-100, 70, 43, 36 and 24kDa and by IgG2a were 95-100, 43 and 29kDa. Considering the IgG2a response, the frequency of antigenic recognition by the *C. callosus* serum and the band intensity were lesser than B10.A and A/Sn mice. In conclusion, *C. callosus*, inoculated with  $0.6 \times 10^5$  *P. brasiliensis* yeasts, presented greater susceptibility to the infection, with a higher degree of tissue injuries, lower response of IgG2a and a lesser recognition of antigenic fractions with a lower intensity, when as compared to murine experimental model.

**Key-words:** *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, experimental infection, *Calomys callosus*, humoral response, immunoblotting, IgG, IgG1, IgG2a.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos gerais sobre o *Paracoccidioides brasiliensis*

*Paracoccidioides brasiliensis* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem Onygenales, família Onygenaceae (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002; SAN-BLAS; NIÑO-VEGA, 2008). *P. brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), principal micose sistêmica de ocorrência no Brasil e América Latina (FRANCO et al., 1987). Foi originalmente descrito por Lutz (1908), que isolou o fungo de lesões de mucosa oral e de linfonodo cervical no Instituto Biológico de São Paulo. *P. brasiliensis* é um fungo termodimórfico, pois, nos tecidos do hospedeiro e quando cultivado a 37°C cresce na forma de levedura. Na temperatura ambiente (25°C), o *P. brasiliensis* se desenvolve sob a forma de micélio (BRUMMER; CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993).

A forma micelial é constituída por filamentos de células cilíndricas, com ramificações denominadas hifas, de 1 a 3µm, que são multinucleadas, finas, septadas. A forma de levedura é esférica ou oval, medindo de 4 a 30µm de diâmetro, com paredes refringentes, múltiplos vacúolos, corpos lipídicos e um grande número de mitocôndrias. Sua principal característica é a formação de novas células por brotamentos múltiplos da célula-mãe, fenômeno denominado de exosporulação múltipla, o que lhe confere o típico aspecto morfológico que se assemelha a “roda de leme” identificada em preparações a fresco ou no tecido (LACAZ, 1994).

A diferenciação de micélio para levedura, *in vitro*, se inicia com um aumento de diâmetro e nos espaços intraseptais das hifas. Há o espaçamento da parede celular da levedura, as células apresentam brotamentos múltiplos e se multiplicam rapidamente. Na diferenciação inversa, hifas alongadas são formadas a partir de leveduras ovaladas. Nos dois casos as células não se diferenciam todas ao mesmo tempo, podendo ser encontradas formas de transição (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002).

Embora tenham sido obtidos grandes avanços em vários aspectos da PCM, a ecologia do *P. brasiliensis* ainda não está bem esclarecida. Acredita-se que o fungo viva como saprófita em solos úmidos, ricos em matéria orgânica e coberto por vegetação, com poucas variações de temperatura (FRANCO et al., 2000). Alguns estudos apresentam indícios que confirmam essa teoria, como o isolamento de *P. brasiliensis* das vísceras de tatus da espécie *Dasyus novemcinctus* (BAGAGLI et al., 1998). *P. brasiliensis* já foi isolado também em outros animais a partir de biópsia de um macaco (RESTREPO, 1994) e de um cão (RICCI et al.,

2004). Inquéritos epidemiológicos já encontraram eqüinos (CONTI-DIAZ et al., 1972), bovinos (SILVEIRA et al., 2008), macacos (CORTE et al., 2007) e cães (ONO et al., 2001) positivos para PCM por meio de teste de reação intradérmica ou ELISA.

Além disto, o *P. brasiliensis* já foi isolado em amostras de capim coletadas em um pasto em Araçatuba-SP (D'ANTONIO; SPESSOTO, 2004). Alguns relatos já mostraram o isolamento do *P. brasiliensis* a partir do solo (SHOME; BATISTA, 1963; NEGRONI, 1966; ALBORNOZ, 1971; SILVA-VERGARA et al., 1998). Outros, menos freqüentes, têm descrito seu isolamento em ração para cachorros (FERREIRA et al., 1990), fezes de morcego (GROSE; TAMSITT, 1965) e de pingüim (GARCIA et al., 1993).

Franco e colaboradores (2000) acreditam que o *P. brasiliensis* possa residir transitoriamente, por tempo variável, no solo. Ono e colaboradores (2002) observaram que vários agrotóxicos inibem o crescimento de *P. brasiliensis in vitro*. É possível que este seja um dos fatores que dificultem o isolamento deste fungo a partir de amostras do solo.

## **1.2. Paracoccidioidomicose humana**

### **1.2.1. Epidemiologia**

A PCM representa um importante problema de Saúde Pública devido ao seu alto potencial incapacitante e de mortalidade, principalmente entre trabalhadores ligados à atividades agrícolas. Usualmente, a doença acomete indivíduos na fase mais produtiva de sua vida, e, sendo assim, a doença torna-se um relevante problema de saúde pública pelo seu impacto sócio-econômico (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Vale ressaltar, neste sentido, que a PCM foi associada a 3181 casos de óbito no Brasil entre os anos de 1980 e 1995. Coutinho e colaboradores (2002) chamam a atenção para o fato de a PCM ser a oitava causa de mortalidade por doença infecciosa de caráter crônico, apresentando a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas no Brasil.

A PCM tem sido diagnosticada principalmente no Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia como doença endêmica em áreas rurais apresentando temperaturas em torno de 18 a 25°C, elevado índice pluviométrico (800 a 2000mm por ano), altitude entre 50 a 1.300 metros e predomínio de florestas nativas (RESTREPO et al., 1985). Todavia, casos de PCM têm sido descritos na Europa, Estados Unidos, África, Ásia e Oriente Médio. Em todos estes casos, os pacientes relatam história de terem vivido em áreas endêmicas da América Latina. Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas estejam infectadas, e que a incidência anual da doença ativa em áreas endêmicas seja de 1 a 3 indivíduos para cada 100.000 habitantes/ano (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002).

Um aspecto da PCM, mais recentemente descrito, é a sua ocorrência em pacientes imunocomprometidos que se encontravam sob tratamento do câncer (MAYMÓ-ARGANARAZ et al., 2003) ou após transplante renal (SHIKANAI-YASUDA et al., 1995), ou em pacientes infectados pelo HIV que desenvolveram a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Não obstante, sua freqüência nestes casos tem sido considerada baixa. Para os pacientes com SIDA, em particular, sua baixa freqüência tem sido atribuída a baixa prevalência do HIV em áreas rurais, provavelmente vinculada a comportamentos culturalmente determinados que desfavorecessem o contato com o HIV. Além disto, o extensivo uso de antifúngicos em pacientes infectados pelo HIV pode ser o fator restritivo ao aumento da incidência de PCM neste grupo de pacientes (MARQUES; CONTERNO; SIGARBI, 1995; ALMEIDA et al., 2003; CASTRO; MARTINEZ, 2006).

### **1.2.2. Transmissão, formas clínicas e resposta imune**

A infecção é usualmente adquirida pela inalação de fragmentos miceliais ou de conídios, que se transformam em leveduras no pulmão (McEWEN et al., 1987).

A maioria dos indivíduos de ambos os sexos que são expostos ao *P. brasiliensis* podem desenvolver uma infecção assintomática, que é constatada pela alta proporção de testes cutâneos positivos encontrados na população de áreas endêmicas (MARQUES et al., 1983). Entretanto, quando a PCM doença se estabelece, pode evoluir de duas maneiras: como forma aguda ou juvenil ou como forma crônica ou adulta (FRANCO et al., 1987).

A forma aguda ou juvenil é responsável por 3 a 5% dos casos da doença, predominando em pacientes jovens de ambos os sexos. Em geral acomete crianças e adolescentes, podendo também, eventualmente, acometer indivíduos de até 35 anos de idade. Evolui com progressão rápida, caracterizando-se por linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas (GIRALDO et al., 1976; FRANCO et al., 1987; FRANCO et al., 1989; BERNARD; DUARTE, 2000).

A forma crônica é a mais comum, desenvolvendo-se a partir de um foco primário ou por reativação de foco(s) quiescente(s) já estabelecido(s). Progride lentamente, afetando inicialmente os pulmões, na maior parte dos casos. Pode permanecer localizada (forma unifocal) ou sofrer disseminação para outros órgãos ou tecidos (forma multifocal). Em geral, há uma prevalência da PCM crônica em adultos do sexo masculino, chegando a uma proporção de ocorrência entre homens e mulheres da ordem de 78:1 casos. Todavia, esses dados não apresentam relação com o grau de exposição dos mesmos, uma vez que estudos



indicam que ambos os sexos apresentam contato similar com o patógeno (GIRALDO et al., 1976; FRANCO et al., 1987; FRANCO et al., 1989; BERNARD; DUARTE, 2000).

A maior susceptibilidade entre os homens é atribuída à ausência do efeito inibitório de hormônios femininos (17  $\beta$ -estradiol) sobre a transformação da fase filamentosa em leveduriforme (SALAZAR et al., 1988; ARISTIZABAL et al., 1998), acarretando em um retardo na adaptação do fungo ao organismo hospedeiro (RESTREPO et al., 1984).

As diferentes manifestações da doença estão associadas a vários fatores: alguns próprios ao parasita, como sua virulência e patogenicidade; outros ao hospedeiro, como susceptibilidade genética à infecção e a integridade do sistema imunológico. Os critérios de gravidade da evolução da doença, bem como sua avaliação (leve, moderado e grave) têm sido considerados subjetivos, podendo variar conforme a análise individual do clínico (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A partir de sua entrada no hospedeiro, fagócitos polimorfonucleares e mononucleares iniciam o processo de interação com o fungo. Este processo envolve o recrutamento e ativação de outras células que culmina na formação de uma resposta inflamatória do tipo granulomatosa, da qual participam macrófagos e células derivadas (células epitelióides e gigantes multinucleadas), linfócitos T, B, células NK, plasmócitos, eosinófilos e outras células estromais residentes (MOSCARDI-BACCHI et al., 1989).

A partir do estudo das lesões cutâneas de pacientes doentes, foi possível determinar que o desenvolvimento de granulomas bem organizados, característicos de uma resposta bem modulada, está associado a um perfil de citocinas secretadas designado como do tipo T *helper* 1 (Th1), com expressão preferencial de IFN- $\gamma$  e níveis baixos de IL-10 e IL-5. Do outro lado, granulomas frouxos, mal definidos, apresentaram um perfil de resposta T *helper* 2 (Th2), com secreção de níveis altos de IL-10 e IL-5 (PAGLIARI; SOTTO, 2003).

Neutrófilos humanos não são capazes de destruir leveduras, mas têm a capacidade de exercer efeito fungistático, o que pode estar associado à resistência do hospedeiro na fase inicial da infecção (KURITA et al., 1999). Rodrigues e colaboradores (2007), utilizando modelo *in vitro*, mostraram deficiências de atividade fungicida de neutrófilos humanos não ativados que se revertia na presença de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ou GM-CSF. Estes achados sugeriram aos autores que a ativação de neutrófilos humanos por citocinas é necessária para que haja um efeito celular letal sobre o *P. brasiliensis*.

Macrófagos têm sido apontados como tendo um papel essencial da imunidade ao *P. brasiliensis*. Em um estudo *in vitro* que avaliou a interação de monócitos ou macrófagos humanos com o *P. brasiliensis*, foi possível observar que as leveduras eram facilmente

fagocitadas pelos monócitos ou macrófagos, preservando, todavia, sua capacidade de crescimento no ambiente intracelular. Entretanto, quando os macrófagos foram tratados com IFN- $\gamma$ , houve uma acentuada restrição da multiplicação do fungo (95% das células), sugerindo que leveduras de *P. brasiliensis* fagocitadas podem se multiplicar dentro de monócitos ou macrófagos humanos e que esta multiplicação pode ser inibida quando essas células estão ativadas (MOSCARDI-BACCHI et al., 1994). Monócitos e macrófagos podem produzir um grande repertório de citocinas, e monócitos de pacientes com PCM produzem citocinas pró e antiinflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$ . Esse desequilíbrio na produção dessas citocinas pode ter uma influência negativa na interação monócito-fungo, o que conduz ao crescimento do fungo e sua habilidade de escapar do sistema imune do hospedeiro (PERAÇOLI et al., 2003; KUROKAWA et al., 2007).

Células NK também têm sido implicadas na resposta do hospedeiro na PCM. Um estudo realizado por Peraçoli e colaboradores (1991) mostrou que pacientes com PCM tinham um número aumentado de células NK cuja atividade citotóxica era significativamente menor do que a de células NK de indivíduos saudáveis. Estes achados sugeriram que essas células podem atuar no mecanismo de resistência ao *P. brasiliensis*.

Linfócitos T CD8<sup>+</sup> podem ter um papel importante na patogênese da PCM pulmonar, pois, essas células, foram encontradas no lavado bronco-alveolar de pacientes com PCM, juntamente com citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos alveolares e anticorpos específicos contra *P. brasiliensis* (FORNAZIN et al., 2003).

Um estudo realizado por Cavassani e colaboradores (2006) revelou que células T reguladoras (Tregs) estavam presentes nas lesões e no sangue periférico de pacientes com a forma crônica da PCM. Ademais, os autores identificaram uma inibição significativa da proliferação de células T quando co-cultivadas com células Tregs, sugerindo assim que estas células desempenham um papel importante na modulação da resposta, tanto local quanto sistêmica, em pacientes com PCM.

Quando a resposta do hospedeiro é analisada a luz dos aspectos clínicos, pode-se verificar que pacientes com a forma aguda da PCM apresentam depressão da resposta Th1 e têm uma expressão de imunidade do perfil Th2, consistindo na secreção de níveis baixos de IFN- $\gamma$ , níveis altos das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 (OLIVEIRA et al., 2002), níveis elevados dos anticorpos IgE e IgG4 anti-*P. brasiliensis*, bem como, eosinofilia (MAMONI et al., 2002). Pacientes com a forma crônica da PCM também apresentam uma depressão da resposta Th1. Entretanto, a polarização para a resposta Th2 não se estabelece (BERNARD,

2008), pois as secreções de IFN- $\gamma$  e IL-10 não diferem daquelas observadas na forma aguda da PCM, embora níveis IL-4 e IL-5 sejam significativamente mais baixos (OLIVEIRA et al., 2002). Além disso, pacientes com a forma crônica da PCM produzem níveis altos do anticorpo IgA, provavelmente por causa da estimulação antigênica crônica na mucosa (JUVENALE et al., 2001). Por outro lado, indivíduos assintomáticos que vivem em áreas endêmicas para a PCM mostram um padrão de resposta Th1, com secreção de níveis altos de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 e níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10 (OLIVEIRA et al., 2002).

Investigando por meio de ensaio imunoenzimático a resposta anticórpica específica para gp43 – um antígeno imunodominante do *P. brasiliensis* – em pacientes com as formas aguda e crônica da PCM, Baida e colaboradores (1999) observaram que pacientes com a forma aguda da doença apresentaram os níveis mais altos de IgG total, com predomínio da IgG4, cuja secreção é estreitamente regulada por IL-4. Pacientes com a forma crônica da PCM apresentaram níveis mais altos de IgG2 (regulada por IFN- $\gamma$ ), principalmente nas formas mais benignas da doença. Níveis de IgA também foram mais altos nos pacientes com a forma crônica da doença.

Juvenale e colaboradores (2001) utilizaram antígenos somáticos dos isolados Pb113 e B339 de *P. brasiliensis*, para a avaliação das bandas antigênicas reconhecidas pelos anticorpos presentes nos soros de pacientes com as formas aguda e crônica da PCM. Os autores verificaram que anticorpos IgG2 reconheceram a gp43 e bandas antigênicas de alta massa molecular (acima de 94kDa), especialmente em soros de pacientes com a forma crônica que apresentaram alta reatividade pelo anticorpo IgG2 no ELISA. Já o padrão de reconhecimento pelos anticorpos IgG4 foi heterogêneo, mesmo em pacientes com a formas aguda da doença que tiveram uma forte reatividade pelo anticorpo IgG4 no ELISA. Ferreira e colaboradores (2008) utilizaram antígenos obtidos de um isolado de paciente com a forma aguda da PCM, e verificaram os antígenos de 19, 27 e 31kDa foram reconhecidos exclusivamente pela IgG1 dos soros dos pacientes com a forma aguda da PCM.

### 1.3. Aspectos estruturais e componentes antigênicos do *Paracoccidioides brasiliensis* e sua relação com a interação fungo-hospedeiro

Tanto no *P. brasiliensis*, quanto em outros fungos patogênicos, a quitina representa um importante componente da parede celular relacionada a várias funções na morfogênese, integridade da parede, desenvolvimento de conidióforos, ou na estruturação de moléculas, como adesinas (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002). A quitina está presente em ambas as fases (micelial e leveduriforme), sendo três vezes maior na forma de levedura.

Além disso, a conformação das glucanas no fungo também é diferente, pois, a  $\beta$ -glucana é o principal polissacarídeo da parede micelial, enquanto que a  $\alpha$ -glucana é o principal polissacarídeo da parede de leveduras. Este aspecto estrutural é importante na biologia da interação parasita-hospedeiro, tendo em vista que estão em menor quantidade em isolados menos virulentos (SAN-BLAS; SAN-BLAS, 1994).

Diferentes tipos de antígenos têm sido identificados no *P. brasiliensis*. Estes variados antígenos são constituintes estruturais e metabólicos, secretados ou não. Sua caracterização tem sido realizada a partir das diferentes metodologias empregadas para sua extração, identificadas por designação própria. Entre estes, destacam-se: **1**) o CFA (do inglês: *cell-free antigen*, traduzido como antígeno livre da célula), que é constituído por antígenos coletados de um sobrenadante de uma massa de fungos de cultura sólida homogeneizada sob agitação em vórtex por 30 segundos, e imediatamente centrifugada a 10.000 x g por 60 segundos (CAMARGO et al., 1991); **2**) o exoantígeno (ExoAg), representa um filtrado concentrado obtido a partir da cultura líquida do *P. brasiliensis* (PANUNTO-CASTELO et al., 2003); **3**) o antígeno polissacarídico, que é obtido após autoclavagem da suspensão de células em solução fisiológica (FAVA-NETTO, 1955); e **4**) aquele derivado da desintegração mecânica (ruptura) das células fúngicas (DINIZ et al., 2004), constituído portanto de antígenos somáticos e metabólicos.

Entre os antígenos de *P. brasiliensis*, a glicoproteína de 43kDa (gp43) é o principal componente estudado, sendo reconhecida por 100% dos soros dos pacientes com PCM (CAMARGO; UNTERKIRCHER; TRAVASSOS, 1981; TRAVASSOS et al., 1995).

A gp43 foi identificada em um filtrado de cultura do isolado B339, após eluição em coluna de Sefarose-Concanavalina A. A análise dessa fração revelou três componentes principais cujas massas moleculares são 43, 55 e 72kDa (PUCCIA et al., 1986). A gp43 é sintetizada e armazenada dentro de vesículas densas que parecem migrar para a borda externa da parede celular, sendo secretadas para o espaço extracelular na forma de gotas densas

(STRAUS et al., 1996). A expressão da gp43 na fase de levedura e de micélio é dependente do isolado, ou seja, nos isolados Pb18 e PbD a gp43 é expressa tanto na fase de levedura como de micélio, entretanto, nos isolados Pb1 e PbG, a expressão da gp43 está restrita à fase de levedura. (MATTAR-FILHO et al., 1997).

