

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JBE (Jacalin Binding Exoantigen) de cultura líquida de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*: Caracterização da sua presença em diferentes isolados de pacientes com Paracoccidioidomicose e interação desse componente com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

Vânia de Avelar Lucas

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia-MG
Agosto - 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JBE (Jacalin Binding Exoantigen) de cultura líquida de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*: Caracterização da sua presença em diferentes isolados de pacientes com Paracoccidioidomicose e interação desse componente com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

Vânia de Avelar Lucas

Margareth Leitão Gennari Cardoso

**Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de bacharel em Ciências Biológicas.**

Uberlândia-MG

Agosto - 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JBE (Jacalin Binding Exoantigen) de cultura líquida de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*: Caracterização da sua presença em diferentes isolados de pacientes com Paracoccidioidomicose e interação desse componente com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

Vânia de Avelar Lucas

Aprovado pela Banca Examinadora em 21/08/2003 Nota 10
2003

Margareth Leitão Gennari Cardoso
Dra. Margareth Leitão Gennari Cardoso

Idessânia Nazareth Costa
MSA. Idessânia Nazareth Costa

Sandra Regina Afonso Cardoso
MSA. Sandra Regina Afonso Cardoso

Ana Barbosa
Universidade Federal de Uberlândia
Prof.ª Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia, 01 de Agosto de 2003.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe, Divina, meu irmão, Lucas pelo grande carinho e incentivo em cada etapa da minha graduação.

Ao meu marido, Eric André, por me proporcionar momentos de compreensão e companheirismo.

Ao meu filho, Eric, por todos os momentos de alegria que tem me proporcionado.

Aos colegas de todo o curso de Ciências Biológicas pelo apoio e amizade.

À minha orientadora, Dra. Margareth Leitão Gennari Cardoso, pelos ensinamentos, pelo imensurável apoio e compreensão.

A todos os professores do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia, por toda ajuda recebida.

A todos os pesquisadores do Laboratório da Universidade Federal de Uberlândia, na aquisição de conhecimentos para a minha graduação. Em especial, à Fernanda Caroline pela sua grande amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia, Ana Cláudia, Elisabeth, Júnior,, Andréia e Max por todo o carinho recebido.

Ao Mso. Thomaz de Aquino Moreira, por fornecer material para trabalharmos em conjunto.

Enfim, a todos que de certa forma contribuíram para a construção deste trabalho e no meu desenvolvimento pessoal.

RESUMO

Antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* têm sido isolados para melhor compreensão dos mecanismos de infecção da paracoccidioidomicose (PCM), principal doença fúngica da América Latina. JBE (Jacalin Binding Exoantigen), uma fração antigênica de leveduras de *P. brasiliensis* é caracterizada pela habilidade de se ligar à jacalina imobilizada. O presente estudo mostrou a variabilidade dessa fração em 4 diferentes isolados de leveduras de *P. brasiliensis*, BAT, DA, HE e MA, provenientes de pacientes com PCM. Houve semelhança no perfil cromatográfico das amostras e maior variação no perfil de bandas de JBE, de 70 e 190 kDa obtidas em SDS-PAGE. Os Isolados DA e BAT apresentaram maior expressão de banda de 70 em relação a HE, que apresentaram maior intensidade de banda de 190 kDa. Não houve detecção de bandas da preparação JBE do isolado MA. Um estudo de aspecto biológico, abordado no presente trabalho foi adesão e fagocitose de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Obteve-se maior número de células fúngicas no ensaio com incubação prévia das leveduras em N-acetil-glicosamina. O conhecimento prévio que JBE possui bandas de 70 kDa capaz de interagir especificamente com N-acetil-glicosamina, sugere que JBE esteja envolvida no processo biológico de adesão e fagocitose das leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, macrófagos, fagocitose.

ÍNDICE

1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> : Aspectos gerais e morfológicos.....	1
1.2-Antígenos de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	5
1.3-Interação lectina-carboidrato na relação entre agentes patogênicos e o hospedeiro.....	8
1.4-Exoantígeno glicosilado de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	9
2- OBJETIVOS.....	11
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1- Obtenção da fração antigênica JBE.....	12
3.1.1- Preparo das amostras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	12
3.1.2- Condições de Cultivo de <i>P. brasiliensis</i> em meio líquido.....	12
3.1.3 - Obtenção do sobrenadante de cultura de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	13
3.2 - Caracterização físico-química da fração antigênica JBE.....	13
3.2.1- Cromatografia de afinidade do sobrenadante da cultura da cepa BAT de <i>P. brasiliensis</i> em coluna de Sepharose®-jacalina.....	13
3.2.2- Dosagem Protéica.....	13
3.2.2- SDS – PAGE.....	14
3.3 - Ensaio biológicos com a fração antigênica JBE.....	15
3.3.1- Obtenção de macrófagos peritoneais em camundongos	15
3.3.2- Obtenção de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	15
3.3.3- Incubação das leveduras de <i>P. brasiliensis</i> com N-acetil-glicosamina.....	16
3.3.4- Ensaio de adesão e fagocitose.....	16
4- RESULTADOS.....	17
5- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	25
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1-INTRODUÇÃO

1.1- *Paracoccidioides brasiliensis*: Aspectos gerais e defesa imunitária

Paracoccidioides brasiliensis (SPLENDORE, 1912; ALMEIDA, 1930), pertencente ao reino Fungi, filo Eumycota, classe Deuteromycetes, ordem Monialiales e família Monialiaceae (KONEMAN *et al.*, 1997) é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), principal micose sistêmica da América Latina (RESTREPO *et al.*, 1973). O relato de doença humana foi primeiramente feito por LUTZ (1908), que detectou o fungo em lesões da mucosa oral de dois pacientes, e chamou a atenção para o seu dimorfismo.

Infecções naturais iniciam pela inalação de fragmentos miceliais ou de conídias. Estes transformam-se em leveduras, no pulmão, poucas horas após infecção, segundo observações feitas em modelo experimental em camundongos (McEWEN *et al.*, 1987). Várias manifestações clínicas, patológicas e imunológicas podem ser observados nos pacientes infectados com PCM, incluindo desde infecções assintomáticas, compreendendo o maior grupo de indivíduos infectados, até formas clínicas polares de PCM hiperérgica (ou localizada) e PCM anérgica (ou disseminada). Nesta última forma, a partir de lesões pulmonares, há disseminação para áreas mucocutâneas, linfonodos e adrenais (FRANCO & MONTENEGRO *et al.*, 1984).

As manifestações da doença estão associadas a vários fatores, alguns relacionados ao parasita, como virulência e patogenicidade e outros ao hospedeiro, como susceptibilidade genética à infecção e estado imunitário, sendo estes aspectos estudados em modelo experimental (CALICH *et al.*, 1985; CALICH *et al.*, 1987) e observações clínicas (RESTREPO *et al.*, 1973; GOLDANI *et al.*, 1990). Dentre os fatores próprios do fungo

capazes de aumentar sua patogenicidade, os mais frequentemente mencionados são os lípidos e os polissacarídeos (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1982; SILVA & FACIOLI, 1985) e, mais recentemente, a glicoproteína de 43 kDa, o antígeno predominante em *P. brasiliensis* (VICENTINI *et al.*, 1994; LOPES *et al.*, 1994).

A maior susceptibilidade de homens à paracoccidiodomicose reflete-se pela incidência de 13 a 87 vezes maior da doença em homens do que em mulheres (STOVER *et al.*, 1986, KUROKAWA *et al.*, 1998), o que é atribuível a um efeito inibitório do estradiol sobre a transformação de conídias e micélios de *Paracoccidioides brasiliensis* em leveduras acarretando um retardo na adaptação do fungo aos tecidos do hospedeiro (RESTREPO *et al.*, 1984).