A gp43 tem a capacidade de se ligar a laminina, um componente protéico da matriz extracelular de mamíferos, mediando, por essa interação, a adesão das leveduras de *P. brasiliensis* à superfície de células epiteliais, um fenômeno identificado com o favorecimento da disseminação do fungo (VICENTINI et al., 1994). Popi, Lopes e Mariano (2002) verificaram que a gp43 também pode estar envolvida no mecanismo de evasão do fungo. Adicionando a gp43 em meio de cultura contendo macrófagos murinos e células fúngicas, os autores puderam observar inibição da fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos peritoneais, tanto de camundongos resistentes como dos susceptíveis, de maneira dose dependente.

Em outro experimento, Konno e colaboradores (2009) adicionaram diferentes peptídeos da gp43 em uma cultura de macrófagos derivados de medula óssea, desafiando-os posteriormente com leveduras de *P. brasiliensis*. Estes autores verificaram que os peptídeos P4 e P23 promoveram o decréscimo do índice de fagocitose dos macrófagos estudados. Ademais, foi também verificado que estes mesmos peptídeos (P4 e P23) inibiam a liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos estimulados por zimozan, e que o peptídeo P4, em particular, alterava a liberação de TNF- $\alpha$ . Esse ensaio demonstrou que estes peptídeos apresentam atividades antiinflamatórias específicas e não específicas.

Outro antígeno identificado no fungo é a glicoproteína de 70kDa. A gp70, na fase de levedura, tem sido identificada principalmente no compartimento intracelular do fungo, mas também é detectada no sobrenadante de cultura. Sua forma purificada é capaz de inibir a atividade de macrófagos através de receptores de manose e de receptores Fc, interferindo na liberação de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por macrófagos peritoneais *in vitro*. Tem sido mostrado que o tratamento de camundongos infectados com *P. brasiliensis* com anticorpos monoclonais anti-gp70 desfavorece a formação de granulomas no pulmão, sugerindo que esta proteína facilita o estabelecimento e progressão da infecção (MATTOS-GROSSO et al., 2003). Ambas gp70 e gp43 inibem a resposta linfoproliferativa quando testadas com linfócitos de pacientes com a PCM doença (BERNARD et al., 1997).

Camargo, Unterkircher e Travassos (1989) utilizando um exoantígeno de leveduras de *P. brasiliensis*, padronizaram um *immunoblotting* para o diagnóstico e seguimento de pacientes com PCM. A gp43 foi o antígeno predominante na reatividade do anticorpo IgG,

sendo reconhecida por 100% dos soros dos pacientes com PCM e a gp70 foi reconhecida por 96% dos soros dos pacientes com PCM.

Salina e colaboradores (1998) detectaram antígenos de *P. brasiliensis* em amostra de urina de pacientes com PCM, sendo que os antígenos de 43 e 70kDa foram os mais freqüentemente detectados em amostras coletadas antes do início do tratamento. Além disso, foi observado que a reatividade diminuía nas amostras coletadas durante a recuperação clínica e aumentava quando da recidiva da doença. Mais recentemente, anticorpos monoclonais foram usados para detectar a gp43 e a gp70 circulantes em amostras de soro, fluido cérebro espinhal e lavado do fluido broncoalveolar de pacientes com PCM (MARQUES-DA-SILVA et al., 2003; MARQUES-DA-SILVA et al., 2004).

A gp58, um antígeno de 58kDa descrito por Figueroa e colaboradores (1995), está presente no citoplasma de micélios e leveduras de *P. brasiliensis*. Há indicações químicas que a gp58 tenha um oligossacarídeo O-ligado a cadeia polipeptídica e seu seqüenciamento não revelou homologia com outras proteínas conhecidas. Através da técnica de *immunoblotting*, verificou-se que a gp58 é reconhecida por 81% dos soros de pacientes com PCM que foram testados.

Gómez e colaboradores (1997) usaram anticorpos monoclonais para detectar um antígeno de 87kDa no soro de pacientes com PCM por um ELISA inibitório o qual demonstrou 80,4% de sensibilidade. Esse ensaio foi utilizado para o seguimento de pacientes com PCM e foi verificado que os níveis do antígeno de 87kDa decresceram após a terapia antifúngica (Gómez et al., 1998). Ensaio ELISA e de imunofluorescência com um anticorpo monoclonal confirmaram que esse antígeno é expresso em níveis mais altos na fase de levedura do que na de micélio (DIÉZ et al., 2002).

O gene que codifica uma proteína de 27kDa de *P. brasiliensis* foi clonado, seqüenciado e caracterizado como codificador de uma cadeia peptídica de 259 aminoácidos e uma massa molecular de 28,6kDa (McEWEN et al., 1996). Este fragmento de DNA clonado foi expresso em *Escherichia coli*, e a proteína recombinante foi utilizada em um teste imunoenzimático (ELISA) indireto para o diagnóstico da PCM. Este teste proporcionou alta sensibilidade, porém houve reatividade cruzada com soros de pacientes com histoplasmose e aspergilose (ORTIZ et al., 1998). Diéz e colaboradores (2003) desenvolveram um teste ELISA indireto para a detecção de anticorpos específicos na PCM utilizando a combinação dos antígenos de 27 e 87kDa purificados, o que proporcionou um aumento expressivo na sensibilidade e especificidade do teste quando comparados aos resultados obtidos utilizando as proteínas separadamente. A proteína recombinante de 27kDa já foi utilizada também em um ensaio *dot*

*blot*, e as amostras de soros dos pacientes com PCM reconheceram a proteína recombinante, demonstrando uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98% (CORREA et al., 2007). Aparentemente, não há nenhum estudo na literatura discutindo a participação ou o papel desta proteína nos processos de interação parasita-hospedeiro.

Diniz e colaboradores (1999) realizaram o fracionamento de antígenos solúveis de *P. brasiliensis* por cromatografia líquida de proteínas (FPLC). Com esta metodologia, foi possível a obtenção de sete frações com múltiplas bandas protéicas, cujos pesos moleculares variavam de 18 a 114kDa, sendo identificadas como F0, F1, FII, FIII, FIV, FV e FVI. Somente a fração VI não foi reconhecida pelo soro de pacientes com PCM no ensaio ELISA. O mesmo estudo demonstrou que as frações FIII e FV estimulam a resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com PCM. Dois anos depois, o mesmo grupo mostrou que as frações FII e FIII aumentavam a formação de granuloma *in vitro*, associada ao aumento da produção de TNF- $\alpha$  e decréscimo na produção de NO. Já a fração F0 causou decréscimo na proliferação celular, formação de granuloma e aumento na produção de IL-10 e de NO (DINIZ et al., 2001).

Panunto-Castelo e colaboradores (2003), mostraram a presença de diferentes bandas no exoantígeno do isolado BAT de *P. brasiliensis*, reagentes com IgG de soros de pacientes com PCM ativa. As bandas de 70 e 160kDa e a correspondente a gp43 foram as que apresentaram maior reconhecimento pelo soro dos pacientes.

Um antígeno de 61kDa, reativo com soros de pacientes com PCM, foi descrito por Moreira e colaboradores (2004), que identificaram como sendo uma catalase, cuja síntese aumenta durante a transição de micélio para levedura. Este fato sugere que esta proteína participe do mecanismo de defesa de *P. brasiliensis* contra mecanismos de morte dependentes de oxigênio.

Andreotti e colaboradores (2005) isolaram uma adesina de *P. brasiliensis* de 30kDa com a capacidade de se ligar a laminina. Esta proteína foi mais expressa em isolados de *P. brasiliensis* que possuem uma maior capacidade de adesão. Ainda neste mesmo trabalho foi verificado que o tratamento de células epiteliais em cultura com as adesinas de laminina de *P. brasiliensis*, de 30 e 43kDa, inibem a adesão deste fungo às células epiteliais.

Reis e colaboradores (2005) analisaram a resposta humoral de pacientes com PCM frente a antígenos de membrana e extracelulares (MEXO) do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*. Neste trabalho foi observado que uma proteína de 28kDa foi reconhecida por 100% dos soros dos pacientes e não reagiu com amostras de soros heterólogos testados. Esta proteína foi então purificada, por filtração molecular em FPLC e sistema de fase reversa em HPLC, e sua

reatividade e especificidade de 100% com soros de pacientes foram mantidas. O seqüenciamento desta proteína não revelou nenhuma homologia significativa a outras proteínas de *P. brasiliensis* já descritas ou com outras seqüências já reportadas.

Barbosa e colaboradores (2006) avaliaram a expressão da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) recombinante do *P. brasiliensis* e verificaram que a expressão desta proteína em leveduras é importante para a adesão do fungo às células hospedeiras. A GAPDH se localiza na camada mais externa da parede celular e interage com proteínas da matriz extracelular, tais como laminina, fibronectina, provavelmente desencadeando uma resposta na célula hospedeira no estágio inicial da infecção.

Componentes protéicos de 70kDa e 190kDa têm sido reconhecidos em preparações de exoantígenos do isolado BAT de *P. brasiliensis* submetidos à cromatografia de afinidade em Sefarose-Jacalina [uma lectina ligante de D-galactose extraída das sementes da jaca (*Artocarpus integrifolia*)]. Esta preparação foi então denominada JBE (do inglês: *Jacalin Binding Exoantigen* – traduzido como exoantígeno ligante de jacalina) (COLTRI et al., 2006). Em ensaios de interação de amostras de JBE com esferas de açúcares, JBE apresentou uma afinidade maior por N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc). Como a fração de 70kDa apresentou afinidade por GlcNAc imobilizada, as preparações de exoantígenos foram então submetidas a cromatografia de afinidade em coluna de GlcNAc, passando a ser denominada paracoccina. A paracoccina mostrou-se capaz de se ligar a laminina e induzir a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos murinos estando também envolvida no crescimento fúngico (COLTRI, et al., 2006). Paracoccina e quitina são co-localizadas nas zonas de brotamento de leveduras de *P. brasiliensis*. Ensaios com anticorpos anti-paracoccina têm favorecido uma redução no número de unidades formadoras de colônias (UFC) do *P. brasiliensis*, provocando concomitantemente alterações morfológicas na parede das leveduras (GANIKO et al., 2007).

Xander e colaboradores (2007) descreveram uma molécula de 75kDa que está localizada na superfície de *P. brasiliensis*, principalmente nos sítios de brotamento, e foi identificada como uma proteína secretada com atividade fosfatase. Neste mesmo trabalho, foi também demonstrado que o crescimento fúngico é inibido pelo bloqueio da proteína de 75kDa com anticorpos monoclonais. Leveduras de *P. brasiliensis* opsonizadas por estes anticorpos monoclonais tiveram sua fagocitose por macrófagos murinos facilitada. Além disso, camundongos imunizados passivamente com aqueles mesmos anticorpos monoclonais têm uma redução significativa nas UFCs quando comparados com os controles não infectados.



#### 1.4. Modelos experimentais no estudo da paracoccidioidomicose

Muito do conhecimento sobre a patogenia da PCM no homem foi obtido por meio de observações da infecção experimental em modelos animais. A primeira infecção experimental com *P. brasiliensis* foi realizada por Splendore (1910). Todavia, o primeiro relato bem documentado coube a Montenegro (1927), que observou o desenvolvimento de orquite em cobaias inoculadas com material proveniente de lesões humanas, por via intratesticular. Investigações subseqüentes têm revelado que os modelos experimentais desenvolvidos em camundongos e hamsters têm se mostrado bastante eficazes no estudo da PCM. Por estes modelos, têm sido identificados animais resistentes e susceptíveis a infecção.

Os padrões de resistência e susceptibilidade a doença nos modelos experimentais tem sido relacionados a via de introdução do inóculo no hospedeiro. Camundongos BALB/c infectados via intranasal com a forma micelial de *P. brasiliensis* mostraram-se susceptíveis à infecção (McEWEN et al., 1987). Hamsters experimentalmente infectados com *P. brasiliensis* pela via intratesticular desenvolveram uma doença progressiva e disseminada (IABUKI; MONTENETRO, 1979). Camundongos A/Sn são resistentes, quando infectados intraperitonealmente com *P. brasiliensis*, enquanto camundongos B10.A mostraram-se susceptíveis e desenvolvem uma doença disseminada e fatal (CALICH et al., 1985). O desenvolvimento da infecção nos camundongos A/Sn e B10.A infectados pela via intravenosa (CALICH et al., 1994) e pela via intratraqueal (CANO et al., 1995) foi similar àquela observada quando a via utilizada foi a intraperitoneal. Entretanto, quando estes mesmos camundongos foram infectados pela via subcutânea, desenvolveram uma resposta imune celular eficiente, mas diferenças no padrão de resistência a PCM não foram observadas (GESZTESI et al., 1999).

Calich e colaboradores (1985) estabeleceram modelos murinos para o estudo da PCM, inoculando pela via intraperitoneal,  $5 \times 10^6$  leveduras do isolado Pb18 (altamente virulento) em 11 diferentes tipos de camundongos isogênicos. Deste estudo, os autores propuseram uma classificação discriminando diferentes padrões de susceptibilidade e resistência à infecção, a saber: 1-Susceptível: linhagens B10.A, B10D2/oSn, B10D2/nSn; 2-Intermediário: BALB/c, C57Bl/10, CBA, C3HeB/Fe; 3-Resistente: C3H/He; 4-Altamente resistente: A/Sn, A/J, DBA/2. Estudos genéticos demonstraram a existência de um gene autossômico dominante (gene *Pbr*) o qual controla a resistência a PCM murina (CALICH et al., 1987).

O controle da infecção por meio de células fagocíticas é evidenciado em modelos murinos. Camundongos resistentes (A/Sn) têm intenso infiltrado de neutrófilos e macrófagos com conseqüente formação de granulomas compactos e destruição maciça de fungos,

indicando o controle da infecção; em camundongos susceptíveis (B10.A) há a presença de grande número de lesões com pouca encapsulação e nenhuma evidência de destruição fúngica (CALICH et al., 1998).

A resistência adquirida a *P. brasiliensis*, é baseada principalmente na resposta imune mediada por células, porém a resposta humoral específica (hipergamaglobulinemia) desenvolve um papel secundário (SINGER-VERMES et al., 1993). O papel das células T na PCM murina foi estudado usando camundongos BALB/c atímicos infectados pela via intraperitoneal com  $5 \times 10^6$  leveduras, do isolado Pb18, o que demonstrou que a susceptibilidade à infecção por *P. brasiliensis* nesses camundongos foi exacerbada. Estes camundongos apresentaram uma menor sobrevida pós-infecção, e uma doença mais grave quando comparados aos camundongos eutímicos (BURGER et al., 1996a). O papel dos subgrupos de células T também foi investigado em um estudo de depleção das células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup>. Este estudo mostrou que nos camundongos B10.A a depleção de células T CD4<sup>+</sup> não alterou a gravidade da doença e a anergia da imunidade celular, mas diminuía a produção de anticorpos. Por outro lado, a depleção de células T CD8<sup>+</sup>, nos camundongos B10.A, levou a um aumento da carga fúngica, mas restaurou a resposta DTH (hipersensibilidade do tipo tardio) e a produção de anticorpos. Nos camundongos A/J, foi mostrado que ambas as células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> controlam a carga fúngica, mas que somente as células CD4<sup>+</sup> regulam a reação DTH e a produção de anticorpos. Os autores concluíram que carga fúngica em ambos os camundongos é controlada principalmente pelas células CD8<sup>+</sup>, porém a produção de anticorpos e a reação DTH são controladas pelas células CD4<sup>+</sup>. Além disto, células CD4<sup>+</sup> desenvolvem um papel protetor somente nos camundongos resistentes (CHIARELLA et al., 2007).

A resposta DTH foi avaliada em camundongos A/Sn e B10.A infectados intraperitonealmente com leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*. Foi observado que os camundongos A/Sn apresentaram uma evidente e persistente resposta DTH no curso da infecção. Já os camundongos B10.A apresentaram uma discreta e efêmera resposta DTH. (FAZIOLI et al., 2004).

O papel dos macrófagos na resistência à PCM foi evidenciado pelo bloqueio funcional destas células a partir de um estudo em que camundongos B10D2/oSn e A/Sn foram inoculados com carbono coloidal, seguido (após 24 horas) de infecção intraperitoneal com *P. brasiliensis*. Estes procedimentos favoreceram um aumento da susceptibilidade em ambos os camundongos estudados, com um conseqüente agravamento da disseminação das lesões e da mortalidade dos animais (KASHINO et al., 1995).

O papel do óxido nítrico (NO) tem sido considerado relevante na patogenia da PCM murina (GONZÁLEZ et al., 2000). Macrófagos de camundongos B10.A infectados via intraperitoneal com *P. brasiliensis* ( $5 \times 10^6$  leveduras do isolado Pb18) produziram níveis de NO mais altos e persistentes do que macrófagos de camundongos A/Sn. Entretanto, camundongos NO sintase (NOS2)-deficientes foram mais susceptíveis a infecção, o que sugere que NO é essencial para a resistência a PCM, sendo sua superprodução associada à anergia celular (NASCIMENTO et al., 2002).

Para a avaliação da resposta humoral, anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* têm sido avaliados pelos métodos ELISA e *immunoblotting* no curso da infecção experimental em camundongos.

Singer-Vermes e colaboradores (1993) infectaram pela via intraperitoneal camundongos B10.A e A/Sn com  $5 \times 10^6$  leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* e verificaram que ambas as linhagens de camundongos apresentaram altos níveis de anticorpos específicos no início da infecção, mas, após 16 semanas de infecção, camundongos A/Sn tiveram uma queda nos níveis de anticorpos e os camundongos B10.A continuaram a aumentar a produção de anticorpos, com diferenças significativas entre as duas linhagens.

Em um estudo da resposta anticórpica durante a PCM experimental, camundongos B10.A produziram níveis mais altos de IgM anti-*P. brasiliensis* durante as fases precoces da infecção e níveis altos de IgG específica durante a progressão da doença. Camundongos A/Sn apresentaram níveis baixos do anticorpo IgG durante todo o curso da infecção e demonstraram um pico tardio de IgM com 16 semanas de infecção (CALICH et al., 1994).

Kashino e colaboradores (2000) infectaram camundongos B10.A e A/Sn pela via intraperitoneal, com  $5 \times 10^6$  leveduras do isolado Pb18, analisando a reatividade dos anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA específicos em amostras de soro coletados na 1ª, 2ª, 4ª e 16ª semanas após a infecção. Nenhuma diferença foi observada na primeira semana de infecção, onde ambas as linhagens produziram principalmente anticorpos IgM específicos. Nas 2ª, 4ª e 16ª semanas ambas as linhagens produziram níveis altos e equivalentes do anticorpo IgG1. Os camundongos resistentes produziram níveis significativamente mais altos do anticorpo IgG2a na 2ª, 4ª e 16ª semanas após a infecção, quando comparados com aqueles produzidos por camundongos B10.A. Já os camundongos B10.A produziram níveis significativamente mais altos do anticorpo IgG2b na 2ª semana, e de IgA na 4ª e 16ª semanas após a infecção com *P. brasiliensis*.

Outro estudo mostrou que quando camundongos B10.A e A/Sn foram infectados pela via intratraqueal com  $1 \times 10^6$  leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, os resultados

foram semelhantes aos daqueles obtidos com a infecção via intraperitoneal. Os níveis dos anticorpos IgG2a e IgG3 foram significativamente mais elevados nos camundongos A/Sn do que os observados nos camundongos B10.A. Contrariamente, os camundongos B10.A produziram níveis do anticorpo IgG2b específicos significativamente mais elevados do que aqueles encontrados nos camundongos A/Sn na quarta semana de infecção (CANO et al., 1995).

Em resumo, resistência na PCM experimental está associada com uma resposta preferencial do tipo Th1, e a susceptibilidade experimental está associada com um padrão predominante do tipo Th2 (FAZIOLI et al., 1994; CANO et al., 1995; CALICH; KASHINO, 1998). Uma produção sustentada de IFN- $\gamma$  e IL-2 e uma predominante produção de anticorpos IgG2a estão associadas à resistência ao *P. brasiliensis*. Em contraste a produção de baixos níveis de IFN- $\gamma$ , secreção precoce de altos níveis de IL-5 e IL-10, eosinofilia, e secreção preferencial dos isotipos IgG2b e IgA caracterizam a doença progressiva nos camundongos susceptíveis (CANO et al., 1998; KASHINO et al., 2000).

O padrão de reconhecimento específico dos anticorpos dos camundongos B10.A e A/Sn no curso da PCM experimental foi avaliado por *immunoblotting*, utilizando um exoantígeno do isolado B339 de *P. brasiliensis*. Os soros dos camundongos B10.A e A/Sn reconheceram 51 bandas antigênicas com massa molecular aparente de 8-86kDa, dezesseis bandas foram constantemente observadas e então definidas como bandas principais. A gp43 foi o componente imunodominante, o padrão de reconhecimento pelo anticorpo IgG foi similar entre as linhagens de camundongos, com uma alta frequência durante todo o período observado. Contrariamente, diferenças nas respostas de IgM foram detectadas nos camundongos B10.A quando comparados aos camundongos A/Sn, pois os anticorpos IgM dos soros dos camundongos B10.A reconheceram mais bandas antigênicas quando comparados aos dos camundongos A/Sn. A frequência de reconhecimento de IgM para as bandas de 26kDa e 15.5kDa foram mais altas em camundongos susceptíveis, porém, o reconhecimento de IgM para a banda antigênica de 12kDa foi maior nos camundongos resistentes (VAZ et al., 1992).

Burger e colaboradores (1996b) trabalhando com a PCM experimental em camundongos atímicos e eutímicos avaliaram o padrão de reconhecimento antigênico por *immunoblotting* e notaram que o *P. brasiliensis* apresenta algumas bandas antigênicas, incluindo a gp43, que foram reconhecidas por ambos os camundongos (resposta T-independente). Todavia, a maioria das bandas foi reconhecida somente por camundongos

eutímicos (resposta T-dependente), mostrando, assim, que hospedeiros infectados reconhecem principalmente antígenos T-dependentes.

### **1.5. *Calomys callosus* como modelo experimental de doenças infecciosas**

Tem sido observada na América do Sul uma conexão entre a invasão de camundongos e doenças emergentes. Desde 1552, mais de 63 relatos bem documentados na literatura mencionam invasões de roedores acometendo diversas partes da América do Sul. Alguns relatos mostram essa invasão envolvendo a presença do *C. callosus* (JAKSIC; LIMA, 2003). O gênero *Calomys* é composto por roedores da família Cricetidae, amplamente encontrados nas Américas Central e do Sul em diferentes tipos de biomas como em floresta tropical, savana, caatinga, pastagem e área urbana (MELLO, 1981). A biologia desses animais e sua adaptação às condições laboratoriais foram estudadas por diversos autores (PETTER; KARIMI; ALMEIDA, 1967; JUSTINES; JOHNSON, 1970; MELLO, 1981).

Um número crescente de trabalhos tem proposto a utilização do roedor *C. callosus*, RENGGER 1830 (Rodentia, Cricetidae) no estabelecimento de modelos experimentais de doenças infecciosas a partir da inoculação dos animais com *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Schistosoma mansoni*, mostrando, com sucesso, padrões variados de susceptibilidade e resistência a estes microrganismos (BORGES; MELLO; TEIXEIRA, 1982; FAVORETO-JÚNIOR et al., 1998; LENZI et al., 1995). Além disto, o *C. callosus* tem sido identificado como reservatório natural do vírus Machupo (JUSTINES; JOHNSON, 1969) e do *T. cruzi* (RIBEIRO, 1973; MELO, 1982).

Vários estudos foram desenvolvidos usando *C. callosus* como modelo de infecção experimental com *T. cruzi*, causador da doença de Chagas, e sua resposta à inóculos de uma grande variedade de cepas (BORGES; MELLO; TEIXEIRA, 1982; ANDRADE et al., 1994). *C. callosus* experimentalmente infectado com cepas virulentas de *T. cruzi*, como a cepa Y, por exemplo, pode desencadear uma resposta imune potente, a qual controla a replicação do parasita (BORGES; MELLO; TEIXEIRA, 1982; BORGES; CURI; KLOETZEL, 1992). *C. callosus* tem um processo inflamatório precoce com intenso infiltrado inflamatório e fibrogênese, seguidos de uma regressão espontânea do processo inflamatório e da presença de fibrose (MAGALHÃES-SANTOS; SOUZA; ANDRADE, 2002; MAGALHÃES-SANTOS et al., 2004). Borges e colaboradores (1995) verificaram que *C. callosus* infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* tiveram níveis elevados IFN- $\gamma$  mostrando correlação positiva com a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por macrófagos peritoneais e sua associação com o decréscimo da parasitemia. Em outro estudo, observou-se que as lesões inflamatórias foram identificadas

com uma alta expressão de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . A expressão de TGF- $\beta$  coincidiu com a regressão do processo inflamatório e degradação da fibrose (MAGALHÃES-SANTOS; ANDRADE, 2005).

*C. callosus* infectados com doses crescentes da cepa RH de *T. gondii* ( $10^2$  a  $10^6$ ) mostrou-se susceptível à infecção, apresentando-se como um excelente modelo experimental para estudar a fase aguda da infecção por *T. gondii*. Os resultados revelaram que o órgão mais comprometido foi o fígado, seguido do baço, pulmões, intestino, cérebro e rins (FAVORETO-JÚNIOR et al., 1998). Além disso, este animal mostrou-se um excelente modelo de toxoplasmose congênita. Estudo realizado por Ferro e colaboradores (1999) revelou que *C. callosus* transmite toxoplasmose verticalmente na fase aguda, reproduzindo, desta forma, a toxoplasmose humana.

Um estudo realizado por Lenzi e colaboradores (1995) revelou que *C. callosus*, experimentalmente infectados com *S. mansoni*, adquirem a infecção, mas sem o desenvolvimento de inflamação granulomatosa no fígado. *C. callosus* infectados com *S. mansoni* desenvolvem lesões fibrovasculares as quais foram encontradas na subserosa intestinal. Além disso, nódulos intestinais foram observados dos 55 aos 160 dias após a infecção, traduzidos pela presença de novos vasos, fibroblastos e componentes da matriz extracelular. Esses nódulos foram encarados como um modelo de estudo de fibrogênese e angiogênese dependentes de ovos de *S. mansoni* (LENZI et al., 2002).

### **1.5.1. Paracoccidiodomicose experimental em *Calomys callosus***

Berbert e colaboradores (2007) inocularam intraperitonealmente leveduras do isolado Pb18 em *C. callosus*, e camundongos reconhecidos como susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn) a PCM utilizando quantidades variáveis do fungo, a saber:  $0,6 \times 10^5$ ,  $0,6 \times 10^6$ ,  $0,6 \times 10^7$  e  $0,6 \times 10^8$ . Os autores mostraram que os *C. callosus* apresentaram sinais precoces e mais intensos da infecção comparativamente aqueles observados nos camundongos. Em todos os inóculos, os grupos de *C. callosus* apresentaram lesões no fígado, pulmões e baço, sempre com maior gravidade e com presença maciça de fungos, o que levou esses roedores a uma morte precoce em relação aos outros animais. A morte precoce visualizada nos grupos de *C. callosus* nos diferentes inóculos e a presença de grande quantidade de fungos entremeados nas lesões granulomatosas frouxas, sinalizaram para uma grande susceptibilidade desde animal à PCM. Alterações macroscópicas e microscópicas foram proporcionais à dose do inóculo, entretanto as diferenças mais notáveis foram encontradas nos grupos em que a dose de inóculo foi de  $0,6 \times 10^5$  leveduras, em que *C. callosus* apresentaram lesões ainda mais graves

e mais extensas do que aquelas apresentadas pelos camundongos. Amostras de soros foram coletadas após 4 semanas e na fase avançada da infecção. Os níveis de IgG foram então mensurados por ensaio ELISA, sendo que, os *C. callosus* apresentaram níveis do semelhantes aos dos camundongos B10.A em todas as doses de inoculo, nos dois períodos analisados.

Baseado no exposto acima, para entender como os mecanismos imunes operam durante a PCM, é importante caracterizar a resposta imune associada a modelos experimentais que buscam mimetizar a doença no homem. Diante disto, dando seqüência ao estudo do *C. callosus* como modelo experimental para PCM, nos propusemos neste trabalho investigar a dinâmica da resposta humoral, considerando a cronologia da expressão dos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a específicos anti-*P.brasiliensis*, bem como caracterizar os antígenos imunodominantes reconhecidos pelos mencionados anticorpos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a resposta humoral e identificar antígenos dominantes na infecção experimental de *C. callosus* com *P. brasiliensis*, analisando-os comparativamente aos achados observados em camundongos identificados como susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn) a infecção, por meio de ensaio ELISA e *immunoblotting* do antígeno solúvel de *P. brasiliensis* (AgPb).

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) os níveis de anticorpos específicos IgG, IgG1 e IgG2a anti-AgPb em *C. callosus*;
- Determinar por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) os níveis de anticorpos específicos IgG, IgG1 e IgG2a anti-AgPb em camundongos B10.A e A/Sn;
- Identificar os antígenos imunodominantes de *P. brasiliensis* pelo método de *immunoblotting*, reconhecidos pelos anticorpos específicos IgG, IgG1 e IgG2a anti-AgPb produzidos por *C. callosus*;
- Identificar os antígenos imunodominantes de *P. brasiliensis*, pelo método de *immunoblotting*, reconhecidos pelos anticorpos específicos IgG, IgG1 e IgG2a anti-AgPb produzidos por camundongos B10.A e A/Sn;
- Analisar comparativamente os níveis de anticorpos específicos, e os antígenos imunodominantes identificados em *C. callosus*, camundongos B10.A e camundongos A/Sn infectados experimentalmente pelo *P. brasiliensis*.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

*C. callosus* machos, da raça Canabrava, obtidos da colônia mantida pelo Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), foram gentilmente cedidos pela Dra Eloísa A. V. Ferro (Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biomédicas). Camundongos B10.A, classicamente identificados como susceptíveis a infecção, e camundongos A/Sn machos identificados como resistentes a infecção (CALICH et al., 1985) foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade de São Paulo. Todos os animais empregados neste estudo tinham entre oito e 10 semanas de idade no início do experimento. Os animais foram alojados no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia, sendo mantidos sob condições padrões em ambiente com temperatura constante ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), em ciclos de 12/12 h de claro-escuro, recebendo água e ração *ad libitum*.

#### 3.2. Obtenção do inóculo de *Paracoccidioides brasiliensis*

##### 3.2.1. Cultivo de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*

Para o cultivo de leveduras de *P. brasiliensis* foi utilizado o isolado Pb18, gentilmente cedido pela Dra. Maria Cristina Roque Barreira, do Departamento de Biologia Celular e Molecular de Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). O fungo foi cultivado a temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , em meio de cultura YPD (extrato de levedura 0,5%, peptona 0,05%, D-glicose 1,5%) acrescido de ágar 1,5%.

Após 7 dias de crescimento, o fungo foi removido do meio sólido em halo de segurança com auxílio de alça de platina e transferido para frasco Erlenmeyer devidamente esterilizado, contendo cerca de 5mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. O conteúdo do frasco foi homogeneizado com auxílio de pérolas de vidro até a dissolução dos grumos da cultura. Em seguida, as células fúngicas foram contadas utilizando-se, para tanto, uma câmara de Neubauer (Weber Scientific International, Lancing, Sussex, England) e microscópio epifluorescente (Olympus Mod. BX60, Tokyo, Japan) com objetiva de 20x e ocular de 10x. Para tanto, 10 $\mu\text{L}$  de suspensão da cultura em solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (CALICH et al., 1978) foi inoculada na interface lâmina/lamínula. Tanto a contagem das células totais quanto das células viáveis (fluorescentes) foi realizada considerando os quatro retículos externos, obtendo-se o resultado final a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número total de células contadas (10}\mu\text{L)} \times \text{fator de diluição} \times 1,5 \times 10^4}{\text{Número de quadrantes do retículo}}$$

### 3.2.2. Desenvolvimento da infecção experimental

Foram utilizados um total de 90 animais, sendo 30 *C. callosus*, 30 camundongos B10.A e 30 camundongos A/Sn. Cada grupo foi dividido em 6 subgrupos contendo 5 animais cada.

Os animais foram infectados intraperitonealmente (i.p.) com 250 $\mu$ L de solução PBS contendo  $0,6 \times 10^5$  leveduras do isolado Pb18. O sacrifício foi realizado em seis períodos diferentes, sendo estes aos 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias após a infecção (d.a.i).

Amostras de sangue foram coletadas por punção retro-orbital, utilizando-se para tanto, tubos capilares que eram friccionados na região ocular até seu recolhimento em tubos *ependorf* de dimensões apropriadas. A partir daí, por meio de centrifugação a 720 x g por 10 minutos, os soros foram e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até serem utilizados em análises sorológicas (ELISA e *immunoblotting*).

### 3.3. Análise Histológica

Amostras de pulmões, fígado e baço também foram coletadas para análise histológica, a fim de determinar a presença da resposta inflamatória, a presença do fungo e padrão histopatológico da evolução da infecção.

Para tanto, os órgãos eleitos para análise foram coletados e imediatamente fixados em paraformaldeído (10%) por um mínimo de 24 horas e não mais de 72 horas. Imediatamente, as amostras foram processadas rotineiramente para inclusão em parafina, como descrito a seguir. Fragmentos orgânicos foram desidratados em 5 banhos de álcool absoluto por 1 hora cada, seguido por 2 passagens de 1 hora em xilol. Em seguida, foram submetidos a 2 banhos de 1 hora em parafina, e posteriormente submetidos à inclusão. Após inclusão em parafina, secções histológicas de 4 $\mu$ m de espessura foram obtidas, desparafinadas em xilol, reidratadas em concentrações decrescentes de álcool (absoluto, 95% e 80%), lavadas com água destilada e coradas pelo método da hematoxilina-eosina (MICHALANY, 1990).

Para a identificação do fungo foi utilizada a técnica de metanamina prata de Grocott (MICHALANY, 1990). Depois de hidratadas em água, as lâminas histológicas foram oxidadas em ácido crômico 4%, por 1 hora, e lavadas em água corrente. Em seguida os cortes foram tratados em bissulfito de sódio 1%, durante 1 minuto, e novamente lavados e incubados em solução de metanamina-nitrato de prata, por 1 hora, à  $60^\circ\text{C}$ . Após nova lavagem, seguiu-se o tratamento dos espécimes com 0,1% de cloreto de ouro, por 5 minutos. Os resíduos não oxidados

foram removidos com 2% de tiosulfato de sódio, por 2 minutos, e após novas lavagens, foi realizada a coloração de fundo com o corante verde-luz.

A análise do processo inflamatório foi realizada por meio de avaliação qualitativa e semiquantitativa. A avaliação qualitativa deu-se pelo reconhecimento do tipo de infiltrado inflamatório presente nos cortes. A semiquantitativa foi baseada na estimativa da extensão do comprometimento orgânico pelo processo inflamatório, dada pelo percentual de ocupação deste na área da secção histológica analisada. Estes parâmetros foram avaliados segundo os diferentes tempos de observação e grupos de animais experimentados, procurando evidenciar um padrão de evolução da doença pelo nível de dano tecidual observado.

A identificação do fungo baseou-se na visualização dos seguintes aspectos morfo-tintoriais: célula ovalada ou redonda, com cor preta, podendo ser identificado também como forma em exosporulação. Neste caso, as formas exosporuladas apresentam as mesmas características morfo-tintoriais, dando ao fungo as formas de “roda de leme” ou de “*Mickey-Mouse*”.

### **3.4. Avaliação da reposta humoral e da imunodominância antigênica**

#### **3.4.1. Produção do antígeno solúvel de *Paracoccidioides brasiliensis* (AgPb)**

O AgPb foi preparado segundo Scott e colaboradores (1987) com algumas modificações.

Leveduras do isolado Pb18 foram suspensas em 2mL de PBS estéril contendo os inibidores de proteases aprotinina a 10µg/mL (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, 10820), leupeptina a 50µg/mL (Alexis Biochemicals, código 260-009-M005) e fluoreto de fenilmetilsulfonil a 1,6mM (PMSF - Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código P76260). A seguir, foram realizados 15 ciclos de congelamento e descongelamento em N<sub>2</sub> líquido e banho-maria a 37°C, respectivamente. O extrato antigênico foi então submetido a 6 ciclos de 30 segundos em ultra-som (Thornton, Impec Eletrônica, São Paulo, Brasil) a 40kHz e posteriormente macerado em N<sub>2</sub> líquido. Após esse processo, a suspensão foi clarificada por centrifugação a 20.000 x g por 15 minutos, a 4°C (Centrifuge 5810R; Eppendorf, Hamburg, Germany) O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C, até o momento do uso. O conteúdo protéico dos extratos foi estimado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando como curva padrão de proteína, a soroalbumina bovina (BSA-Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código A8022), em diluição seriada de 0,25mg/mL a 1,5mg/mL. A leitura da reação foi realizada a 595nm em espectrofotômetro (Biomate 3; Termo Scientific, Waltham, USA).

### 3.4.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção e quantificação de IgG, IgG1 e IgG2a específicas para *Paracoccidioides brasiliensis*

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados para determinar os níveis de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a específicos para *P. brasiliensis* em amostras de soros individuais de *C. callosus*, dos camundongos B10.A e A/Sn experimentalmente infectados com  $0,6 \times 10^5$  células fúngicas.