A correlação positiva entre severidade da forma clínica apresentada pelo paciente e o nível de imunodepressão foi mostrada por MOTA *et al.*, (1985) . MUSATTI *et al.*, (1994) estudaram o desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade tardia específica a antígenos do fungo, observando que os pacientes com PCM apresentavam comprometimento dos mecanismos timo-dependentes e que o grau de depressão variava desde à total incapacidade de responder a vários estímulos até a normalidade da resposta.

O contato inicial de *P. brasiliensis* com o hospedeiro se faz através das células fagocíticas, que constituem um importante compartimento da defesa inata do organismo. Observações experimentais mostram que a primeira resposta do animal infectado por *P. brasiliensis* é um acúmulo de neutrófilos nos locais onde estão as células fúngicas (McEWEN *et al.*, 1987). O contato entre leveduras e fagócitos é facilitado pela ativação da via alternativa do sistema complemento, que leva à opsonização das leveduras (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1997). Componentes do próprio fungo podem promover a adesão inicial e a internalização da levedura por células fagocíticas, como descrito para a gp 43 (ALMEIDA *et al.*, 1998).

Segundo JIMENEZ & MURPHY (1984), as células exterminadoras naturais (NK) seriam importantes na defesa durante as fases precoces da PCM. Depois da ativação inicial, células NK parecem ser incapazes de controlar a disseminação do fungo. A queda da atividade NK, nos estágios mais tardios da infecção, estaria relacionada com as alterações imunorregulatórias próprias da PCM (PERAÇOLI *et al.*, 1995).

Macrófagos murinos residentes fagocitam leveduras de *P. brasiliensis* e são permissivos quanto à multiplicação fúngica intracelular, enquanto que macrófagos murinos ativados restringem a multiplicação e destroem as leveduras ingeridas (BRUMMER *et al.*, 1989). Durante os estágios iniciais da infecção por *P. brasiliensis*, a ativação de macrófagos por altos níveis de TNF- α limita a disseminação do fungo (PARISE-FORTES *et al.*, 2000).

Em camundongos, IFN- γ ativa macrófagos que matam conídias *P. brasiliensis* através do mecanismo de Óxido Nítrico-L-Argenina (GONZALES *et al.*, 2000). Para extermínio efetivo de *Paracoccidioides brasiliensis* por monócitos, o sinal de ativação inicial induzida por IFN- γ é necessário para estimular as células a produzirem TNF- α (CALVI *et al.*, 2003).

Os componentes antigênicos de *P. brasiliensis* participam na modulação ou na ativação de resposta por células mononucleares na PCM; IL-10 e NO (Óxido Nítrico) podem ser importantes na regulação *in vitro* da formação de granuloma. Há uma intrigante relação entre o decréscimo da produção de NO e o alto índice de granuloma (DINIZ *et al.*, 2001). A produção de NO correlaciona-se diretamente com a atividade fungicida dos macrófagos e também com supressão da resposta de células T específica para antígenos de *P. brasiliensis*, o que, paradoxalmente, favoreceria o agravamento da lesão pulmonar da PCM (BOCCA *et al.*, 1998).

KURITA *et al.*, (1999) relataram que, embora não tenham atividade fungicida contra leveduras de *P. brasiliensis*, neutrófilos humanos exercem um importante efeito fungistático, efeito este que é potencializado por IFN- γ e pode desempenhar papel na resistência do hospedeiro na fase inicial da infecção por *P. brasiliensis*.

Neutrófilos de indivíduos sadios, segundo observação de alguns autores são capazes de matar, *in vitro*, leveduras de *P. brasiliensis* (RÊSTREPO & VECEZ, 1975; GOIHMAN-YAHR *et al.*, 1981). Neutrófilos murinos normais, de acordo com o relato de McEWEN *et al.*, (1987), não exercem atividade fungicida, mas quando elicitados com antígenos fúngicos, passam a matar leveduras. Outros demonstram que neutrófilos humanos não destroem leveduras de *P. brasiliensis*, deficiência essa que foi comum frente a todos os fungos dimórficos patogênicos, e inexistente frente aos oportunistas, fundamentando a proposta de que a patogenicidade primária de fungos virulentos dimórficos dependa de sua resistência à morte pelos neutrófilos (SCHAFFNER *et al.*, 1986).

Como os neutrófilos dos pacientes mostravam-se capazes de matar e digerir *Candida albicans*, os autores concluíram que a deficiência digestiva por eles apresentada é específica. Essa idéia foi reforçada por observação posterior de que neutrófilos provenientes de familiares de pacientes com PCM digerem e matam eficientemente o fungo (URQUIOLA *et al.*, 1993).

BAVA *et al.*, (1991), estudando subgrupos de linfócitos T, observaram um decréscimo no número de células CD4 e CD8, na forma aguda e crônica da infecção. MUNK *et al.*, (1995) sugerem a participação das células T na determinação de ativação policlonal de células

B; descreveram haver aumento na proliferação de linfócitos B e elevada produção de IgM e IgG quando estas células foram estimuladas com o sobrenadante de células T γ/δ infectadas com *P. brasiliensis*.

Em geral, a combinação de anticorpos com antígenos específicos facilita a neutralização e eliminação de antígenos, correspondendo a um importante mecanismo de defesa do hospedeiro. Entretanto, esses complexos podem se depositar nos tecidos e causar injúria por ativação do complemento. Em PCM, estes complexos têm sido relatados, havendo correlação positiva entre os níveis desses complexos com atividade da doença e depressão da imunidade celular (ARANGO *et al.*, 1982; CHEQUER-BOU-HABIB *et al.*, 1989). Demonstrou-se *in vitro* que o fungo é capaz de ativar o sistema complemento através da via alternativa, resultando num efeito opsonizante para fagocitose por macrófagos (CALICH *et al.*, 1979).

A detecção de altos níveis de anticorpos séricos anti-gp 43 e anti-gp 70, nos mesmos pacientes, reforçaram a idéia da existência de uma resposta Th2 na PCM, relacionada com a incapacidade do sistema imunitário de controlar a infecção (BERNARD, 1997).

Em camundongos, a produção de IFN- γ e IL-2 e a predominância da secreção de anticorpos IgG2a estão associados com a resistência à *P. brasiliensis*. Em contraste a produção de baixos níveis de IFN- γ e a produção precoce de elevados níveis de IL-5 e IL-10, eosinofilia e a preferência por secretar IgG2b e IgA caracteriza a progressão da doença em animais susceptíveis (KASHINO *et al.*, 2000). A alta expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) na lesão de pacientes com a forma juvenil da PCM representa um mecanismo pelo qual o fungo invade o sistema imunológico do hospedeiro, contribuindo para a maior severidade e forma disseminada da doença (NEWORAL *et al.*, 2003).

Pacientes com a forma jovem da doença mostram significativamente altos níveis de IgE se comparado com pacientes com as formas adultas. A IgE decresce quando as condições clínicas do paciente melhoram. A detecção da IgE específica no soro de pacientes é dificultada pela competição com IgG (MAMONI *et al.*, 2001). Alguns grupos de pacientes com PCM crônica produzem altos níveis de IgG4 e IgE contra *P. brasiliensis*, e baixos níveis de IgG1. IgG4 e IgE poderiam ser usados como marcadores da severidade da doença e do prejuízo da imunidade protetora (MAMONI, *et al.*, 2002).

Há baixa eficiência das células dendríticas e macrófagos na estimulação de células T que secretam linfocinas Th1 *in vitro*, este processo pode estar envolvido na progressão da doença *in vivo* (ALMEIDA & LOPES, 2001).