Placas de alta afinidade para ELISA foram sensibilizadas com  $5\mu\text{g/mL}$  do AgPb diluído em tampão carbonato  $0,06\text{M}$  (pH 9,6), overnight, a  $4^\circ\text{C}$ , em câmara úmida. No dia seguinte foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS contendo  $0,05\%$  de Tween-20 (PBS-T) acrescido de  $5\%$  de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo) (PBS-TM  $5\%$ ) por 1 hora à temperatura ambiente. Na etapa seguinte, as placas foram incubadas com amostras de soros diluídas  $1:64$  em PBS-TM  $1\%$ . Após incubação por 1 hora (IgG) ou 2 horas (IgG1 e IgG2a) a  $37^\circ\text{C}$ , foi adicionado o conjugado de cabra anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código A3673) diluído  $1:1000$  em PBS-TM  $1\%$  ou os anticorpos de cabra anti-IgG1 (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código M8770) e anti-IgG2a (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código M4434) de camundongo diluídos  $1:500$  e  $1:250$ , respectivamente em PBS-TM  $1\%$ , foram adicionados e as placas foram incubadas por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . As placas foram incubadas com o anticorpo de coelho anti-IgG de cabra marcado com peroxidase (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, A5420) diluído  $1:5000$  em PBS-TM  $1\%$ , quando necessário (para detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a). Após cada etapa da reação, os poços foram lavados 6 vezes com PBS-T, excetuando-se após o bloqueio em que as placas foram lavadas 3 vezes. A reação foi revelada pela adição do substrato contendo  $0,03\%$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $1\text{mg/mL}$  de orto-fenilenediamina (OPD - Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código P9029) diluído em tampão citrato/fosfato (pH 5,0). A reação foi interrompida pela adição de  $25\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a  $2\text{N}$ , por poço. As densidades ópticas (DO) obtidas foram determinadas em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus; Flow Laboratories, Geneva, Switzerland) a um comprimento de onda de  $492\text{nm}$ . Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Os resultados foram expressos em índice ELISA (IE), onde:  $\text{IE} = \text{média dos valores de DO em cada amostra/valores de corte (cut-off)}$ . Os valores de *cut-off* das reações foram estabelecidos pela média de DO de três amostras negativas mais três desvios padrões. Amostras cujo IE foram acima de  $1,2$  foram consideradas positivas (SILVA et al., 2002).

### 3.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e *immunoblotting*

O AgPb foi submetido à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em gradientes de concentração de 8-22%, sob condições desnaturantes e não redutoras, segundo Laemmli e Favre (1973). Antes da aplicação no gel, a amostra do antígeno de *P. brasiliensis* foi diluída em tampão da amostra 10x (Tris-HCl 500mM, pH6,8, SDS a 10%, azul de bromofenol a 0,25%, EGTA 200mM e sacarose a 20%) e submetida a um aquecimento a 100°C durante 5 minutos. A amostra foi aplicada no gel na quantidade de 20µg para o procedimento de coloração por *Coomassie brillante blue* ou na concentração de 270µg para posterior transferência para a membrana de nitrocelulose. O padrão de peso molecular *Wide Range* (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código S8445) foi incluído paralelamente. O sistema utilizado foi o de eletroforese em mini-gel (Mini-vertical gel electrophoresis unit SE 260; Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, England).

A transferência das proteínas dos géis para membranas de nitrocelulose (0,45µm, Millipore, Bedford, USA) foi realizada de acordo com o método de Towbin, Staehelin e Gordon (1979) utilizando um sistema semi-úmido de transferência (ECL TE 70 Semi-dry Transfer Unit; Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) por 2 horas a uma corrente de 0,8mA por cm<sup>2</sup> de gel. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com a solução de Ponceau S (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA) a 0,5% para a confirmação da eficiência da transferência.

As membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de aproximadamente 3mm de largura e colocadas em canaletas apropriadas para a reação. A seguir, as tiras foram bloqueadas com PBS-TM 5% por 2 horas a temperatura ambiente (T.A.). Subseqüentemente, as tiras foram incubadas por 18 horas com amostras de soros diluídas a 1:200 em PBS-TM 1% T.A. Em seguida, as tiras foram incubadas com o conjugado de cabra anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código A3673) na diluição 1:2000 em PBS-TM 1% por 2 horas a T. A. ou com os anticorpos de cabra anti-IgG1 (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código M8770) e anti-IgG2a (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código M4434) de camundongo diluídos 1:500 em PBS-TM 1% por 2 horas T. A. As placas foram incubadas por 1 hora T. A. com o anticorpo de coelho anti-IgG de cabra marcado com peroxidase (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código A5420) diluído 1:5000 em PBS-TM 1% para a detecção dos isotipos IgG1 e IgG2a. Os procedimentos de lavagens das tiras de nitrocelulose, realizados

após cada etapa da reação, consistem de 3 ciclos de 5 minutos após o bloqueio e 6 ciclos de 5 minutos após as etapas seguintes, sendo que as lavagens foram realizadas com PBS-T.

As tiras foram reveladas pela adição do substrato enzimático que consistiu de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,03% e 10mg/mL de 3,3'- tetrahydrocloro de diaminobenzidina (DAB-Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código D5905) diluído em solução salina tamponada com Tris-HCl 0,02M (pH 7,4). A reação foi com água após um tempo máximo de desenvolvimento de 5 minutos.

As bandas foram analisadas pelo *software* KODAK 1D *Image Analysis* (Eastman Kodak Co., Rochester, EUA) para a obtenção da intensidade das bandas e das massas moleculares, como brevemente descrito a seguir: as membranas blotadas foram escaneadas e então analisadas pelo programa. As linhas (tiras) foram registradas automaticamente e após esse procedimento, foi realizado um ajuste manual da melhor posição das linhas, de forma a permitir uma melhor definição da região com as bandas a serem analisadas. Em seguida, foram definidas as bandas e o programa fez a análise da intensidade de cada banda. Além disso, o programa também realizou o cálculo das massas moleculares, baseado naquelas já conhecidas no padrão de peso molecular.

### **3.5. Análise estatística**

Previamente as análises, todos os dados foram testados para sua distribuição a partir do teste de Kolmogorov-Smirnov (SAMPAIO, 1998). A partir de então, foi utilizado ANOVA para comparação dos níveis de anticorpos específicos considerando cada imunoglobulina avaliada, os diferentes grupos de animais testados e os períodos de infecção. Diante da existência de significância, a análise foi complementada pela realização dos testes para comparação duas a duas (teste de Tukey).

Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o *software* *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA), sendo os resultados significativos quando  $p < 0,05$ .

### **3.6. Normas de biossegurança e considerações éticas**

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005), e também obedecendo os princípios éticos em pesquisa animal recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1996). Este estudo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização Animal (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo número 086/2008 (Anexo 1).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise Histopatológica

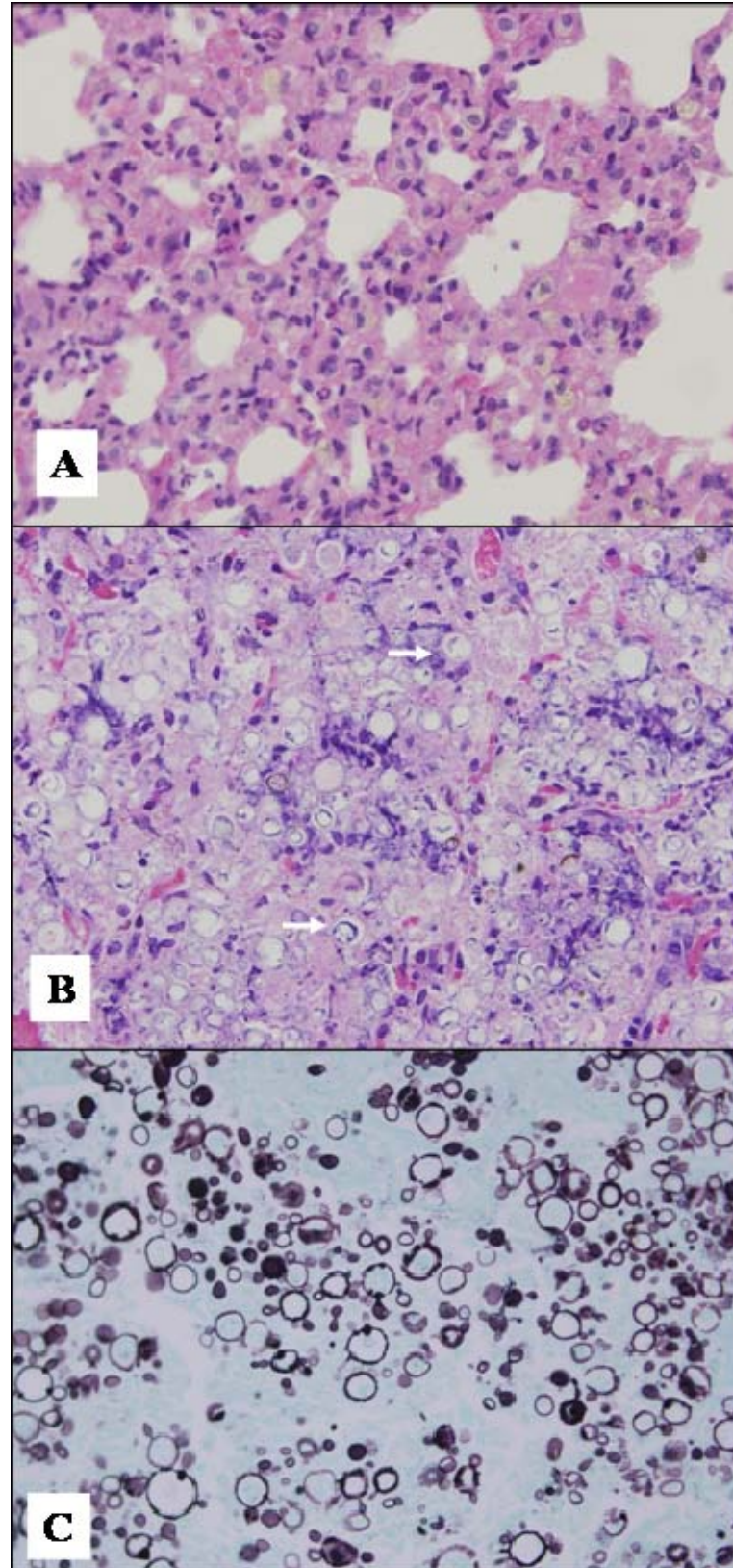
Os achados histológicos variaram conforme o grupo de animal testado, o órgão examinado e o período de observação. Para os *C. callosus*, pneumonite intersticial foi observada precocemente acometendo até 60% do parênquima pulmonar dos 7 aos 60 dias o que diminuiu para cerca de 10% dos 90 aos 120 dias. Granulomas frouxos com microabscessos e eosinófilos foram identificados dos 7 aos 30 dias, ocupando menos de 10% do órgão, aumentando para 10% aos 60 dias e chegando a ocupar até 80% do parênquima pulmonar aos 90 e 120 dias. No fígado, foram identificados um processo inflamatório misto e granulomas multifocais ocupando menos de 10% da área do corte até os 60 dias. A inflamação granulomatosa específica aumentou para 30% da superfície de corte aos 90 e 120 dias. No baço, granulomas foram encontrados a partir dos 15 dias, aumentando gradativamente, atingindo quase 50% do órgão aos 120 dias.

Nos camundongos B10.A a pneumonite intersticial foi observada em todos os períodos investigados, ocupando até 80% do pulmão. Contudo, os granulomas epitelióides foram identificados a partir do 15º dia em menos de 5% do fragmento, o que se manteve até o final do período experimental. No fígado, inflamação foi encontrada a partir dos 7 dias ocupando menos de 5 % da superfície do corte e com pequenas variações ao longo do experimento. Os granulomas puderam ser identificados a partir de 7 dias já ocupando menos de 10% da área do órgão, o que se manteve até o final do período experimental. No baço, granulomas foram encontrados a partir dos 15 dias ocupando uma área inferior a 5%, o que se manteve até os 60 dias. Já aos 90 dias, houve um aumento da inflamação granulomatosa que chegou a ocupar 50% do órgão.

Nos camundongos A/Sn o pulmão foi dominado por pneumonite intersticial difusa, de leve a moderada, que chegou a ocupar cerca de 50% do órgão a partir dos 7 dias, mantendo-se assim até os 120 dias. Granulomas esparsos foram identificados a partir dos 15 dias até aos 60 dias de observação, ocupando, entretanto, menos de 10% do parênquima. No fígado, predominaram focos de infiltrado linfo-histiocitário que ocuparam menos de 10% do órgão, associados a ocasionais microabscessos neutrofílicos e eosinofílicos até 60 dias. Granulomas foram observados aos 7 dias de observação ocupando menos de 5% do órgão o que perdurou até os 60 dias de observação. No baço os granulomas foram observados dos 15 aos 60 dias, atingindo uma área inferior a 10% da superfície de corte.

Em todas as áreas em que os granulomas foram identificados pode-se constatar a presença de células do *P.brasiliensis* em diferentes formas viáveis e inviáveis (Figura 1).





**Figura 1.** Secção histológica do pulmão de *C. callosus* inoculado com  $0,6 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis* (A) 7 dias após infecção: parênquima pulmonar saturado por um infiltrado inflamatório misto (HE, objetiva 40 x). (B) 120 dias após infecção: Granulomas frouxos e coalescentes apresentando coleções de macrófagos permeados por células fúngicas (seta), combinados com focos esparsos de linfócitos (HE, objetiva 40 x) (C) Coloração de Grocott mostrando numerosas leveduras dentro de infiltrado granulomatoso observado aos 120 dias após infecção (objetiva 40 x).

## 4.2. Ensaio ELISA

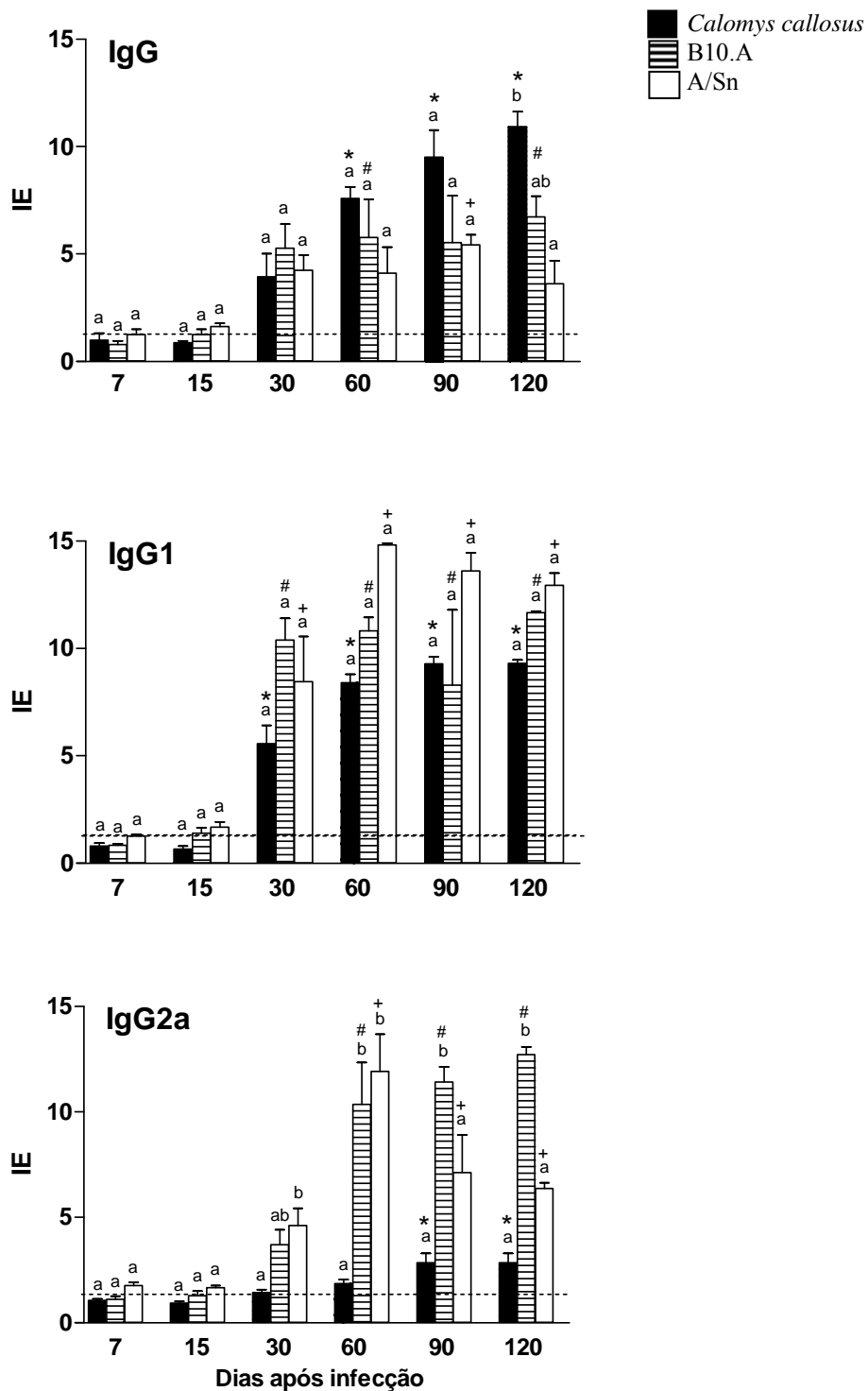
A resposta humoral expressa a partir dos níveis de reatividade específica para os anticorpos IgG total e isotipos IgG1 e IgG2a anti-*P. brasiliensis*, é apresentada na Figura 2.

Analisando os níveis do anticorpo IgG pode-se perceber uma tendência de elevação dos níveis para os camundongos B10.A e *C. callosus* durante o período experimental, sendo mais expressivos neste último grupo. Os níveis de IgG nos camundongos A/Sn foram menores comparativamente aos outros dois grupos. Ademais, os níveis de IgG nos camundongos A/Sn também apresentaram uma tendência de elevação até os 90 dias, que se reduziu no final do experimento. Não obstante, foi observado que entre os *C. callosus* e os camundongos B10.A houve um aumento estatisticamente significativo nos níveis de IgG a partir dos 60 dias após infecção (d.a.i.). Para os camundongos A/Sn, um aumento estatisticamente significativo foi obtido apenas aos 90 d.a.i. ( $p < 0,05$ ). Quando os três grupos foram comparados para cada tempo experimental foi verificado que *C. callosus* apresentou níveis do anticorpo significativamente mais elevados do que os camundongos A/Sn aos 120 d.a.i. ( $p < 0,05$ ).

Quanto aos resultados relativos à IgG1 específica, pode-se perceber níveis mais elevados para os camundongos A/Sn em todo o período de observação, embora houvesse um declínio a partir dos 60 dias, após o qual ocorreu um discreto declínio até os 120 dias. Os menores níveis foram observados para os *C. callosus*, muito embora, para este grupo, foi observada uma elevação constante até o final do experimento. A mesma tendência foi observada nos camundongos B10.A. Uma constante observada foi um aumento abrupto dos níveis de IgG1 específica a partir dos 30 d.a.i., quando os valores foram significativamente mais elevados do que aqueles encontrados nos 7º e 15º dias após a infecção, para os três grupos estudados. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos níveis de IgG1 entre os três grupos de animais quando os valores para cada tempo experimental foram comparados.

Em relação à resposta específica de IgG2a, os menores níveis foram encontrados nos *C. callosus* para todas as análises durante todo o tempo experimental, não obstante o gradativo aumento que se observou do 30º ao 120º dia de observação. Nesses animais, um aumento significativo nos níveis foi encontrado aos 90 d.a.i. ( $p < 0,05$ ). Nos camundongos B10.A os níveis foram elevados e elevaram-se gradativamente até o final do experimento. Diferentemente, no grupo dos camundongos A/Sn um aumento significativo foi observado 60 d.a.i. ( $p < 0,05$ ). Comparando os três grupos, pôde ser notado que os camundongos A/Sn apresentaram níveis significativamente mais elevados de IgG2a que *C. callosus* nos dias 30 e 60 após a infecção, reduzindo-se daí até o 120º dia. Os camundongos B10.A demonstraram

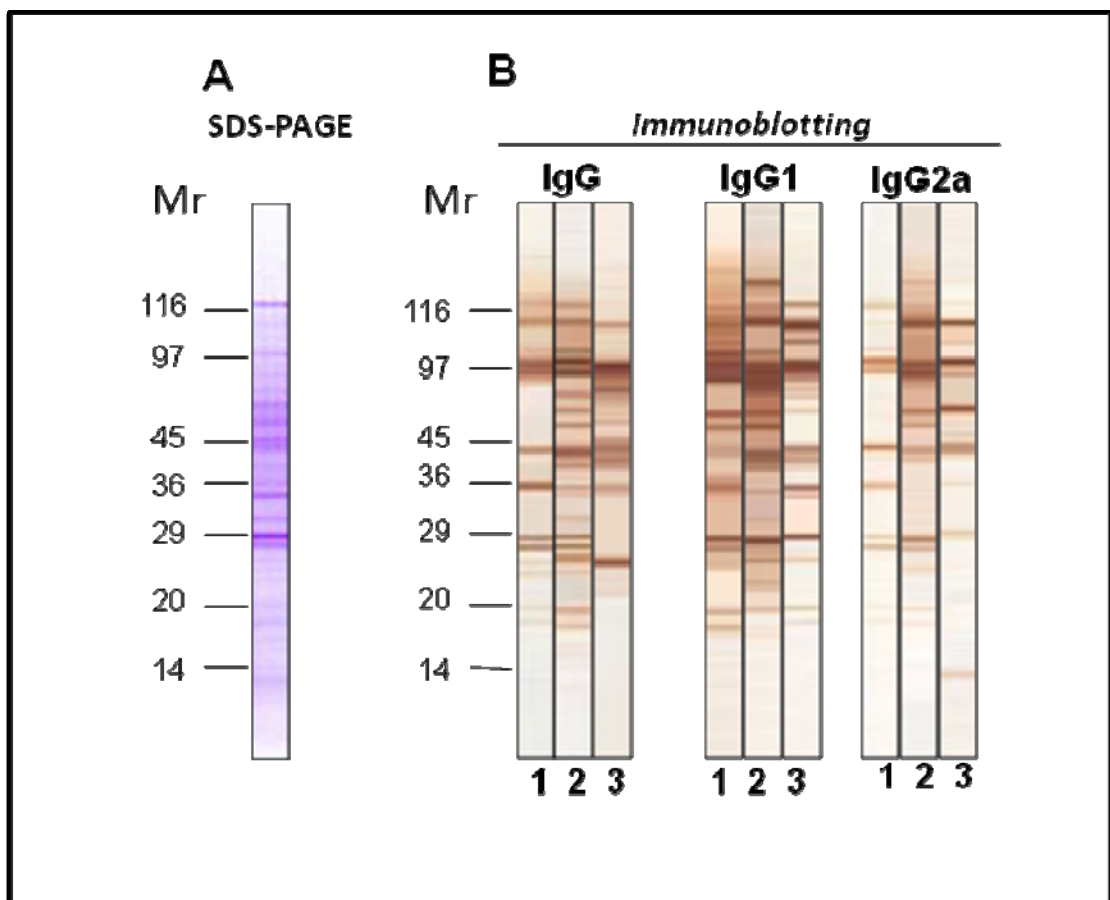
níveis significativamente mais elevados de IgG2a do que *C. callosus* nos dias 60, 90 e 120 dias após a infecção. Finalmente, os camundongos B10.A apresentaram níveis de IgG2a significativamente mais elevados do que os camundongos A/Sn aos 90 e 120 d.a.i. ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Níveis de anticorpos (IgG, IgG1 e IgG2a) específicos a *P. brasiliensis* expressos em Índice ELISA (IE). *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn foram infectados intraperitonealmente com  $0,6 \times 10^5$  leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*. Amostras de soro foram coletadas aos 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias após infecção. Valores são indicados como média  $\pm$  erro padrão da média. A linha pontilhada indica os valores positivos de IE (IE > 1,2). Letras diferentes acima das barras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos dentro do mesmo período ( $p < 0,05$ ). Os símbolos \*, # e + indicam aumento estatisticamente significativo dos níveis de anticorpos, em relação aos 7 dias após a infecção, nos *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn respectivamente ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Perfis protéico e antigênico do antígeno solúvel de *Paracoccidioides brasiliensis*

O perfil protéico do AgPb foi visualizado em SDS-PAGE com gradiente de concentração de 8-22%. Foram visualizados componentes protéicos por toda a extensão do gel com massas moleculares aparentes variando de 13 a 117kDa. No *immunoblotting* foram reconhecidas bandas antigênicas de massas moleculares aparentes variando de 13 a 120kDa. Os soros dos controles negativos não reconheceram nenhuma banda antigênica. A Figura 3 ilustra o padrão de reconhecimento específico dos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a produzidos aos 120 dias após infecção.



**Figura 3.** Perfil protéico do antígeno solúvel de *P. brasiliensis* em SDS-PAGE (8-22%) com marcação por *Coomassie brillante blue* (A) e *Immunoblottings* (B) representativos para os perfis de reconhecimento dos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti- *P. brasiliensis* em amostras de soro de cada grupo experimental aos 120 dias após infecção. *C. callosus* (linha 1), camundongo B10.A (linha 2), e camundongo A/Sn (linha 3). Marcadores de massa molecular (Mr) estão expressos em kiloDaltons (kDa).

A Tabela 1 apresenta as bandas antigênicas, do AgPb, reconhecidas, pelo menos uma vez, pelos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a dos soros de *C. callosus*, e camundongos B10.A e A/Sn.

Todos os isotipos de todos os animais reconheceram as bandas antigênicas com massa molecular aparente de 120, 117, 110, 102, 95-100, 70, 58, 43, 36, 29, 24, 20 e 18kDa. A banda antigênica de 45kDa foi reconhecida pelos anticorpos IgG, IgG1 and IgG2a dos camundongos A/Sn. Quando apenas o anticorpo IgG foi considerado, não foi identificado nenhum antígeno reconhecido exclusivamente para o grupo de *C. callosus*. A banda de 22kDa foi reconhecida apenas pelo camundongo B10.A (frequência de 38%). Por outro lado, as bandas de 105 e 45kDa foram reconhecidas apenas pelos soros dos camundongos A/Sn com frequências de 60% e 43%, respectivamente.

As bandas de 45, e 15kDa foram reconhecidas apenas pela IgG1 dos soros dos camundongos A/Sn (frequência de 43% e 14% respectivamente). Não foi possível detectar nenhuma banda protéica reconhecida especificamente pela IgG1 soros dos *C. callosus* e dos camundongos B10.A.

Com relação aos anticorpos IgG2a, a banda de 45kDa foi detectada apenas pelos soros dos camundongos A/Sn em uma frequência de 39%. Não houve nenhuma banda protéica reconhecida exclusivamente pela IgG2a dos soros dos *C. callosus* e dos camundongos B10.A.

**Tabela 1.** Bandas antigênicas (massa molecular aparente) reconhecidas pelo menos uma vez pelos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a nos soros dos *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn infectados intraperitonealmente com  $0,6 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis*.

Bandas Antigênicas (kDa)	IgG			IgG1			IgG2a		
	C <sup>1</sup>	B <sup>2</sup>	A <sup>3</sup>	C	B	A	C	B	A
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+
117	+	+	+	+	+	+	+	+	+
110	+	+	+	+	+	+	+	+	+
105			+	+		+	+		+
102	+	+	+	+	+	+	+	+	+
95-100	+	+	+	+	+	+	+	+	+
80		+	+		+	+		+	+
70	+	+	+	+	+	+	+	+	+
58	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45			+			+			+
43	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40		+	+		+	+		+	+
36	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33		+	+		+	+		+	+
30	+	+			+	+		+	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+		+		+	+	+	
25		+	+						
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+		+		+	+
22		+		+	+			+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16		+	+	+	+	+		+	+
15		+	+			+		+	+
13	+	+	+	+	+	+	+		+

1. *C. callosus*; 2. Camundongos B10.A; 3. Camundongos A/Sn;  
(+) Bandas reconhecidas

As Tabelas 2, 3 e 4 mostram respectivamente os resultados do reconhecimento antigênico baseado nas bandas reconhecidas por IgG, IgG1 e IgG2a nos diferentes tempos experimentais para cada grupo de animais testado. Nesta análise foi considerado apenas o reconhecimento antigênico observado em pelo menos 50% dos animais testados em cada período analisado.

#### IgG sérica total (Tabela 2)

As bandas antigênicas de 95-100 e 43kDa foram reconhecidas pelos *C. callosus*, e pelos camundongos B10.A e A/Sn dos 30 d.a.i. aos 120 d.a.i. Neste mesmo período, a banda antigênica de 102kDa foi reconhecida nos soros dos *C. callosus* e dos camundongos B10.A, mas não dos camundongos A/Sn. As bandas de 110, 80, 36 e 29 kDa foram comuns aos camundongos B10.A e A/Sn. Além daquelas já citadas acima, no mesmo período, as bandas de 120, 58, 24, 20, 18kDa foram reconhecidas pelos soros dos camundongos B10.A, e as bandas de 70, 45, 40 e 33kDa foram reconhecidas pelos soros dos camundongos A/Sn.

As bandas antigênicas de 28 e 24kDa foram reconhecidas pela IgG total dos soros dos *C. callosus* a partir dos 60 dias persistindo, entretanto, até os 120 d.a.i. Já as bandas antigênicas de 110, 36, 29, 20 e 18kDa foram reconhecidas pela IgG total dos soros de *C. callosus* somente a partir de 90 d.a.i, persistindo, também até os 120 d.a.i. As bandas antigênicas de 117, 40, 30 e 25kDa foram reconhecidas pela IgG total dos soros dos camundongos B10.A somente a partir dos 60 d.a.i., e as bandas de 28, 16 e 15kDa somente a partir dos 90 d.a.i., persistindo o reconhecimento até os 120 d.a.i.

#### IgG1 (Tabela 3)

As bandas de 117, 110, 95-100, 70, 43, 36 e 24kDa foram reconhecidas pelos soros de *C. callosus*, e dos camundongos B10.A e A/Sn, no período de 30 a 120 d.a.i. As bandas antigênicas de 102 e 58kDa foram reconhecidas pelos soros dos *C. callosus* e dos camundongos B10.A, neste mesmo período. As bandas de 80, 40, 29, 20 e 18kDa foram reconhecidas pelos soros dos camundongos B10.A e A/Sn. Considerando-se ainda o período de 30-120 d.a.i., a banda antigênica de 105kDa foi reconhecida pelo anticorpo IgG1 dos soros de *C. callosus* e dos camundongos A/Sn. A banda de 23 somente pela IgG1 dos soros dos *C. callosus*. As bandas de 120 e 33kDa foram reconhecida somente pela IgG1 dos soros dos camundongos B10.A. As bandas de 45, 30 e 13kDa foram reconhecidas pelos anticorpos IgG1 dos soros dos camundongos A/Sn.



Além das bandas antigênicas citadas acima, algumas bandas foram reconhecidas pelos soros dos animais somente a partir dos 90 d.a.i., perdurando até os 120 d.a.i. Essas bandas são: 13kDa nos *C. callosus*; 22 e 16kDa nos camundongos B10.A; e 120kDa nos camundongos A/Sn.

#### IgG2a (Tabela 4)

Dos 30 d.a.i. em diante, as bandas antigênicas de 95-100, 43 e 29kDa foram reconhecidas pelos soros de *C. callosus*, dos camundongos B10.A e A/Sn. Além destas, neste mesmo período, as bandas antigênicas 110, 80, 40 e 36kDa foram reconhecidas pelos camundongos B10.A e A/Sn. Ainda, neste mesmo período, as bandas de 102 e 58kDa foram reconhecidas pelos soros dos camundongos B10.A, e a banda antigênica de 13kDa nos camundongos A/Sn.

Outras bandas antigênicas (110, 102, 36, 28, 20 e 18kDa) foram reconhecidas pelo anticorpo IgG2a dos soros de *C. callosus* somente aos 90 d.a.i., persistindo até os 120 d.a.i. As bandas antigênicas de 117, 70, 30, 24, 20 e 18kDa foram reconhecidas pelos anticorpos IgG2a dos camundongos B10.A somente aos 60 d.a.i., persistindo até aos 120 d.a.i. A banda de 120kDa foi reconhecida pelo anticorpo IgG2a dos camundongos B10.A dos 90 aos 120 d.a.i.



**Tabela 3.** Bandas antigênicas (massa molecular aparente) reconhecidas pelo anticorpo IgG1 em pelo menos 50% dos soros de *C. callosus*, e dos camundongos B10.A e A/Sn, infectados intraperitonealmente com  $0,6 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis*, distribuídas segundo os diferentes animais investigados e os diferentes períodos de observação do experimento (7, 15, 30, 60, 90, 120 dias de infecção).

Bandas (kDa)	<i>Calomys callosus</i>						Camundongo B10.A						Camundongo A/Sn					
	7	15	30	60	90	120	7	15	30	60	90	120	7	15	30	60	90	120
120																		
117																		
110																		
105																		
102																		
95-100																		
80																		
70																		
58																		
45																		
43																		
40																		
36																		
33																		
30																		
29																		
28																		
24																		
23																		
22																		
20																		
18																		
16																		
13																		



A análise da intensidade da reação de reconhecimento das bandas antigênicas foi restrita apenas aquelas que foram reconhecidas por pelo menos 50% dos animais para cada tempo analisado por grupo de animal testado. Procurou-se analisar aquelas bandas comumente identificadas entre os grupos dos animais, considerando os anticorpos IgG1 e IgG2a (Tabelas 5, 6, 7 e Figura 4).

**Tabela 5.** Intensidade média de reatividade de IgG1 e IgG2a específicas com as bandas imunodominantes na infecção experimental dos *C. callosus* com o isolado Pb18 do *P. brasiliensis* distribuídas de acordo com a cronologia de observação do experimento.

Isotipos	Bandas <sup>1</sup> (kDa)	Intensidade média de reatividade <sup>2</sup>				
		15 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
IgG1	117		61,3 ± 15,8	50 ± 16,1	88,4 ± 7,7	89,2 ± 14,9
	110	15,3 ± 4,1	54 ± 6,2	55 ± 18,5	102,4 ± 6,0	92,2 ± 15
	95-100		132 ± 2,2	123 ± 8	138,9 ± 3,5	129,2 ± 4
	70		21,6 ± 6,4	20,1 ± 0,9	63,6 ± 10,2	67,5 ± 13
	43		83,1 ± 16	122,1 ± 2,9	96,4 ± 13,9	95,8 ± 26,9
	36		14 ± 0,8	42,7 ± 21	86,2 ± 20,5	102 ± 15,7
	24		16,4 ± 1,7	50,8 ± 15,5	46 ± 7,7	33,7 ± 11
IgG2a	95-100		47 ± 9,3	43,2 ± 8,4	68,8 ± 9,6	77,4 ± 4,5
	43		28,5 ± 8,5	40,6 ± 8,1	45,1 ± 21,9	34,6 ± 24,8
	29		16,5 ± 2,2	16,7 ± 0,03	48,3 ± 9,3	40 ± 14

1. Foram consideradas as bandas imunodominantes comuns entre os *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn; 2. Os valores são expressos em média ± erro padrão da média.

**Tabela 6.** Intensidade média de reatividade de IgG1 e IgG2a específicas com as bandas imunodominantes na infecção experimental dos camundongos B10.A com o isolado Pb18 do *P. brasiliensis* distribuídas de acordo com a cronologia de observação do experimento.

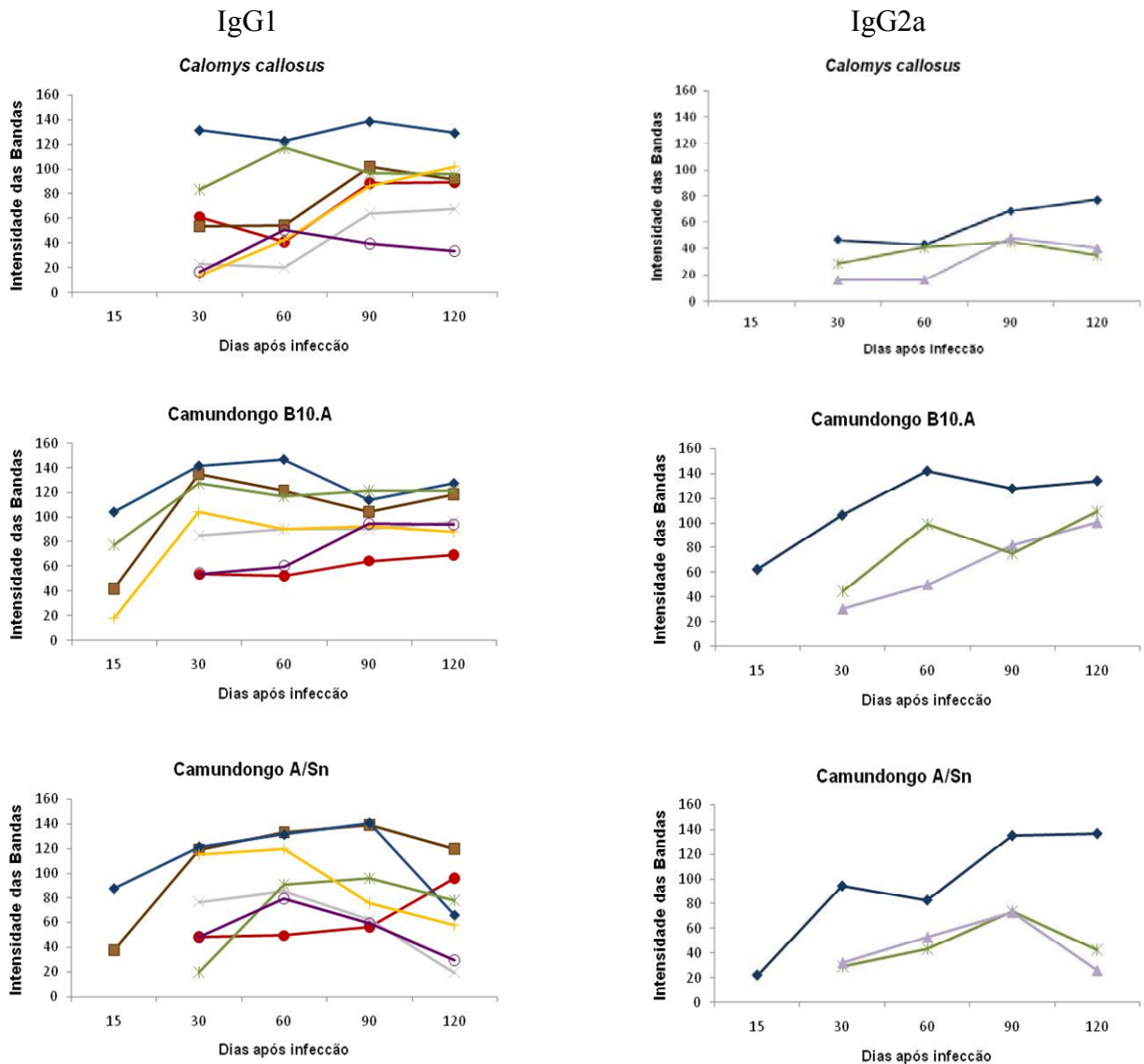
Isotipos	Bandas <sup>1</sup> (kDa)	Intensidade média de reatividade <sup>2</sup>				
		15 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
IgG1	117		53,5 ± 11,1	52,1 ± 14,7	64,4 ± 8,7	69,5 ± 5,3
	110	41,6 ± 21	135 ± 16,8	121,6 ± 18	105 ± 24,2	119 ± 11,4
	95-100	104,5 ± 9,8	141,8 ± 0,9	147 ± 0,8	115 ± 11,1	127,6 ± 4,8
	70		12,9 ± 6,1	69,6 ± 10,7	68,2 ± 18,4	112,9 ± 7,6
	43	77,8 ± 8,3	127,8 ± 5,3	118 ± 14,2	122 ± 13,3	122 ± 13,5
	36	31,7 ± 10,5	105 ± 29,6	90,3 ± 19,0	93,1 ± 20,9	88,1 ± 15,4
	24		54,1 ± 3,5	60,2 ± 15,6	94,6 ± 6,0	93,9 ± 16,6
IgG2a	95-100	62,7 ± 10,5	106 ± 15,7	142,4 ± 4,5	128,1 ± 1,7	134 ± 4,74
	43		30,3 ± 5,53	50,1 ± 16,4	81,8 ± 3,9	100 ± 10,6
	29		44,8 ± 11,7	99,1 ± 1,7	74,8 ± 3,7	109,4 ± 7,7

1. Foram consideradas as bandas imunodominantes comuns entre os *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn; 2. Os valores são expressos em média ± erro padrão da média.