Outra característica da imunidade durante a infecção por *P. brasiliensis* é a depressão da resposta mediada por células T, que tem sido atribuída a diversos mecanismos, relacionados a fatores séricos produzidos pelo hospedeiro (COSTA *et al.*, 1983), anticorpos específicos (CASTAÑEDA, 1985), complexos imunes e populações de células supressoras (SUGIZAKI *et al.*, 1999). Células fagocíticas mononucleares participam da reação granulomatosa da PCM, que envolve ainda células epitelióides e gigantes multinucleares, matriz extracelular organizada (KERR *et al.*, 1988), além de linfócitos T e outras células (MOSCARDI-BACHI *et al.*, 1989). Pacientes com PCM aguda apresenta a forma clínica mais severa da doença e o padrão da resposta granulomatosa difusa está associada com a supressão de células T (DINIZ *et al.*, 1999).

Ainda um mecanismo relacionado a não responsividade de linfócitos T a antígenos na paracoccidiodomicose foi analisado por CAMPANELLI *et al.*, (2003), sugerindo que a via Faz-FasL é uma interação que aumenta o nível de apoptose dessas células. E que, ainda o bloqueio de CTLA-4 e FasL resultou no aumento da produção de IFN- γ . Outro estudo, realizado por SOUTO *et al.*, (2003), mostraram o efeito imunossupressivo induzido por *P. brasiliensis*, em camundongos infectados experimentalmente, com capacidade de invadir o timo e induzir atrofia severa com significativa redução da área cortical, e esta atrofia foi ocasionada por um aumento de 8 vezes no índice de apoptose de células nesse órgão.

1.2 - Antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Paracoccidioides brasiliensis, como outros parasitos eucariotas, expressam vários componentes antigênicos na superfície, reconhecidos por anticorpos do soro de pacientes ou de animais imunizados. Sendo um fungo dimórfico, o *P. brasiliensis* apresenta duas fases morfológicas distintas, que são importantes na definição de sua biologia. A forma fúngica e micelial, que são bioquimicamente diferentes entre si, mas muitos componentes antigênicos são expressos em ambas as formas, com diferenças quantitativas. Relatata-se a predominância de polissacarídeos, com a presença acentuada de quitina, beta 1-3 glucana e galactomanana na fase de micélio e quitina, alfa 1-3 glucana na fase de levedura (KANETSUMA *et al.*, 1969; KANETSUMA, 1972).

Os procedimentos para obtenção de componentes de *P. brasiliensis* são de dois tipos principais. A coleta de sobrenadante da cultura em meio líquido, após filtração, proporciona a preparação de exoantígenos fúngicos, o tratamento químico ou ruptura mecânica das células

fúngicas, fornecendo antígenos somáticos e metabólicos (YARZÁBAL, 1982; NEGRONI, 1968; CAMARGO *et al.*, 1988).

Polissacarídeos predominam na parede celular fúngica. Eles têm sido objeto de numerosos estudos que têm mostrado que α -glucana é o principal polissacarídeo da parede de leveduras, formas estas que apresentam apenas traços de β -glucana. Já na parede micelial, a β -glucana é a única glucana presente. Isso tem suscitado a hipótese de que a transformação dimórfica de *P. brasiliensis* exija um controle rigoroso da síntese de glucanas. A presença α -glucana tem sido associada à virulência fúngica (HOGAN & KLEIN, 1994). Polímeros que fazem a mudança de β -glucana para α -glucana evitam que β -glucana cause resposta inflamatória (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

Preparações antigênicas obtidas da parede celular fúngica, ricas em carboidratos, foram e têm sido utilizadas em testes de fixação do complemento, em reações de precipitação em meio líquido e em testes cutâneos nos pacientes com PCM (FAVA-NETTO & RAPHAEL, 1961; FAVA-NETTO, 1976). RODRIGUES & TRAVASSOS (1994) identificaram corresponder a uma glicoproteína de 43 kDa. O estudo imunológico mais completo do antígeno de Fava-Netto foi feito por immunoblot, verificando-se que bandas de massa molecular variada eram reconhecidas por soros de pacientes com PCM; as de 90 e 30 kDa eram as bandas reconhecidas com maior frequência por soro de pacientes com PCM (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1995).

É interessante observar que vários imunógenos isolados de *P. brasiliensis*, constitutivos ou secretados, são compartilhados por outros fungos patógenos, tais como: *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoforms*, *Blastomyces dermatitides*, ocorrendo reações cruzadas em testes cutâneos e testes sorológicos (ANDRIEU, 1969; YARZÁBAL *et al.*, 1973). BURGOS *et al.*, (1985) purificaram por cromatografia e analisaram por SDS-PAGE, antígenos somáticos da cepa 339 que davam origem a reação específica na imunodifusão, isolando duas frações protéicas de 66 e 95 kDa. Utilizando outra cepa, houve revelação por Immunoblot das frações de 45 e 48 kDa como específicas para PCM, havendo várias outras frações com reações cruzadas com soros de pacientes com histoplasmose, candidíase e aspergilose (CASOTTO, 1990).

A gp 43, quanto à sua função (CARMONA *et al.*, 1995), e principalmente quanto à sua estrutura tem sido o melhor antígeno caracterizado. A gp 43 foi identificada numa fração glicoprotéica do filtrado de cultura de sete dias de leveduras da cepa 339 separada por

cromatografias de exclusão e de afinidade à Sepharose®-Concanavalina A. (PUCCIA *et al.*, 1986)

A análise eletroforética dessa fração revelou três principais componentes, de massas moleculares 43, 55 e 72 kDa (PUCCIA *et al.*, 1986). O isolamento da gp 43 foi procedido por imunoafinidade, em coluna com um dos seguintes anticorpos imobilizados: IgG do soro de pacientes com PCM (PUCCIA *et al.*, 1986), IgG de coelho anti-gp 43 (PUCCIA *et al.*, 1991) e monoclonal anti-gp 43 (PUCCIA *et al.*, 1994). A expressão da gp 43 é variável nas diferentes formas do fungo, dependendo do isolado de *P. brasiliensis* utilizado. Não se conhecem as implicações dessa expressão fase-específica da gp 43 (MATTAR-FILHO *et al.*, 1997). Um estudo realizado por POPI *et al.*, (2002), demonstrou que a gp 43 inibe a atividade fungicida de macrófagos da linhagem B.10 (camundongos susceptíveis) e A/SN (camundongos resistentes).

O segundo antígeno protéico de *P. brasiliensis* mais estudado tem massa molecular de 58 kDa e foi descrito por FIGUEROA *et al.* (1995). Esse antígeno foi identificado pela reatividade, detectada através de ensaio imunoenzimático, de filtrado de cultura com um painel de anticorpos monoclonais, específicos para *P. brasiliensis*. Há indicações químicas de que a gp 58 tenha oligossacarídeo O-ligado à cadeia polipeptídica. Utilizando anticorpos monoclonais que reconhecem o antígeno de 58 kDa, esse componente foi detectado, por imunohistoquímica, no citoplasma de ambas as formas, micélio e levedura, de *P. brasiliensis*, bem como em secções de amostras de tecidos coletadas de pacientes com PCM. Através de western blot, verificou-se que a gp 58 é reconhecida pela maioria (81%) dos soros de PCM testados.

O mesmo laboratório que estudou o antígeno de 58 kDa descreveu, dois anos após, o uso do painel de anticorpos monoclonais anti-*P. brasiliensis* na identificação de um componente fúngico de massa molecular 87 kDa. O anticorpo monoclonal que reconhece esse componente foi utilizado para o desenvolvimento de um ELISA inibitório para a detecção do antígeno de 87 kDa no soro de pacientes com PCM (GOMEZ *et al.*, 1997). O ensaio revelou-se aplicável ao acompanhamento dos pacientes, uma vez que os níveis de antigenemia detectados correlacionaram-se com a evolução do quadro clínico, antes e após a instituição da terapêutica (GOMEZ *et al.*, 1998).

BURGOS *et al.* (1985), purificaram por cromatografia e analisaram por SDS-PAGE, antígenos somáticos da cepa 339 que haviam sido identificados como responsáveis por reação de imunodifusão específica da PCM. Duas frações protéicas foram isoladas, de massas moleculares 66 e 95 kDa.

CASOTTO (1990), utilizando outro isolado de *P. brasiliensis*, revelou no imunoblot componentes de 45 e 48 kDa, que considerou específicos da PCM; paralelamente, revelou várias outras frações que tinham reatividade cruzada com soro de pacientes com histoplasmose, candidíase e aspergilose. Não se pode excluir a correspondência entre os antígenos estudados e a gp 43, sugerida pelas massas moleculares próximas e as próprias características dos materiais estudados.

1.3 - Interações Lectinas-Carboidratos na relação entre parasito e hospedeiro

O termo lectina (do latim *legere*, escolher) foi variavelmente descrito desde sua primeira denominação, por Boyd & Shapleigh (1954). Segundo GOLDSTEIN *et al.* (1969), as lectinas representam uma classe de glicoproteínas de origem não imune que se ligam especificamente a carboidratos, com capacidade de aglutinar células ou precipitar conjugados. Além de específica, se liga de forma reversível. Embora as lectinas sejam conhecidas por mais de cem anos, a idéia de que elas possam mediar fenômenos biológicos pelo reconhecimento de moléculas é recente, e, adotando as descrições das diferentes propriedades das lectinas, pode-se defini-las, segundo ROQUE BARREIRA (1985), como: “proteínas ligantes de carboidratos, não anticórpicas, não enzimáticas, que se ligam de modo reversível e específico a mono e oligossacarídeos”.

Foi demonstrado que estas proteínas não estão confinadas às plantas, mas estão distribuídas ubiqüamente na natureza, aparecendo freqüentemente na superfície de células, onde estão estrategicamente posicionadas para combinar com carboidratos nas células vizinhas. De forma interessante, as lectinas distinguem não somente entre diferentes monossacarídeos, mas também diferentes oligossacarídeos (SHARON & LIS, 1983).

A especificidade das lectinas para as glicoproteínas depende tanto dos açúcares envolvidos quanto do acesso dos oligossacarídeos das cadeias. Oligossacarídeos O-ligados em proteínas de superfície celular proporcionam estruturas adequadas ao estabelecimento de interações celulares, incluindo as que ocorrem entre parasitas e hospedeiro. São dois os tipos de oligossacarídeos conhecidos que se ligam às proteínas: oligossacarídeos N-ligados, que se iniciam com resíduos asparagina, e os O-ligados, que são cadeias mais curtas, freqüentemente terminando em NGal ou ácido siálico e iniciados por resíduos de serina e treonina (VARKI *et al.*, 1999).

Interações lectina-carboidrato representam papel crucial na especificidade dos processos de adesão celular. Estas interações têm sido evidenciadas em processos infecciosos por vírus, bactérias, fungos e protozoários, na simbiose de plantas com bactérias, na diferenciação celular, formação de órgãos, migração de linfócitos e metástases (SHARON & LIS, 1989). Oligossacarídeos O-ligados em proteínas de superfície celular proporcionam estruturas adequadas ao estabelecimento de interações celulares, incluindo as que ocorrem entre parasitas e hospedeiro (VARKI *et al.*, 1999).

Tem-se descrito alguns componentes de fungos com caráter lectínico ou mesmo glicoconjugados que têm exercido papéis importantes na interação com o hospedeiro. Uma adesina de *Cândida glabrata* que reconhece asialo-lactosil está envolvida na aderência do fungo a células epiteliais humanas (CORMACK *et al.*, 1999). Em *Candida albicans*, uma adesina-lectina like estabelece a interação com resíduos de fucose em células do hospedeiro, na porção germe-tubo de hifas (VARDAR-UNLU *et al.*, 1998). *Cryptococcus neoforms* apresenta uma manoproteína envolvida na resposta imune mediada por células (PITZURRA *et al.*, 1997)

Tem-se isolado diferentes antígenos de variadas preparações de culturas de *P. brasiliensis* para uma melhor compreensão dos mecanismos de invasão e patogenicidade (BLUMER *et al.*, 1984; FREITAS DA SILVA e ROQUE BARREIRA, 1992).

1.4- Exoantígeno glicosilado de *Paracoccidioides brasiliensis*

Estudos recentes indicam que o *P. brasiliensis* secreta em cultura de leveduras um componente que interage com a lectina jacalina imobilizada em Sepharose, e é eluído por D-Galactose. Análise dessa preparação, eluída da coluna com D-Galactose 0.4M, por SDS-PAGE, mostrou a existência de bandas de 190 e 70 kDa e denominou-se tal preparação como JBE (Jacalin Binding Exoantigen). Este exoantígeno está presente em pequenas quantidades no fungo, mas tem alta imunogenicidade, uma vez que foi reconhecido por todos os soros de pacientes testados e suscitou intensa produção de anticorpos específicos em camundongo imunizado com o glicoconjugado. Estes mesmos anticorpos proporcionaram fluorescência positiva, visível apenas na superfície celular, quando incubados com as leveduras, seguindo-se contato com anticorpos de cabra anti-IgG de camundongo conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (GENNARI-CARDOSO, 2000).

O estudo cinético dessa preparação mostrou que o máximo de JBE liberado em cultura de meio líquido ocorre aos 21 dias, quando essa fração corresponde a 1,67 % das proteínas fúngicas secretadas. Estes componentes foram reconhecidos por anticorpos de coelho gerados por imunização com a banda de 190 kDa excisada de géis SDS-PAGE. Nenhum outro componente de preparação bruta de exoantígeno foi reconhecido pelos anticorpos anti-banda de 190 kDa (GENNARI-CARDOSO, 2000).

Das bandas existentes na preparação JBE, observou-se, no componente de 70 kDa, capacidade de ligação específica com N-acetil glicosamina, através de cromatografia com esse açúcar imobilizado. Demonstrou-se nesse mesmo estudo, por imunolocalização, a presença de tais componentes, na sua grande maioria, na superfície do fungo (GENNARI-CARDOSO, 2000).

A variabilidade antigênica em diferentes isolados determinada para outros antígenos de *P. brasiliensis*, como gp 43 (MATTAR-FILHO *et al.*, 1997), motivou-nos a analisar a presença de JBE em isolados de leveduras de *P. brasiliensis*, provenientes de pacientes com paracoccidioidomicose (PCM).

Outro aspecto abordado, em função da interação de JBE de *P. brasiliensis* com jacalina, indicativa da ocorrência de *O*-glicosilação, e presença de componente de 70 kDa com carácter lectínico, propusemo-nos a estudar esta fração, postulando que a mesma pudesse atuar na interação do parasito com células do hospedeiro.

2- OBJETIVO

- Caracterizar a presença de JBE em diferentes isolados de leveduras de *P. brasiliensis* de pacientes com PCM.
- Analisar a possível interação de JBE, *in vitro* com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, através de ensaios de adesão e fagocitose e inibição por N-acetilglicosamina.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Obtenção da fração antigênica JBE:

3.1.1- Preparo das amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* -

Foram utilizados um isolado de *P. brasiliensis*, recuperado de lesões de pacientes com PCM. O isolado BAT foi proveniente de paciente atendido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Roberto Martinez. Os fungos foram mantidos a 35- 37 °C em meio sólido Sabouraud-Dextrose-Ágar, com repiques quinzenais ou mensais, conforme o crescimento e utilização posterior.