**Tabela 7.** Intensidade média de reatividade de IgG1 e IgG2a específicas com as bandas imunodominantes na infecção experimental dos camundongos A/Sn com o isolado Pb18 do *P. brasiliensis*, distribuídas de acordo com a cronologia de observação do experimento.

Isotipo	Bandas <sup>1</sup> (kDa)	Intensidade de reatividade <sup>2</sup>				
		15 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
IgG1	117		47,8 ± 1	49,1 ± 6,1	56,2 ± 25	95,5 ± 55,5
	110	62,7 ± 18,9	119 ± 17,9	132,5 ± 4,3	138,6 ± 1,6	120 ± 22,4
	95-100	87,2 ± 18,1	121 ± 20,6	131,1 ± 4,8	140,4 ± 1,7	65,7 ± 36,4
	70		76,6 ± 14,2	85,4 ± 10,2	54 ± 20	19,4 ± 5,3
	43		114 ± 11,5	90,7 ± 21,3	95,9 ± 22,6	78,0 ± 17,2
	36		114,8 ± 2,5	120 ± 13,4	75,6 ± 14,0	57,5 ± 10
	24		48,1 ± 48,1	79,6 ± 29,1	29,1 ± 7,5	29,5 ± 8,8
IgG2a	95-100	22 ± 11,2	94,5 ± 17	82,8 ± 11,7	135,6 ± 8,5	137,2 ± 0,8
	43		53,7 ± 14,5	43,4 ± 18,3	73,9 ± 17,1	42,5 ± 14,8
	29		32 ± 13,5	52,7 ± 9,8	72,9 ± 13,5	25,8 ± 8,5

1. Foram consideradas as bandas imunodominantes comuns entre os *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn; 2. Os valores são expressos em média ± erro padrão da média.



**Figura 4.** Intensidade média das bandas antigênicas de 117kDa (—●—), 110kDa (—■—), 95-100kDa (—◆—), 70kDa (—×—), 43kDa (—\*—), 36kDa (—+—), 29kDa (—▲—) e 24kDa (—◇—), reconhecidas pelos anticorpos IgG1 e IgG2a dos soros dos *Calomys callosus*, camundongos B10.A e A/Sn.

Com relação à sororeatividade das bandas antigênicas para IgG1, podemos perceber uma gradativa redução na reatividade para as bandas de 70, 36 e 24kDa para os soros dos camundongos A/Sn. Esta redução foi vista também nos *C. callosus* para a banda de 24kDa. Nestes animais, um tendência de aumento médio de reatividade foi vista para as bandas de 36, 70, 110 e 117kDa. Para os camundongos B10.A, em geral, a tendência observada foi de aumento na intensidade média de reação para todas as bandas imunodominantes do 15º ao 30º dia, após os quais, a tendência foi de relativa estabilidade na intensidade de reação.

Considerando o reconhecimento das bandas antigênicas de 95-100, 43 e 29kDa pela IgG2a, comum aos três grupos experimentais, observamos que a intensidade média de

reatividade foi menor para os soros dos *C. callosus* comparativamente aos soros dos camundongos B10.A e A/Sn. Pode-se observar, entretanto, que uma tendência de aumento médio progressivo se deu apenas com a banda 95-100kDa. Enquanto uma tendência de aumento na intensidade média de reatividade para as bandas de 43kDa e 29kDa nos camundongos B10.A foi identificada dos 30 aos 120 d.a.i., um decréscimo de intensidade média pode ser verificado dos 90 aos 120 d.a.i. para os *C. callosus*, e para os camundongos A/Sn, sendo mais evidente nos camundongos A/Sn.



## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi investigada a resposta humoral ao *P. brasiliensis* em *C. callosus* baseado na reatividade específica para os anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a, procurando, ademais, identificar padrões de reconhecimento antigênico comparativamente aos já descritos para camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn) à infecção. Os *C. callosus* foram mais susceptíveis à infecção por *P. brasiliensis* comparativamente aos camundongos B10.A e A/Sn. Esta susceptibilidade foi caracterizada por uma evolução mais agressiva da infecção naqueles animais. Ademais, os *C. callosus* mostraram os mais baixos níveis de IgG2a específica. Além disso, o anticorpo IgG2a nos soros dos *C. callosus* reconheceu um número menor de bandas antigênicas, cuja reatividade foi menos intensa quando comparadas aos camundongos B10.A e A/Sn.

Em um estudo prévio, foi mostrado que *C. callosus* machos tiveram lesões mais graves do que os camundongos B10.A e A/Sn, quando inoculados com  $0,6 \times 10^5$  leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* (BERBERT et al., 2007). Os achados do presente trabalho suportam aqueles já mencionados previamente, ressaltando-se que nos *C. callosus* houve aumento gradual da intensidade de infecção que foi acompanhada por uma maior gravidade dos danos teciduais. Estes achados foram particularmente notáveis nos pulmões que se constituíram no órgão alvo mais afetado pela infecção, onde houve a presença de granulomas frouxos em até 80% do parênquima no final do experimento. Diferentemente, os camundongos B10.A tiveram um processo inflamatório menos intenso, mas também com a presença de granulomas, sobretudo no baço. Os camundongos A/Sn se apresentaram mais resistentes, com processo inflamatório leve e moderado, mas com pequenos focos granulomatosos ocupando o parênquima dos órgãos até os 60 d.a.i., e com aparente resolução nas últimas fases da infecção (90 e 120 d.a.i.). Diante destes achados, *C. callosus* não só apresentou-se mais susceptível à infecção, mas também se mostra como um bom modelo de estudo da susceptibilidade à infecção e para as lesões pulmonares. Estes achados tornam-se ainda mais expressivos, uma vez que o padrão de resistência e susceptibilidade à infecção por *P. brasiliensis* foi caracterizado em camundongos, B10.A e A/Sn, com uma dose de inóculo maior ( $5 \times 10^6$ ) do que aquela utilizada neste trabalho (CALICH et al., 1985).

O estabelecimento de modelos experimentais de infecção com doses menores de inóculo pode oferecer múltiplas vantagens, tais como: avaliar a presença de susceptibilidade ou resistência, identificar novos aspectos da resposta imune na interação parasito-hospedeiro

dependente da dose do antígeno (inóculo) e redução dos riscos inerentes à manipulação dos inóculos.

Níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a específicos foram mensurados por ELISA. Considerando os títulos do anticorpo IgG específico, pôde-se verificar que os três grupos de animais começaram a produzir níveis mais altos aos 30 d.a.i., entretanto aos 120 d.a.i. nos *C. callosus* houve um nível significativamente mais elevado do que camundongos A/Sn, período em que houve queda nos níveis desse anticorpo. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Singer-Vermes e colaboradores (1993), que identificaram queda nos níveis de Igs específicas no período final da infecção (16 semanas), e uma elevação de seus níveis em camundongos B10.A.

Embora os achados em modelos animais não devam ser encarados como rigorosamente representativos do que acontece no ser humano, é usual considerá-los como parâmetro para avaliação da infecção humana. Nesta, altos níveis de anticorpos específicos e depressão da imunidade celular estão associados com perda da organização do infiltrado inflamatório granulomatoso, acompanhado de grande número de células fúngicas no tecido (MONTENEGRO; FRANCO, 1994). Casos graves de PCM humana mostram ativação policlonal de linfócitos B, com grande número de plasmócitos secretando anticorpos irrelevantes (CHEQUER-BOU-HABIBI et al., 1989).

A fim de aprofundar o estudo da resposta humoral e a sua associação com susceptibilidade e resistência, foram analisados também os níveis dos anticorpos IgG1 e IgG2a. Sabe-se que em modelos murinos a produção de IgG1 é regulada por IL-4, uma citocina de perfil Th2 (SNAPPER et al., 1988) enquanto que a produção de IgG2a é regulada por IFN- $\gamma$ , uma citocina de perfil Th1 (FINKELMAN et al., 1988). Conquanto não haja uma definição clara na literatura sobre esta modulação em todos os modelos animais, os dados de literatura sugerem que a expressão diferenciada destas imunoglobulinas possa representar padrões distintos de resposta imune associados a susceptibilidade (Th2) e resistência (Th1). Com base nesta suposição é que discutimos os nossos achados.

Kashino e colaboradores (2000) estudando a infecção experimental por inóculo intraperitoneal de  $5 \times 10^6$  leveduras do isolado Pb18 em camundongos B10.A e A/Sn não observaram diferenças nos níveis do anticorpo IgG1 específicos entre os animais, que foram altos e equivalentes durante todo o período experimental. Nossos resultados corroboram com os achados descritos acima, pois os camundongos B10.A e A/Sn também apresentaram níveis de IgG1 elevados e semelhantes. Embora a susceptibilidade possa ser um reflexo de um perfil de reação tipo Th2, Calich e Kashino (1998) verificaram que camundongos B10.A e A/Sn

infetados com *P. brasiliensis* não apresentam diferenças significativas quando à secreção de IL-4. Além disso, os autores observaram que a depleção da IL-4 não alterou o curso da doença nos dois grupos de animais, sugerindo que IL-4 não seja a principal citocina associada à susceptibilidade. Quando comparamos estes achados com aqueles observados nos soros dos *C. callosus*, verificamos que estes animais mostram um menor nível de anticorpos comparados aos demais animais, embora com uma tendência de elevação no curso do experimento. Estes achados sugerem que nos *C. callosus* mecanismos de modulação da resposta, semelhantes aos dos camundongos possam estar atuando.

Quanto ao anticorpo IgG2a, seus níveis foram elevados nos camundongos B10.A e A/Sn, principalmente no período de 60 a 120 d.a.i., sendo que no último período experimental, os níveis de IgG2a nos camundongos B10.A foram maiores do que aqueles encontrados nos camundongos A/Sn. Os resultados obtidos no presente trabalho diferem daqueles apresentados por estudos anteriores, nos quais foram identificados que camundongos A/Sn apresentaram níveis mais altos de anticorpos IgG2a específicos do que os camundongos B10.A, quando infectados pela via intraperitoneal (KASHINO et al., 2000) ou pela via intratraqueal (CANO et al., 1995). Entretanto, nestes dois estudos, as doses de inóculo utilizadas foram  $5 \times 10^6$  e  $1 \times 10^6$  respectivamente, que discriminam os camundongos B10.A e A/Sn em susceptíveis e resistentes, respectivamente. Outros estudos deveriam ser considerados para verificar se a dose do inóculo estaria associada a estas diferenças observadas.

A associação de diferentes tipos celulares, citocinas e imunoglobulinas podem levar a alterações na formação e atividade do granuloma com conseqüências diretas sobre a evolução da infecção com *P. brasiliensis*. Recentemente, Marcelino-França e colaboradores (2006) investigaram o papel das células B1 – subtipo de células B localizada nas cavidades pleural e peritoneal –, e demonstraram que elas influenciam na cinética de produção de anticorpos protetores e contribuem para o desenvolvimento de uma resposta Th2 e a susceptibilidade do camundongo na infecção com *P. brasiliensis*. Além disso, tem sido demonstrado que a presença de células B1 desfavorece a fagocitose de *P. brasiliensis* por macrófagos, *in vitro*, via secreção de IL-10 (POPI et al., 2008).

No presente trabalho, mesmo com uma dose menor de inóculo ( $0,6 \times 10^5$ ), *C. callosus* produziram níveis mais baixos de IgG2a específica, o que poderia ser entendido como um comprometimento na reatividade anticórpica vinculada à resistência a infecção. Neste sentido, considerando a dose do inóculo empregado, os camundongos B10.A situar-se-iam num

patamar intermediário de susceptibilidade, enquanto os A/Sn seriam considerados resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis*.

Os resultados observados no presente estudo parecem sugerir que a resposta humoral vinculada a IgG2a estaria vinculada a um papel protetor na infecção. Analisando a resposta dos *C. callosus* baseada nos resultados para IgG2a, observa-se que, embora tenha ocorrido um aumento de seus níveis com a progressão da infecção, estes níveis identificados estiveram sempre muito abaixo daqueles da IgG1 e também marcadamente abaixo daqueles de IgG2a para os camundongos B10.A e A/Sn. Ou seja, é possível admitir que embora haja uma resposta protetora (pela presença de IgG2a), ela não alcança níveis de efetiva proteção nos *C. callosus*. A interpretação destes fatos isoladamente ou apenas associada aos níveis identificados de IgG1 deve ser cautelosa, mas os resultados nos parecem sugerir que quando os animais são infectados com  $0,6 \times 10^5$  leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* os *C. callosus* apresentam-se como altamente susceptíveis à infecção (ou menos resistentes), expressa pela prevalência de um perfil de resposta Th2. Como já mencionado anteriormente, a presença de granulomas frouxos e coalescentes ocupando quase a totalidade das secções histológicas nos órgãos destes animais, descrito aqui, convergem para a possibilidade de admissão desta hipótese.

Para os camundongos B10.A e A/Sn submetidos ao desafio com o mesmo inóculo, os níveis identificados de IgG1 e IgG2a não permitem, aparentemente, caracterizar padrões polares (Th1 ou Th2) de resposta humoral à infecção. Futuros estudos deveriam explorar a identificação do perfil de secreção sistêmica e local de citocinas, bem como a participação das células B1 na mediação dos baixos níveis de IgG2a, particularmente associados a resposta dos *C. callosus*.

Buscando avaliar melhor os antígenos imunodominantes reconhecidos pelos grupos estudados, os soros foram testados pela técnica de *immunoblotting*.

Já foram citadas na literatura diferentes frações antigênicas obtidas por uma variedade de metodologias de extrações empregadas para a avaliação da resposta humoral específica na PCM (CASOTTO, 1990; BLOTTA; CAMARGO, 1993; PANUNTO-CASTELO et al., 2003, FERREIRA et al., 2008). Esta variedade de componentes antigênicos entre os isolados pode, inicialmente, se tornar um obstáculo para o desenvolvimento de novos reagentes e ensaios para o diagnóstico da PCM. Mas, por outro lado, pode também oportunizar o desenvolvimento de investigações que visem identificar o envolvimento específico de cada fração antigênica nos mecanismos da interação entre o fungo e o hospedeiro. Este dado tem particular relevância, pois poderia favorecer a definição de marcadores moleculares da

evolução da infecção nas suas diferentes fases, podendo, conseqüentemente, ser um instrumento auxiliar na caracterização das diferentes formas de expressão clínica da doença com repercussões diretas no aprimoramento terapêutico (CASOTTO, 1991).

No intuito de melhor avaliar o padrão de reconhecimento antigênico no modelo estudado, nós optamos por utilizar o mesmo isolado do inóculo (Pb18) para a produção do antígeno utilizado no ELISA e no *immunoblotting*. Todavia, esta não tem sido a estratégia usualmente empregada neste tipo de estudo. Os autores preferem utilizar vários isolados (*pool*) para a preparação de antígenos para os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), e utilizar outro tipo de isolado diferente do infectante para o estudo de reconhecimento antigênico. Vaz e colaboradores (1998), estudando a PCM experimental em camundongos A/Sn e B10.A induziram a infecção com inóculo de Pb18, mas estudaram o reconhecimento antigênico a partir de antígenos de isolado B339. Os autores justificaram o procedimento reconhecendo que o isolado B339 permite a caracterização de um melhor bandejamento antigênico no *immunoblotting*. Esta justificativa não encontrou eco nos nossos achados, tendo em vista o padrão bem definido de bandas observado nos *immunoblottings*, ilustrados na Figura 3. Ademais, entendemos que, a priori, para desviar de quaisquer vieses associados a especificidades antigênicas dos diferentes isolados, o ideal seria utilizar na análise, um antígeno extraído do isolado infectante.

O antígeno solúvel de *P. brasiliensis* (AgPb) usado no presente trabalho, caracterizou-se por apresentar um grande número de bandas antigênicas reconhecidas pelos soros dos animais infectados, sugerindo que a metodologia empregada na obtenção dos antígenos favorece o reconhecimento de diferentes epítomos, os quais podem ser muito imunogênicos. Este fato torna-se relevante, principalmente se tratando de Pb18, um isolado considerado virulento, com múltiplos antígenos potencialmente envolvidos no processo de interação com o hospedeiro. Além disto, neste processo, a utilização de um isolado mais virulento no desafio pode favorecer uma maior reatividade, o que também parece facilitar o estudo desta interação. Isolados virulentos são realmente mais imunogênicos, fato que foi comprovado por KUROKAWA e colaboradores (2005) que estudaram o perfil de virulência de dez isolados de *P. brasiliensis*, onde camundongos swiss foram inoculados com  $2 \times 10^6$  leveduras, sendo que os camundongos infectados com os isolados virulentos produziram níveis significativamente mais elevados de anticorpos específicos.

Pela nossa revisão, pudemos encontrar apenas três trabalhos relativos ao reconhecimento de componentes antigênicos pelo anticorpo IgG dos soros de modelos murinos experimentalmente infectados com *P. brasiliensis* (VAZ et al., 1992; BURGER et

al., 1996; VAZ et al., 1998), tendo todos eles utilizado o extrato antigênico do isolado B339. Nestes trabalhos, o antígeno de maior peso molecular reconhecido pela IgG específica nos animais foi de 86kDa. No presente trabalho, não só IgG mas também os outros isotipos estudados reconheceram bandas antigênicas com pesos moleculares aparentes mais altos como os de 120, 117, 110, 102, 95-100kDa, e também um espectro de bandas antigênicas de menor peso, tais como as de 70, 58, 43, 36, 29, 24, 20 e 18kDa. Este padrão foi identificado em todos os grupos estudados.

Para fins de descrição e análise dos resultados, foram consideradas apenas as bandas em que a frequência de reconhecimento antigênico se deu em pelo menos 50% dos animais, tanto por grupo, como por período de observação. Essas bandas antigênicas foram então consideradas imunodominantes.

Considerando o padrão de reconhecimento do anticorpo IgG específico, algumas bandas foram imunodominantes para um grupo específico estudado, como as bandas de 120, 58, 24, 20 e 18kDa para os camundongos B10.A e as bandas de 70, 45, 40 e 33kDa para os camundongos A/Sn. No estudo realizado por Vaz e colaboradores (1992) o padrão de resposta da IgG entre camundongos B10.A e A/Sn foi similar, excetuando-se pelas bandas de 68 e 62kDa que foram mais frequentes nos camundongos B10.A e A/Sn respectivamente.

As bandas antigênicas de 95-100 e 43kDa foram imunodominantes para as duas linhagens de camundongos estudadas e também para os *C. callosus*. Desta forma, esses antígenos não parecem associar-se a marcação de resistência ou susceptibilidade, mas sim como marcadores de persistência da infecção, uma vez que já são encontradas nas fases iniciais da infecção e continuam a ser reconhecidas até as fases finais de infecção (120 dias). Para o anticorpo IgG não foram encontradas bandas antigênicas que foram imunodominantes exclusivamente para os *C. callosus*.

Para o padrão de reconhecimento do anticorpo IgG1, as bandas de 120 e 33kDa foram consideradas imunodominantes para camundongos B10.A e as bandas de 45, 30 e 13kDa foram consideradas imunodominantes para os camundongos A/Sn. Entretanto o padrão de reconhecimento antigênico foi bastante similar para os três grupos de animais, onde um número maior de bandas antigênicas (117, 110, 95-100, 70, 43, 36 e 24kDa) foram imunodominantes para os três grupos estudados. Para este anticorpo também não houve nenhuma banda reconhecida exclusivamente pela IgG1 dos soros dos *C. callosus*.

Para o anticorpo IgG2a, a banda de 58kDa foi imunodominante no camundongo B10.A, e as banda antigênica de 13kDa nos camundongos A/Sn. As bandas imunodominantes

comuns para os três grupos foram as de 95-100, 43 e 29kDa. Para os *C. callosus*, houve um menor número de bandas antigênicas reconhecidas pelo anticorpo IgG2a.

O antígeno (banda protéica) de 45kDa foi reconhecido pelos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a somente pelos soros dos camundongos A/Sn, o que pode estar associado a um mecanismo de resistência destes camundongos. Um antígeno de 45kDa foi estudado por Ferreira-da-Cruz e colaboradores (1992), que investigavam o reconhecimento pelo anticorpo IgG de soros de pacientes com PCM aguda e crônica de frações antigênicas de uma antígeno somático, do isolado 192, de *P. brasiliensis*, sendo que este antígeno, reconhecido por 90,6% dos soros dos pacientes com PCM, não tem relação com a gp43, uma vez que o antígeno de 45kDa não é uma glicoproteína.

Não foi possível avançar na discussão destes achados considerando o estado atual do conhecimento, tendo em vista a aparente escassez de trabalhos relacionados ao reconhecimento de bandas antigênicas por subclasses de anticorpos em modelos murinos experimentalmente infectados com *P. brasiliensis*. Porém, Juvenale e colaboradores (2001) estudando a PCM humana, verificaram que anticorpos IgG2 reconheceram a gp43 e bandas antigênicas de alta massa molecular (acima de 94kDa), especialmente em soros de pacientes com a forma crônica que apresentaram alta reatividade pelo anticorpo IgG2 no ELISA. Já o padrão de reconhecimento pelo anticorpo IgG4 foi heterogêneo. Adicionalmente, Ferreira e colaboradores (2008) verificaram, pela técnica de *immunoblotting*, que os antígenos de 19, 27 e 31kDa foram reconhecidos exclusivamente pela IgG1 soros pacientes com a forma aguda da PCM.

Procurando fazer um paralelo entre estes achados e aqueles observados nos modelos animais avaliados no presente estudo, pudemos identificar que achado semelhante foi observado considerando as bandas reativas para IgG2a. Chama atenção o fato de que nos animais considerados susceptíveis, apenas as bandas de 102 e 28kDa (*C. callosus* e B10.A) foram reativas para IgG2a. Estes resultados impõem uma investigação sobre o seu significado tendo em vista que IgG2a está associada a uma modulação por IFN- $\gamma$ , sugerindo portanto um perfil de resposta tipo Th1 (resistente a infecção), aparentemente incompatível com o animal susceptível à doença.

No presente trabalho, foram analisadas também as intensidades das bandas imunodominantes que tiveram reconhecimento comum pelos anticorpos IgG1 e IgG2a presentes nos soros dos *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn. O reconhecimento antigênico pelo anticorpo IgG1 apresentou intensidades de reatividades em geral semelhantes para os três grupos de animais. Quando a análise do reconhecimento das bandas foi realizada

a partir da intensidade de reatividade para os diferentes antígenos reconhecidos pelo anticorpo IgG2a (95-100, 43 e 29kDa), observamos que a intensidade de reação para os *C. callosus* foi mais baixa. Não conseguimos nenhuma explicação para este fato baseado no que a literatura discute para a PCM experimental. Entretanto, poderíamos questionar se estes resultados não refletem um padrão de reatividade humoral específica que está vinculada a uma deficiência de reconhecimento antigênico e da ativação celular, compatíveis com menor resistência à infecção. Poderiam estes antígenos determinar um padrão de reconhecimento antigênico e de perfil Th2 de resposta nos *C. callosus*? Estes resultados merecerem maior aprofundamento com metodologia apropriada.

Dentre o conjunto de bandas antigênicas já relacionadas ao antígeno utilizado, apenas as de 70, 58, 45, 43 e 30kDa já foram discutidas como tendo uma importância biológica reconhecida. A gp70 é capaz de inibir a atividade de macrófagos e facilita o estabelecimento e progressão da infecção. Esta banda foi reconhecida como imunodominante para os três animais a partir do reconhecimento pela IgG1 específica. Neste caso, é interessante notar que esta reatividade declinou durante a evolução do experimento para os camundongos A/Sn, contrariamente do que ocorreu para os camundongos B10.A e *C. callosus* para os quais a intensidade média de reatividade aumentou dos 30 aos 120 d.a.i. Estes achados poderiam refletir uma identificação com susceptibilidade à infecção, embora não haja também nenhum dado objetivo neste trabalho que possa confirmar esta suposição.

A gp43 é o principal antígeno de *P. brasiliensis* (PUCCIA et al., 1986), tem sido usado como instrumento de diagnóstico e avaliação da evolução da infecção humana (CAMARGO et al., 1991; MARQUES-DA-SILVA et al., 2004). Um estudo realizado com camundongos Swiss infectados com  $1 \times 10^5$  leveduras do isolado Pb18, demonstrou associação entre a presença de granulomas frouxos nos pulmões e no fígado e altas concentrações de IgG anti-gp43, e a presença de gp43 solúvel no plasma. Tais achados podem ser explicados pelo fato da gp43 estar associada à mecanismos de evasão do fungo, inibindo a atividade de macrófagos (POPI et al., 2002; KONNO et al., 2008). Embora os *C. callosus* possam reconhecer a gp43 pelos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a, a presença de intensidade baixa de reatividade para IgG2a pode sugerir que os animais não seriam estimulados eficientemente para produção de anticorpos protetores, reforçando a idéia do modelo de susceptibilidade.

Os demais antígenos ainda não têm sua importância biológica conhecida, apesar de já serem descritos por outros autores (BLOTTA; CAMARGO et al., 1993; CASOTTO et al., 1990; CASOTTO et al., 1991; CAMARGO et al., 1991; JUVENALE et al., 2001, PANUNTO-CASTELO et al., 2003; FERREIRA et al., 2008 ). Nesses trabalhos, muitas



vezes, houve uma baixa frequência de reconhecimento pelos anticorpos dos soros dos pacientes e ou dos animais experimentalmente infectados. Tal fato pode ter ocorrido pelo uso de isolados diferentes para a preparação dos extratos antigênicos. Vaz e colaboradores (1998) demonstraram que antígenos de mesma massa molecular, mas de isolados diferentes podem expor epítomos diferentes que podem ser mais imunogênicos ou não, dependendo do isolado utilizado. Além disso, essas diferenças obtidas pelos outros autores podem ser devido a diferenças no processo de glicosilação que é dependente do isolado e do substrato no qual o fungo foi cultivado (BLOTTA; CAMARGO et al., 1993).

Finalmente, nossos resultados fortalecem aqueles já descritos previamente por Berbert e colaboradores (2007) demonstrando que os *C. callosus* apresentam maior susceptibilidade a infecção por *P. brasiliensis* com um alto grau de danos teciduais associados aos baixos níveis de anticorpos IgG2a específicos e um menor reconhecimento de componentes antigênicas, com uma menor intensidade, por este anticorpo, quando inoculados com  $0,6 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis*.

## 6. CONCLUSÕES

- *Calomys callosus* apresentam uma resposta humoral direcionada para o perfil Th2 com secreção de altos níveis de IgG1 e baixos níveis de IgG2a específicos.

- As bandas (antígenos) imunodominantes comuns aos os três grupos de animais reconhecidas pela IgG1 foram as de 117, 110, 95-100, 70, 43, 36 e 24kDa e as reconhecidas pela IgG2a foram as de 95-100, 43 e 29kDa.

- Os anticorpos IgG2a presentes nos soros dos *C. callosus* reconheceram um menor número de bandas antigênicas e com uma menor intensidade do que nos camundongos B10.A e A/Sn.

- Aparentemente, não foi possível identificar banda ou bandas antigênicas ou um padrão específico de reatividade antigênica marcador de susceptibilidade à infecção pelos *C. callosus*, comparativamente a infecção desenvolvida nos camundongos resistentes e susceptíveis.

- Os achados histopatológicos e os dados relativos à reatividade antigênica identificados para IgG1 e IgG2a específicas anti-*P. brasiliensis* obtidos por ELISA e *immunoblotting* suportam a tese de que *C. callosus* infectados com  $0,6 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis* se comportam como animais susceptíveis à infecção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBORNOZ, M.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 9, n. 3, p. 248-253, 1971.

ALMEIDA, O.P.; JACKS, J.Jr.; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, Alexandria, v. 14, p. 377-383, 2003.

ANDRADE, S.G.; KLOETZEL, J.K.; BORGES, M.M.; FERRANS, V.J. Morphological aspects of the myocarditis and myositis in *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: fibrogenesis and spontaneous regression of fibrosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 379-393, 1994.

ANDREOTTI, P.F.; MONTEIRO, D.A.; SILVA, J.L.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M.; BENARD, G.; SOARES, C.P.; MENDES-GIANNINI, M.J. Isolation and partial characterization of a 30kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 7, n. 5-6, p. 875-881, 2005.

ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 11, p. 5587-5591, 1998.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K.I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; CAMARGO, Z.P.; GOMES, G.M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 58, n.4, p. 505-512, 1998.

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

BARBOSA, M.S.; BÁO, S.N.; ANDREOTTI, P.F.; DE FARIA, F.P.; FELIPE, M.S.; DOS SANTOS FEITOSA L.; MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, C.M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infection and immunity**, Washington, v. 74, n. 1, p. 382-389, 2006.

BERBERT, A. L.C.V.; FARIA, G.G.; GENNARI-CARDOSO, M.L.; SILVA, M.M M.D.; MINEO, J.R.; LOYOLA, A.M. Histological and serological evidence of experimental paracoccidioidomycosis in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 55-62, 2007.

BERNARD, G.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; JUVENALE, M.; MIRANDA, E.T.; DUARTE, A.J. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 175, n.5, p. 1263-1267, 1997.

BERNARD, G.; DUARTE, A.J. Paracoccidioidomycosis: a model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection on the natural history of endemic tropical diseases. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 31, n.4, p. 1032-1039, 2000.

BERNARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 165, n. 4-5, p. 209-221, 2008.

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

BORGES, M.M.; MELLO, D.A.; TEIXEIRA, M.L. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) with *Trypanosoma cruzi*. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 233-243, 1982.

BORGES, M.M.; CURI, P.R.; KLOETZEL, J.K. Modulation of parasitemia and antibody response to *Trypanosoma cruzi* by cyclophosphamide in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 1-8, 1992.

BORGES, M.M.; VASSAO, R.; ANDRADE, S.G.; PEREIRA, C.A.; KLOETZEL, J.K. Interferon-gamma levels during the course of *Trypanosoma cruzi* infection of *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) and Swiss mice. **Parasitology Research**, Berlin, v. 81, n. 6, p. 498-504, 1995.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

BURGER, E.; MIYAJI, M.; SANO, A.; CALICH, V.L.G.; NISHIMURA, K.; LENZI, H.L. Histopathology of paracoccidioidomycotic infection in athymic and euthymic mice: a sequential study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, p 235-242, 1996a.

BURGER, E.; VAZ, C.A.C.; SANO, A.; CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.; XIDIEH, C.F.; KASHINO, S.S.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 391-398, 1996b.

CALICH, V.L.G.; PURCHIO, A.; PAULA, C.R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 66, n. 3, p. 175-177, 1978.

CALICH, V.L.; SINGER-VERMES, L.M.; SIQUEIRA, A.M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British Journal of Experimental Pathology**, London, v. 66, n. 5, p. 585-594, 1985.

CALICH, V.L.G.; BURGER, E.; KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; SINGER-VERMES, L.M. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. **Infection and Immunity**, Washington v. 55, p.1919-23, 1987.

CALICH, V.L.; SINGER-VERMES, L.M.; RUSSO, M.; VAZ, C.A.C.; BURGER, E. Immunogenetics in Paracoccidioidomycosis In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; DEL-NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. London: CRC Press, 1994. p. 151-168.

CALICH V.L.; VAZ, C.A.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Research in immunology**, Amsterdam, v. 149, n. 4-5, p. 407-417, 1998.

CALICH, V.L.; KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 615-623, 1998.

CAMARGO, Z.P.; UNTERKIRCHER, C.; TRAVASSOS, L.R. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Abingdon, v. 27, n. 6, p. 407-412, 1989.

CAMARGO, Z.P.; TABORDA, C.P.; RODRIGUES, E.G.; TRAVASSOS, L.R. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Abingdon, v. 29, n. 1, p. 31-38, 1991.

CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C.A.C.; RUSSO, M.; CALICH, V.L.G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, n. 5, p. 1777-1783, 1995.

CANO, L.E.; KASHINO, S.S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C.F.; SINGER-VERMES, L.M.; VAZ, C.A.C.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 2, p. 800-806, 1998.

CASOTTO, M. characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 6, p. 1188-1193, 1990.

CASOTTO, M.; PARIS, S.; CAMARGO, Z.P. Antigens of diagnostic value in three isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Abingdon, v. 29, p. 243-253, 1991.

CASTRO G, MARTINEZ R. Images in clinical medicine. Disseminated paracoccidioidomycosis and coinfection with HIV. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 355, n. 25, p. 2677, 2006.

CAVASSANI, K.A.; CAMPANELLI, A.P.; MOREIRA, A.P.; VANCIM, J.O.; VITALI, L.H.; MAMEDE, R.C.; MARTINEZ, R.; SILVA, J.S. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 177, n. 9, 5811-5818, 2006.

CHEQUER-BOU-HABIBI, D; OLIVEIRA-NETO, M.P.; FERREIRA DA CRUZ, M. F.; GALVÃO-CASTRO, B. The possible role of circulating immune complexes in the deficiency of cell mediated immunity in paracoccidioidomycosis, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brazil, v. 22, n. 2, p. 205-212, 1989.

CHIARELLA, A.P.; ARRUDA, C; PINA, A.; COSTA, T.A.; FERREIRA; R.C.; CALICH, V.L. The relative importance of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, n.9, p. 1078-1088, 2007.

COBEA. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo:Winner, 1996. 259 p.

COLTRI, K.C.; CASABONA-FORTUNATO, A.S.; GENNARI-CARDOSO, M.L.; PIZAN, C.F.; RUAS, L.P.; MARIANO, V.S.; MARTINEZ, R.; ROSA, J.C.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Paracoccin: a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF-alpha production by macrophages. **Microbes and Infection**, Paris, v.8, n. 3, p. 704-713, 2006.

CONTI-DIAZ, I.A.; ALVAREZ, B. J.; GEZUELE, E.; GONZALEZ MARINI, H.; DUATE, J.; FALCON, J. Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 14, p. 362-376, 1972.

CORREA, M.M.; BEDOYA, A.M.; GUERRERO, M.P.; MÉNDEZ, J.; RESTREPO, A.; McEWEN, J.G. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. **Mycoses**, Berlin, v. 50, n. 1, p. 41-47, 2007.

CORTE, A.C.; SVOBODA, W.K.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; MALANSKI, L.S.; SHIOZAWA, M.M.; LUDWIG, G.; AGUIAR, L.M.; PASSOS, F.C.; MARON, A.; CAMARGO, Z.P.; ITANO, E.N.; ONO, M.A. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. **Mycopathologia**, Den Haag v. 164, n. 5, p. 225-228, 2007.

COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 1441-1454, 2002.

D'ANTONIO, G.M.; SPESSOTO J.R.M. Fungos isolados de vegetais relacionados com moléstias infecto-contagiosas na região de Araçatuba (SP - Brasil). **Omnia Saúde**, Adamantina, v. 1, p. 47 -51, 2004.

DÍEZ, S.; GÓMEZ, B.L.; RESTREPO, A.; HAY, R.J.; HAMILTON, A.J. *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 2, p. 359-365, 2002.

DÍEZ, S.; GÓMEZ, B.L.; McEWEN, J.G.; RESTREPO, A.; HAY, R.J.; HAMILTON, A.J. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 4, p. 1536-1542, 2003.

DINIZ, S.N.; CISALPINO, P.S.; KHOURY, M.C.; ANDRADE, G.M.; NOGUEIRA, M.G.; GOES, A.M. *In vitro* human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. **Microbes and Infection**, Paris, v. 1, p. 353-360, 1999.

DINIZ, S.N.; CISALPINO, P.S.; FREIRE, A.T.F.; SILVA-TEIXEIRA, D.N.; CONTIGLI, C.; RODRIGUES, V.; GOES, A.M. *In vitro* granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Human Immunology**, New York, v. 62, n. 8, 799-808, 2001.

DINIZ, S.N.; REIS, B.S.; GOES, T.S.; ZOUAIN, C.S.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, Amsterdam, v. 22, p. 485-492, n. 3-4, 2004.

FAVA-NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arquivos de Cirurgia Clínica e Experimental**, São Paulo, v. 18, p. 197-256, 1955.

FAVORETO-JÚNIOR, S.; FERRO, E.A.V.; CLEMENTE, D.; SILVA, D.A.O.; MINEO, J.R. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 1, p. 103-107, 1998.

FAZIOLI, R.A.; SINGER-VERMES, L.M.; KASHINO, S.S.; BURGER, E.; FRANCO, M.F.; MOSCARDI-BACCHI, M.; CALICH, V.L.G. Delayed-type hypersensitivity response in a isogenic murine model of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 126, n 3, p. 137-146, 1994.

FERREIRA, M.S.; FREITAS, L.H.; LACAZ, C.S.; DEL NEGRO G.M.; DE MELO, N.T.; GARCIA N.M.; DE ASSIS C.M.; SALEBIAN, A.; HEINS-VACCARI, E.M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Abingdon, v. 28, n. 3, p. 253-256, 1990.

FERREIRA, A.P., CÔRREA, T.; CUNHA, R.; MARQUES, M.J.; MONTESANO, M.A.; SOUZA, M.A.; TEIXEIRA, H.C. Human serum antibody reactivity towards *Paracoccidioides brasiliensis* antigens treated with sodium metaperiodate. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 325-329, 2008.