3.1.2- Condições de Cultivo das leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* em meio líquido:

As leveduras de *P. brasiliensis* foram cultivadas em meio líquido F-10 (GibcoBRL), enriquecido com 1.2 g de NaHCO₃ (PM: 84.01) e 0.05 M de D (+) Glucose Anidra (PM: 180,16), conforme adaptação procedida em nosso laboratório. Após sete dias de crescimento em meio de Sabouraud-Dextrose-Ágar, foram feitas as contagens microscópicas das unidades fúngicas da massa de leveduras, proveniente de um tubo de cultura de 12,5 mL, utilizando uma câmara de Neubauer (Weber Scientific International, Lancing, Sussex, England). O volume total desse homogeneizado foi inoculado nos frascos de cultura de 200 mL, contendo 50 mL do meio líquido F-10 e mantido a 35 °C numa câmara giratória a 70 rpm (Forma Scientific, Inc – Model 4518 S/N 16162), por sete dias. Após este período, nova contagem das unidades fúngicas foram efetuadas para verificar o crescimento das leveduras, foi feito um repique com um volume que corresponde a 1.8×10^8 células para outro frasco Erlenmeyer de

200 mL, contendo 50 mL do meio líquido F-10 e incubado nas mesmas condições acima citadas. As culturas foram paralisadas no 7º dia para processamento do sobrenadante e obtenção de exoantígenos. A viabilidade fúngica foi observada qualitativamente, durante a contagem das células fúngicas, através da observação de presença de luminosidade nessas formas, em microscopia ótica.

3.1.3- Obtenção do sobrenadante de cultura de *Paracoccidioides brasiliensis*:

Após o período de cultivo de cada cultura, as células fúngicas foram mortas através do contato com tiomersal, na concentração de 0,2 g/L, durante uma noite à 4 °C. A cultura foi então centrifugada por 10 minutos a 500 x g e o sobrenadante da cultura filtrado em papel de filtro Whatman nº 3 (Whatman International Ltda.-Maidstone, England), Foi adicionado o inibidor de protease PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil - Sigma Chemical Co, St. Louis) em 1mM em Etanol PA. Posteriormente o sobrenadante foi concentrado em membrana MWCO: 6-8.000 (Spectra/Por®) contra sacarose até a obtenção de aproximadamente 5 mL que foi submetido a 3 diálises sucessivas contra 1800 mL de PBS (pH 7.2). Essa preparação do sobrenadante da cultura foi armazenada a -20 °C para posterior obtenção da fração JBE.

3.2- Caracterização físico-química da fração antigênica JBE:

3.2.1- Cromatografia de afinidade do sobrenadante da cultura dos isolados de *P. brasiliensis* De pacientes com PCM em coluna de Sepharose®-jacalina:

Foram aplicados 2,5 mL da preparação (5 mg) em uma coluna de 5 ml de leito de Sepharose®-jacalina, equilibrada com PBS (0.01M pH 7.2). O material foi incubado por 6 a 8 horas, a 4°C, sob agitação lenta e constante. O material não ligante a jacalina foi eluído com 50 mL de PBS (pH 7.2), coletando-se frações de 2.5 mL cada uma até obter-se leitura de D.O.(280nm) menor ou igual a 0.03. A fração ligante a jacalina foi eluída com solução de PBS contendo D-galactose 0.4 M, também coletou-se frações e D.O. estipulada anteriormente. Este material foi concentrado em membrana MWCO: 6-8.000 (Spectra/ Por®) contra sacarose até o volume de 3 mL quando então foi passado por 3 diálises sucessivas contra 1800 mL de PBS (pH 7,2). O material final foi concentrado e dialisado em filtros CENTRICON: 30.000 (Pharmacia, Sweden) à 2205 X g, à 4 °C. Para cada 100 mL (50mg) de cultura líquida, com bom rendimento da coluna, foi obtido 100 µg de JBE.

3.2.2- Dosagem protéica da fração JBE

A dosagem protéica do material cromatografado foi determinada pela leitura de DO, dividido por 10 vezes. Por determinação prévia de conteúdo de aminoácidos na fração JBE, foi determinado que a massa protéica correspondia a um valor 10 vezes menor que a DO. (Lowry *et al.*, 1951)

3.2.3- SDS - PAGE

O perfil protéico das amostras de exoantígenos dos isolados de *P. brasiliensis* foi analisado em Gel de Eletroforese de Poliacrilamida em Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE), de acordo com LAEMMLI (1970), a 8 %, em condições desnaturantes e edutoras.

O gel de separação foi preparado utilizando-se Tris-HCl (Sigma) 0,375 M, pH 8,8, SDS (Sigma) 1% EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético, Quimibrás) 2 mM, solução de acrilamida a 30 % e bis-acrilamida a 0,8% (Pharmacia-KLB, AB, Bromma, Suécia), TEMED (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamino, Pharmacia-KLB) 0,125 % e APS (Persulfato de amônio, Pharmacia-KLB, AB) 0,125%.

Para preparação do gel de empilhamento, foram utilizados Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 0,1%, EDTA 2 mM, solução de acrilamida/bis-acrilamida a 5 %, TEMED 0,125 % e APS 0,125 %.

O tampão de Corrida (pH 8,3) consistiu de glicina (Sigma) 0,19 M, Tris (Sigma) 0,025M, SDS (SIGMA) 0,075 % e EDTA (Quimibrás) a 1,9 M.

As amostras foram diluídas em Tampão de Amostra, a 13 µg por poço, contendo Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, SDS a 4 %, Azul de bromofenol a 0,2 % e glicerol a 20 % e submetidas a um aquecimento de 95 °C (Termobath ALB64-Finemould Precision Ind., Co., Seul, Coréia) durante 3 minutos, sendo posteriormente aplicadas aos poços na concentração de 13 µg/poço. Paralelamente às amostras, foram aplicados os padrões de peso molecular Wide Range (Sigma) e Rainbow (Amersham Life Science, Little Chalfont, Inglaterra).

O sistema foi preparado em aparelho apropriado para mini-gel (SE 215 Mighty Small Multiple Caster, Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA), e conectado a um gerador (*Electroforesis Power Supply* EPS 301 – Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) e submetido a uma corrente constante de 20 mA para a migração das proteínas por aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

A coloração do gel foi realizada de acordo com a técnica descrita por FRIEDMAN (1962), onde o gel foi inicialmente imerso em um recipiente contendo solução fixadora (metanol 50 %, ácido acético 12 % e formaldeído 0,05 %) por 2 horas à temperatura ambiente, e posteriormente incubado em etanol 50 % durante 20 minutos por três vezes e pré-tratado com tiosulfato de sódio (Quimiobrás) 0,02 % por 1 minuto. Em seguida o gel foi incubado em 50 mL de solução de nitrato de prata (Labsinth, Diadema, Brasil) a 0,2 % acrescido de Formaldeído 0,003 % em câmara escura por 20 minutos. Para revelar as bandas protéicas, foi utilizado 50 mL de solução contendo Carbonato de Sódio (Ecibra Ind. Brasileira, São Paulo, Brasil) 6 %, formaldeído 0,0005 % e tiosulfato de sódio 0,02 % e para interromper a reação, uma solução contendo metanol 50 % e ácido acético 12 % foi utilizada.

O gel foi finalmente digitalizado em Scanner HP PrecisionScan LTX, versão 1.2. (Hewlett Packard, Co.), fixado entre duas folhas de papel celofane e seco à temperatura ambiente por 18 horas.

3.3- Ensaio biológicos com a fração antigênica JBE:

3.3.1- Obtenção de macrófagos peritoneais em camundongos:

Para cada experimento, dois camundongos machos BALB/c, pesando 20g, receberam intraperitonealmente, 1 mL de meio tioglicolato de Sódio 3 %. Após 3 dias, foram injetados 3 mL de solução de RPMI incompleto, em cada animal pela mesma via. Foi feita uma leve movimentação abdominal em cada animal e aspirado o lavado peritoneal. Os macrófagos foram lavados com Tampão de Lise, sob agitação lenta, a 2205 x g, e refrigerada durante cinco minutos. O sobrenadante foi descartado, e as células lavadas com 5 mL de RPMI incompleto por animal, durante cinco minutos. Os macrófagos foram ressuspensos em 1 mL de RPMI acrescido de 10% de SFB por animal. 200 µL dessa solução com macrófagos foi corada com cristal violeta, contados em uma câmara de Neubauer (Weber Scientific International, Lancing, Sussex, England). A quantidade desejada foi de 5×10^5 macrófagos por lâmina, e atingindo esse padrão, a solução foi colocada em triplicata em lâminas redondas de 13mm contidas em placa de poliestireno de 24 poços. O material foi colocado em estufa de CO₂ a 5% , 37 °C durante quatro horas. Após, as células foram lavadas com PBS estéril, para a retirada das células não aderentes. Em seguida, foi acrescentado 500 µL de meio RPMI completo com 10% de SFB, à 5% de CO₂ à 37° C e permaneceram 24 hs em repouso para estabilização das células aderentes. Para cada parâmetro estudado, foram preparadas 3 lâminas.

3.3.2- Obtenção de *Paracoccidioides brasiliensis*

Os fungos foram colocados em frascos de cultura de 200 mL, contendo 50 mL do meio de cultura F-10 e mantido numa câmara giratória a 80 rpm (Forma Scientific, Inc-Model 4518 S/N 16162) por sete dias. Após este período, os fungos e as unidades fúngicas foram colocadas na centrífuga a 1500 rpm durante 5 minutos, separados, e o sobrenadante usado para a realização de cromatografias. Aos fungos, cuidadosamente, foram acrescentados 0.00153 g de fluoresceína diluída em tampão carbonato (NaHCO_3), 0.5 M, pH 9.5 e colocados em rotação constante a 4° C durante 24 horas. Seguida a marcação, os fungos foram lavados exaustivamente com 2 mL de PBS estéril para a retirada do excesso de fluoresceína.

3.3.3- Incubação das leveduras com N-acetil-glicosamina:

Após marcação com fluoresceína, as leveduras foram ressuspensas em 2 mL de RPMI incompleto e esta quantidade foi dividida em duas alíquotas, e a uma delas foi adicionada 50mM de N-acetil-glicosamina incubando os fungos por 4 horas a 4° C. Lavagens sucessivas com PBS estéril foram feitas nessa alíquota para a retirada do excesso de N-acetil-glicosamina. Os fungos foram contados e adequados a uma proporção de seis fungos para um macrófago. Cada alíquota foi ressuspensa em 1 mL de RPMI a 10% de SFB e este material foi reservado para o ensaio de adesão e fagocitose

3.3.4- Ensaio de adesão e fagocitose

Após o preparo dos macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c, conforme descrito no item 3.2, as células fúngicas foram adicionadas aos poços da placa de poliestireno. Para o ensaio de adesão, esta solução contendo as leveduras e macrófagos foi deixada em estufa à 5% de CO_2 à 37° C durante uma hora e meia e, as lamínulas lavadas com PBS estéril, fixadas em álcool metílico a 40C durante 10 minutos, lavadas com água bidestilada. Para permeabilização das células, foi adicionado triton X-100 (0.5%) diluído em PBS durante 30 minutos, lavadas novamente com água bidestilada, coradas com Azul de Evans 0.1% durante 30 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS estéril e após secas foram colocadas com a face impregnada com células para baixo em lâminas de vidro com uma gota de solução de Glicerina (N-Propil Galato em Glicerol) e vedadas com esmalte.

Para o ensaio de fagocitose, as leveduras permaneceram incubadas com os macrófagos por 24 horas. Após esse período, as lamínulas foram preparadas para o processo de fixação e coloração do material para verificar a fagocitose, conforme os mesmos procedimentos citados no parágrafo acima. As lamínulas foram analisadas em microscópio de imunofluorescência em conjunto com luz branca, para obtenção de contraste de coloração.

3.4- Normas de biossegurança

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização de equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis segundo CHAVES-BORGES & MINEO (1997).

4-RESULTADOS

4.1- Presença de JBE nos diferentes isolados de cultura líquida de leveduras de *P. brasiliensis*

Foram obtidos quatro isolados de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, para verificar a presença de JBE no sobrenadante de cultura de leveduras dessas amostras.

Inicialmente, foi obtido o isolado BAT proveniente de paciente atendido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP. Esse isolado, foi cultivado em meio de Negróni modificado (CAMARGO *et al.*, 1988) e já havia sido detectado a presença de JBE.

Em colaboração com o Mso. Thomaz Aquino Cardoso, foram obtidos outros três isolados, denominados: HE, DA e MA provenientes de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). Foi utilizado outro meio de cultura, denominado F-10 (GibcoBRL), enriquecido com 1.2 g de NaHCO₃ (PM: 84.01) e 0.05 M de D (+) Glucose Anidra (PM: 180,16), conforme adaptação procedida no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Sabe-se que *P. brasiliensis* cultivado em meio líquido libera exoantígenos altamente glicosilados (FRANCO *et al.*, 1984) assim, sobrenadantes de cultura correspondem a preparações adequadas para isolamento de componentes fúngicos pela interação com lectinas. O principal

exoantígeno de *P. brasiliensis*, a gp 43 kDa foi isolada inicialmente a partir do sobrenadante de cultura de 7 dias da cepa 339, separada por coluna de afinidade à Sepharose®- ConA (PUCCIA *et al.*, 1986, lectina capaz de reconhecer oligossacarídeos N-ligados.

Conforme mostra a Figura 3, obteve-se a presença de JBE nos isolados de DA e HE, a (Pista B e C, Figura 3). Apesar da banda de 190 kDa ter sido mais proeminente do que a de 70 kDa na preparação JBE do isolado HE (Pista C – Figura 3), houve semelhança desses isolados com a preparação JBE obtida do isolado BAT (Pista D – Figura 3). Não houve detecção de JBE na preparação proveniente do isolado MA. Quanto ao perfil cromatográfico das preparações provenientes dos diferentes isolados em que detectou-se JBE, houve semelhança à preparação do isolado BAT, conforme indicado na Figura 1.

A presença de JBE no sobrenadante de cultura de leveduras de *P. brasiliensis* em meio líquido Negroni Modificado foi semelhante a JBE obtida a partir do sobrenadante de cultura de leveduras em meio F-10, conforme mostra a Figura 2. Porém, no meio de cultura F-10, sete dias foram suficientes para obtenção de JBE e no meio de Negroni Modificado foram necessários 21 dias de cultivo para obtenção de JBE.

4.2 - Ensaio de adesão e fagocitose em presença N-acetil-glicosamina.

Quanto aos ensaios de adesão e fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, pela análise qualitativa em microscopia de fluorescência juntamente com luz branca, foi evidenciada a presença de maior número de fungos aderidos e fagocitados pelos macrófagos quando as leveduras foram previamente incubadas com 50 mM do monossacarídeo N-acetil-glicosamina. Tal fenômeno pode ser observado, para a adesão, quando comparamos os diferentes aumentos das fotos de microscopia A, B e C em relação às fotos D, E e F (Figura 4) em que essas leveduras foram previamente incubadas com N-acetil-glicosamina. Para o fenômeno de fagocitose, observou-se um maior número de fungos presente nos macrófagos das fotos D, E e F (Figura 5), em que as leveduras foram também previamente incubadas com N-acetil-glicosamina.