FERREIRA-DA-CRUZ, M.F.; GALVÃO-CASTRO, B.; DANIEL-RIBEIRO, C. Isolation and antigenicity of a 45-kilodalton *Paracoccidioides brasiliensis* immunodominant antigen. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, n. 7, 2667-2671.



FERRO, E.A.; BEVILACQUA, E.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D.A.; MORTARA, R.A.; MINEO, J.R. *Calomys callosus* (Rodentia : Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. **Parasitology Research**, Berlin, v. 85, n. 8-9, p. 647-654, 1999.

FIGUEROA, J.L.; HAMILTON, A.J.; ALLEN, M. H.; HAY, R.J. Isolation and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* 58kDa extracellular glycoprotein which is recognized by human sera. **Transactions of the Royal Society of Tropical and Medicine Hygiene**, London, v. 89, p. 566-572, 1995.

FINKELMAN, F.D.; KATONA, I.M.; MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 140, n. 4, p. 1022-1027, 1988.

FORNAZIM, M.C.; BALTHAZAR, A.; QUAGLIATO, R.Jr.; MAMONI, R.L.; GARCIA, C.; BLOTTA, M.H. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. **The European Respiratory Journal**, London, v. 22, n. 6. p. 895-899, 2003.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILON, M.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 20, n.2, p. 129-132, 1987.

FRANCO, M.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, M.; MONTENEGRO, M.R. Paracoccidioidomycosis. **Baillière's Clinical Tropical Medicine Communicable Diseases**, Inglaterra, v. 4, p. 185-220, 1989.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C.S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 185-191, 2000.

GANIKO, L.; PUCCIA, R.; MARIANO, V.S.; SANT'ANNA, O.A.; FREYMÜLLER, E.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; TRAVASSOS, L.R. Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, n. 6, p. 695-703, 2007.

GARCIA, N. M, DEL NEGRO, G.M.B.; HEINS-VACARI, E.M.; MELO, N.T.; ASSIS, C.M; LACAZ, C.S. *Paracoccidioides brasiliensis*, nova amostra isolada de fezes de um pingüim (*Pygocelis adeliae*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 35, p. 227-235, 1993.

GESZTESI, J.L.; DIAS, M.A.; DE SOUZA, A.R.; DE ALMEIDA, S.R.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. Subcutaneous infection of mice with *Paracoccidioides brasiliensis* induces a peculiar pattern of inflammatory and immune responses. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 145, n. 1, p. 7-14, 1999.

GIRALDO, R.; RESTREPO, A.; GUTIERREZ, F.; ROBLEDO, M.; LONDONO, F.; HERNANDEZ, H.; SIERRA, F.; CALLE, G. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 58, n. 2, p. 63-70, 1976.

GÓMEZ, B.L.; FIGUEROA, J.L.; HAMILTON, A.J.; ORTIZ, B.; ROVLEDO, M.A.; HAY, R.J.; RESTREPO, A. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 12, p. 3278-3283, 1997.

GÓMEZ, B.L.; FIGUEROA, J.L.; HAMILTON, A.J.; DIEZ, S.; ROJAS, M.; TOBON, A.M.; HAY, R.J.; RESTREPO, A. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87kDa determinant during and after antifungal therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 11, p. 3309-3316, 1998.

GONZALEZ, A; DE GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2546-2552, 2000.

GROSE, E.; TAMSITT, J.R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S. A. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 4, n. 2, p. 124-125, 1965.

IABUKI, K; MONTENEGRO, M.R. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: Morphology, ultrastructure and correlation of lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 67, n. 3, p. 131-141, 1979.

JAKSIC, F.M.; LIMA, M. Myths and facts on ratadas: bamboo blooms, rainfall peaks and rodent outbreaks in South America. **Austral Ecology**, Carlton, v. 28, n.3, p. 237-251, 2003.

JUSTINES, G.; JOHNSON, K.M. Immune tolerance in *Calomys callosus* infected with Machupo virus. **Nature**, London, v. 222, n. 5197, p. 1090-1091, 1969.

JUSTINES, G.; JOHNSON, K.M. Observations on the laboratory breeding of the cricetidae rodent *Calomys callosus*, **Laboratory Animal Care**, Baltimore, v. 20, p. 57-60, 1970.

JUVENALE, M.; DEL NEGRO, G.M.B.; DUARTE, A.J.S.; BERNARD, G. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. **Mycology**, Berlin, v. 50, n. 2, p. 127-134, 2001.

KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M.; SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; CALICH, V.L. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 130, n. 3, p. 131-140, 1995.

KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L.H.; VAZ, C.A.C.; BURGER, E.; SINGER, L.M.; CALICH, V.L.G. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, New York, v. 20, n. 1, p. 89-97, 2000.

KONNO A.Y.; MARICATO, J.T.; KONNO, F.T.; MARIANO, M.; LOPES, J.D.; Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* GP43 inhibit macrophage functions and inflammatory response. **Microbes and Infection**, Paris, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009.

KURITA, N.; ORADA, M.; ITO, E.; MIYAJI, M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 261-267, 1999.

KUROKAWA, C.S.; LOPES, C.R.; SUGIZAKI, M.F.; KURAMAE, E.E.; FRANCO, M.F.; PERAÇOLI, M.T.S. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. Association with morphologic and genetics patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 47, p. 257-262, 2005.

KUROKAWA, C.S.; ARAUJO, J.P.; SOARES, A.M.; SUGIZAKI, M.F.; PERAÇOLI, M.T. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 51, n. 4, p. 421-428, 2007.

LACAZ, C.S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology; virulence; taxonomy. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A.; DEL-NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. London: CRC Press, 1994. p. 13-22.

LAEMMLI, U.K.; FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 80, n. 4, p. 575-599, 1973.

LENZI, J. A.; MOTA, E.M.; PELAJO-MACHADO, M.; PAIVA, R.A.; LENZI, H.L. *Calomys callosus*: an alternative model to study fibrosis in schistosomiasis mansoni. The pathology of the acute phase. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 311-318, 1995.

LENZI, J.A; MOTA, E.M.; PELAJO-MACHADO, M.; VALE, L.S.; VALE, B.S; ANDRADE, Z.A.; LENZI, H.L. Intestinal fibrovascular nodules caused by *Schistosoma mansoni* infection in *Calomys callosus* Rengger, 1830 (Rodentia: Cricetidae): a model of concomitant fibrosis and angiogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 117-127, 2002.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na bocca e observada no Brazil: Contribuição ao conhecimento das hypho-blastomycoses americanas. **Brasil-Médico**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 121-141/141-144, 1908.

MAGALHAES-SANTOS, I.F.; LIMA, E.S.; ANDRADE, S.G. Fibrogenesis and collagen resorption in the heart and skeletal muscle of *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: immunohistochemical identification of extracellular matrix components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n.5, p. 703-710, 2002.

MAGALHÃES-SANTOS, I.F.; SOUZA, M.M.; LIMA, C.S.; ANDRADE, S.G. Infection of *Calomys callosus* (Rodentia Cricetidae) with strains of different *Trypanosoma cruzi* biotopes: pathogenicity, histotropism, and fibrosis induction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 4, p. 407-413. 2004.

MAGALHÃES-SANTOS, I.F.; ANDRADE, S.G. Participation of cytokines in the necrotic-inflammatory lesions in the heart and skeletal muscles of *Calomys callosus* infected with *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 5, p. 555-561, 2005.

MAMONI, R.L.; NOUER, S.A.; OLIVEIRA, S.J.; MUSATTI, C.C.; ROSSI, C.L.; CAMARGO, Z.P.; BLOTTA, M.H.S.L. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- $\beta$  in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 153-159, 2002.

MARCELINO-FRANÇA, K.; VERÍCIMO, M.A.; RETAMAL, C.; KIPNIS, T.L.; ARNHOLDT, A.C. B1 cells contribution to susceptibility in experimental paracoccidioidomycosis: immunoglobulin isotypes and repertoire determination. **Medical Mycology**, Oxford, v. 44, n. 8, p. 755-766, 2006.

MARQUES, A.S.; CONTERNO, L.O.; SIGARBI, L.P. Paracoccidioidomycosis associated with acquired immunodeficiency syndrome. Report of seven cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 37, n.3, p. 261-265, 1995.

MARQUES, S.A.; FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; SILVA, N.C.; BACCILI, C.; CURCELLI, E.D.; FERRACIN, A.C.; OLIVEIRA, C.S.; TAGLIARINI, J.V.; DILON, N.L. Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic area of Botucatu (São Paulo-Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 87-92, 1983.

MARQUES-DA-SILVA, S.H.; COLONBO, A. L.; BLOTTA, M.H.S.L.; LOPES, J.D.; QUEIROZ-TELLES, F.; CAMARGO, Z.P. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid and bronchoalveolar lavage of patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 8, p. 3675-3680, 2003.

MARQUES-DA-SILVA, S.H.; MATTOS-GROSSO, D.; LOPES, J.D.; COLOMBO, A.L.; BLOTTA, M.H.S.L.; QUEIROZ-TELLES, F.; CAMARGO, Z. P. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow up of patients undergoing antimycotic therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, n.10, p. 4480-4486, 2004.

MATTAR-FILHO, R.; AZEVEDO, M.O.; PEREIRA, M.; JESUINO, R.S.; SALEM-IZACC, S.M.; BRITO, W.A.; GESZTESI, J.L.; SOARES, R.B.; FELIPE, M.S.; SOARES, C.M.L. Expression of glycoprotein gp43 in stage-specific forms and during dimorphic differentiation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Abingdon, v. 35, n. 5, p. 341-345, 1997.

MATTOS-GROSSO, D.; ALMEIDA, S.R.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 11, p. 6534-6542, 2003.

MAYMÓ -ARGANARAZ, M., LUGUE, A.G.; TOSELLO, M.G.; PEREZ, J. Paracoccidioidomycosis and larynx carcinoma. **Mycoses**, Berlin, v. 46, n. 5-6, p. 229-232, 2003.

McEWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PATIÑO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 165-175, 1987.

McEWEN, J.G.; ORTIZ, B.L.; GARCIA, A.M. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of 27kDa antigenic protein form *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 20, n. 2, p. 125-131, 1996.

MELLO, D.A. Studies on reproduction and longevity of *Calomys callosus* (Renger, 1830) under laboratory conditions (Rodentia, Cricetidae), **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 841-843, 1981.

MICHALANY, J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. 2. ed. São Paulo: Michalany, 1990. 277p.

MINEO, J. R.; SILVA D.A.O.; SOPELETE, M.C.; LEAL, G S.; VIDIGAL, L.H.G.; TÁPIA, L.E R.; BACCHIN, M I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273p.

MONTENEGRO, J. Acerca da inoculabilidade da blastomicose no Brasil, **Revista Brasileira de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 808-12, 1927.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M., Pathology. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. London: CRC Press, 1994. p. 87-106.

MOREIRA, S.F.; BAILAO, A.M.; BARBOSA, M.S.; JESUINO, R. S.; FELIPE, M.S.; PEREIRA, M., ALMEIDA-SOARES, C.M. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. **Yest**, Chichester, v. 21, n. 2, p. 173-82, 2004.

MOSCARDI-BACCHI, M.; SOARES, A.; MENDES, R.; MARQUES, S.; FRANCO, M. *In situ* localization of lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Abingdon, v.27, n. 3, p. 149-158, 1989.

MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D.A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 40, n. 3, p. 159-164, 1994.

NASCIMENTO, F.R.; CALICH, V.L.; RODRÍGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 168, n. 9, p. 4593-4600, 2002.

NEGRONI, P.E. *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente em el suelo argentino. **Prensa Medica Argentina**, Buenos Aires, v. 53, p. 2831-2832, 1966.

OLIVEIRA, S.J.; MAMONI, R.L.; MUSATTI, C.C.; PAPAORDANOU, P.M.; BLOTTA, M.H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, n. 2, p. 139-144, 2002.

ONO, M.A.; BRACARENSE, A.P.; MORAIS, H.S.; TRAPP, S.M.; BELITARDO, D.R.; CAMARGO, Z.P. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Medical Mycology**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 277-282, 2001.

ONO, M.A.; ITANO, E.N.; MIZUNO, E.H.; CAMARGO, Z.P. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: Is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? **Medical Mycology**, Oxford v. 40, p. 493-499, 2002.

ORTIZ, B.L; DIEZ, S.; URAN, M.E.; RIVAS, J.M.; ROMERO, M.; CAICEDO, V.; RESTREPO, A.; McEVEN, J.G. Use of 27kDa recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 5, n. 6, p. 826-830, 1998.

PAGLIARI, C.; SOTTO, M.N. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. **The American Journal of dermatopathology**, New York, v. 25, n. 2, p. 107-112, 2003.

PANUNTO-CASTELO, A.; FREITAS-DA-SILVA, G.; BRAGHETO, I.C.; MARTINEZ, R.; ROQUE-BARREIRA, M.C. *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 13, p. 1205-1211, 2003.

PERAÇOLI, M.T.; SOARES, A.M.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; PEREIRA, P.C.; REZKALLAH-IWASSO, M.T. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Abingdon, v. 29, n. 6, p. 373-380, 1991.

PERAÇOLI, M.T.; KUROKAWA, C.S.; CALVI, S.A.; MENDES, R.P.; PEREIRA, P. C.; MARQUES, S.A.; SOARES, A.M. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 5, p. 413-418, 2003.

PETTER, F.; KARIMI, Y; ALMEIDA, C.R. Un nouveau ranger de laboratoire, lé cricetidé, (Rodentia, Cricetidae). **Compte Rendus de l'Academie de Sciences de Paris**, Paris, v. 265, p. 1974-1976, 1967.

POPI, A.F.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage function. An evasion mechanism of the fungus. **Cellular Immunology**, Orlando, v. 218, n. 1-2, p. 87-94, 2002.

POPI, A.F.; GODOY, L.C.; XANDER, P.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. B-1 cells facilitate *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice via IL-10 secretion. **Microbes and Infection**, Paris, v. 10, n. 7, p. 817-824, 2008.

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

REIS, B.S.; BOZZI, A.; PRADO, F.L.; PEREIRA, M.C.; FERREIRA, F.E.; GODOY, P.; MORO, L.; PEDROSO, E.P.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Membrane and extracellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* (Mexo): identification of a 28-kDa protein suitable for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 20, n. 1-2, p. 118-126, 2005.

RESTREPO, A.M.; SALAZAR, E.; CANO, L.E.; STOVER, E.P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 46, n. 2, p. 346-353, 1984.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, Edinburgh, v.23, p. 323-334, 1985.

RESTREPO, A.M. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; DEL-NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. London: CRC Press, 1994. p. 121-128.

RIBEIRO, R.D. New reservoirs of *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, p. 429-437, 1973.

RICCI, G.; MOTA, F.T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R.C.; BORRA, R.C.; FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 379-383, 2004.



RODRIGUES, D.R.; DIAS-MELICIO, L.A.; CALVI, S.A; PERAÇOLI, M.T.; SOARES, A. M. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 40, p. 3, p. 159-164, 2007.

SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Inhibition by strogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 56, n. 3, p. 711-713, 1988.

SALINA, M.A.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MENDES, R.P.; BARRAVIERA, B.; MENDES- GIANNINI, M.J. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 6, p. 1723-1728, 1998.

SAN-BLAS F, SAN-BLAS G. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; DEL-NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. London: CRC Press, 1994. p. 49-63.

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

SAN-BLAS, G; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 165, n. 4-5, p. 183-195, 2008.

SAMPAIO, I.B. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 1 ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 1213 p.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 139, n. 9, p. 221-227, 1987.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; DUARTE, M.I.; NUNES, D.F.; LACAZ, C.S.; SABAGGA, E., ABDALA E.; DUARTE, A.J.; LOPES, M.H. Paracoccidioidomycosis in a renal transplant recipient. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Abingdon v. 33, n. 6, p. 37-42, 1995.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; FILHO, F.Q.T.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; MORETTI, M.L.; TRESOLDI, A.T.; CARVALHO, C.R.; BERNARD, G.; SEVERO, L.C.; FERREIRA, M.S.; VERGARA, M.L.S.; MARTINEZ, R.; PEDRO, R.J.; MARQUES, S.A.; KHOURY, Z. Consenso em Paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 297-310, 2006.

SILVA, D.A.; SILVA, N.M.; MINEO, T.W.; PAJUABA NETO, A.A.; FERRO, E.A.; MINEO, J.R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 181-195, 2002.

SILVEIRA L.H.; PAES, R.C.; MEDEIROS, E.V.; ITANO E.N.; CAMARGO, Z.P.; ONO, M.A. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Micopathologia**, Den Haag, v. 165, n. 6, p. 367-371, 2008.

SILVA-VERGARA M.L.; MARTINEZ R.; CHADU A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; MAFFEI, C.M.L. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 37-42, 1998.

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. **Clinical and experimental immunology**, Oxford, v. 94, n. 1, p. 75-79, 1993.

SNAPPER, C.M.; FINKELMAN, F.D.; STEFANY, D.; CONRAD, D.H.; PAUL, W.E. IL-4 induces co-expression of intrinsic membrane IgG1 and IgE by murine B cells stimulated with lipopolysaccharide. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 141, n. 2, p. 489-498, 1988.

SPLENDORE, A. Blastomycoses americanas. **Revista Brasileira de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 153-157, 1910.

STRAUS, A.H.; FREYMÜLLER, E.; TRAVASSOS, L.R.; TAKAHASHI, H. K.; Immunochemical and subcellular localization of the 43kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Abingdon, v. 34, n. 3, p. 181-186, 1996.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4356, 1979.

TRAVASSOS, L.R.; PUCCIA, R.; CISALPINO, P.; TABORDA, C.; RODRIGUES, E.G.; RODRIGUES, M.; SILVEIRA, J.F.; ALMEIDA, I.C. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives of Medical Research**, New York, v. 26, n. 3, p. 297-307, 1995.

VAZ, C. A. C.; MACKENZIE, D. W. R.; HEARN, V.M.; SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G.; Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 119-123, 1992.

VAZ, C.C.; SINGER-VERMES, L.M.; CALICH, V.L.G. Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and nonvirulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 6, p. 971-977, 1998.

VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; FRANCO, M.F.; SOUZA, W.; MORARES, J.Z.; TRAVASSOS, L.R.; LOPEZ, J.D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n.4, p. 1465-1469, 1994.

XANDER, P.; VIGNA, A.F.; FEITOSA, L.S.; PUGLIESE, L.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M.; MORTARA, R.A.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, n. 12-13, p. 1484-1492, 2007.

**ANEXO 1.** Protocolo de aprovação do projeto de pesquisa emitido pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Uberlândia.



**Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)**

---

Campus Santa Mônica, Bloco 1J

[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

Telefone: 3239.4531

Uberlândia, 23 de março de 2009

**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que o Comitê de Ética na Utilização de Animais, CEUA, iniciou seus trabalhos de avaliação e monitoração de pesquisas em janeiro de 2008. Portanto, o projeto intitulado “Desenvolvimento de modelo experimental para paracoccidiodomicose em Cricetídeos: estudo comparativo com a infecção em camundongos resistentes e susceptíveis à doença”, cujo responsável é o Dr. Adriano Mota Loyola, quando iniciado, em 2006, não possuía um comitê para analisá-lo. Contudo, após avaliação do projeto, o CEUA informa que o protocolo encontra-se aprovado segundo seu regimento.

Por ser verdade, firmo à presente.

---

Alcino Eduardo Bonella  
Coordenador do CEUA