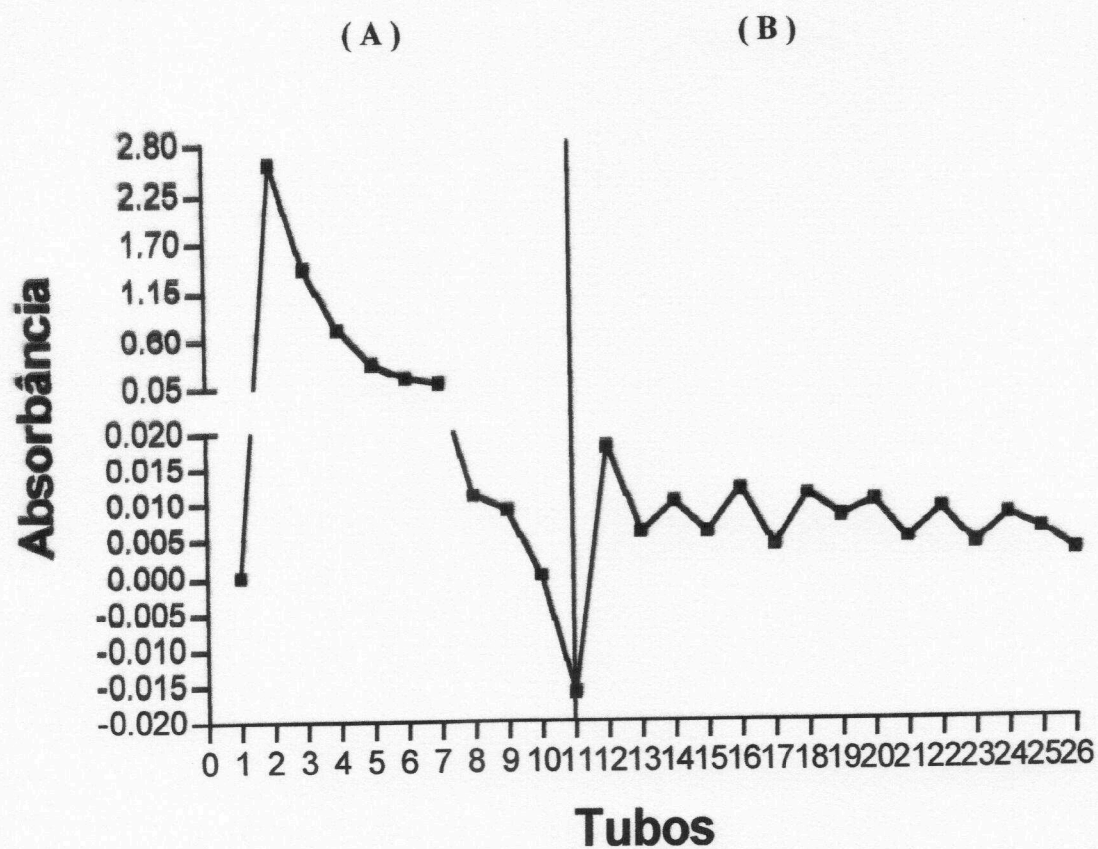


Figura 1 - Cromatografia de afinidade do sobrenadante da cultura de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* do isolado BAT, após concentração e diálise, para obtenção da fração JBE. Volume da coluna de 5 mL; amostra aplicada 2,5 mL (5 mg de proteína). (A) Eluição do sobrenadante com PBS. (B) Eluição do sobrenadante com D-Galactose 0,4 M.

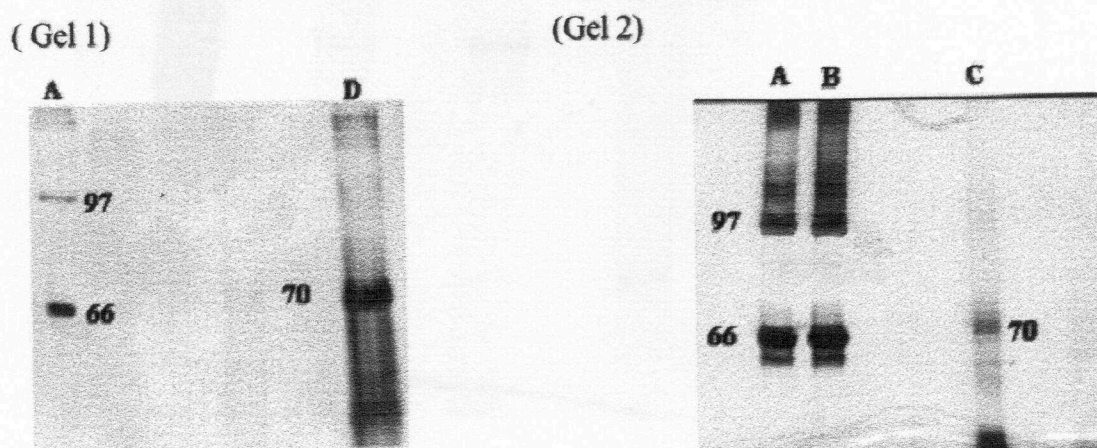


Figura 2 - Eletroforese em SDS-PAGE 7 % de JBE. Material corado pela Prata. Amostra aplicada de 5,0 μ g, na presença de 2-mercaptoetanol. : A e B são os marcadores moleculares: 66 kDa soroalbumina e 97 kDa agregado do soroalbumina; Gel 1: D JBE obtido do sobrenadante de 21 dias de cultura líquida em meio Negroni Modificado, concentrado e eluído em coluna de jacalina com D-galactose 0,4 M; Gel 2: C JBE obtido do sobrenadante de 7 dias de cultura líquida em meio F10, concentrado e eluído em coluna de jacalina com D-galactose 0,4 M.

C) Sobrenadante F10;

B) Sobrenadante Negroni;

A) Marcadores moleculares: 66 kDa soroalbumina e 97 kDa agregado do soroalbumina.

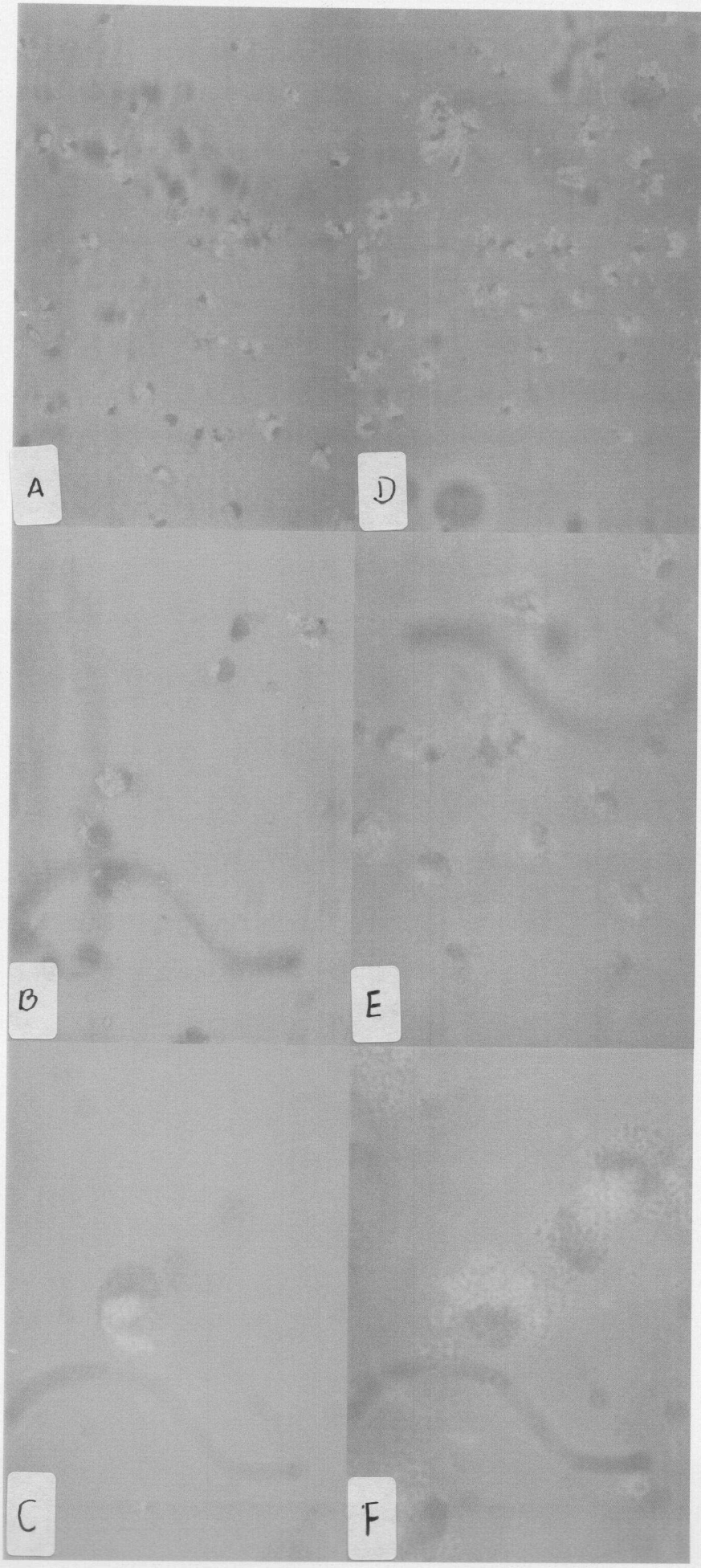


Fig. 4

Figura 4- Ensaio de adesão. Leveduras de *P. brasiliensis* marcadas com fluoresceína. Fotos **A, B e C** na ausência de N-acetil-glicosamina em microscopia ótica fluorescente e luz branca, no aumento de 2.000, 4.000 e 10.000 x, respectivamente. Fotos **D, E e F** na presença de N-acetil-glicosamina em microscopia ótica fluorescente e luz branca, no aumento de 2.000, 4.000 e 10.000 x, respectivamente.

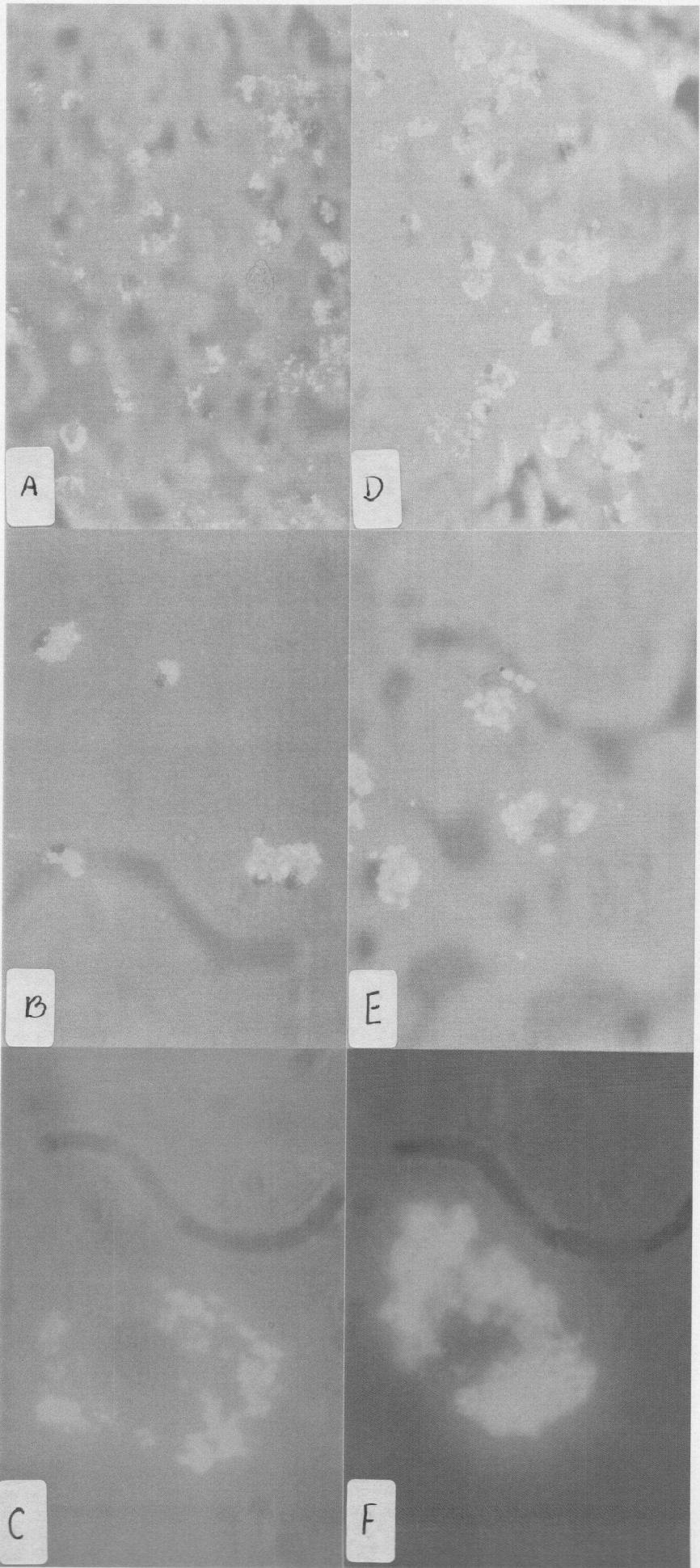


Fig. 5

Figura 5- Ensaio de fagocitose. Leveduras de *P. brasiliensis* marcadas com fluoresceína. Fotos **A, B e C** na ausência de N-acetil-glicosamina, em microscopia ótica fluorescente e luz branca com aumento de 2.000, 4.000 e 10.000 x, respectivamente. Fotos **D, E e F** na presença de N-acetil-glicosamina, com aumento de 2.000, 4.000 e 10.000 x, respectivamente

4-DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A propriedade da jacalina de ligar-se seletivamente a glicoproteínas solúveis (ROQUE BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1985) tem sido utilizada para isolar e caracterizar glicoproteínas com oligossacarídeos O-ligados. Ligantes de jacalina apresentam em sua constituição cadeias de açúcar contendo o dissacarídeo Gal β 1,3GalNAc que em, mamíferos, está presente em virtualmente todos oligossacarídeos O-ligados.

A obtenção de JBE por cromatografia de afinidade em coluna de jacalina do sobrenadante de cultura líquida de *P. brasiliensis* para os isolados BAT, HE, DA e MA, apresentou perfil cromatográfico semelhante ao descrito por GENNARI-CARDOSO (2000) estudo em que foi padronizada essa cromatografia. Somente o isolado MA apresentou valores de D.O. menores par JBE. Mesmo com a modificação do meio cultivado das leveduras de *P. brasiliensis* que, inicialmente foi utilizado meio Negroni Modificado e posteriormente utilizou-se o meio de cultura F-10 acrescido de glicose, houve diferença apenas no período de cultivo: para o meio de Negroni Modificado, a obtenção de JBE no sobrenadante ocorria com 21 dias de cultivo e para o meio F-10 acrescido de glicose, 7 dias foram suficientes para a obtenção de JBE no isolado BAT (Figura 2)

Componentes antigênicos de *P. brasiliensis* apresentam variações ou semelhanças conforme o meio utilizado, tempo de cultivo, forma fúngica, temperatura e cepas utilizadas (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1982).

A análise eletroforética de JBE em SDS-PAGE do isolado BAT após cromatografia em coluna de Sepharose@jacalina, em meios de cultura diferentes mostrou pequena variação na intensidade das bandas obtidas de 190 e 70 kDa (Figura 1), após tratamento com fervura e agente redutor 2-ME. Pode-se observar variação na intensidade de expressão das bandas de 70 e 190 kDa das preparações JBE dos isolados DA, HE e BAT (Figura 3). Quanto a componentes

de 70 kDa de *P. brasiliensis* descritos na literatura, o estudo de PUCCIA et al. (1986), mostrou a presença de bandas de 72 kDa em filtrado de cultura com expressão irregular.

Tem sido mostrado que oligossacarídeos O-ligados a proteínas de superfície celular parecem favorecer interações com outras células. É proposto por JENTOF (1990) que a O-glicosilação proporcione às proteínas da superfície de células uma forma alongada, protuberante em relação ao glicocálix, podendo estender seus sítios ativos para interação com macromoléculas extracelulares ou de outras células, incapazes de penetrar a região da superfície celular. Foi observado no estudo de GENNARI-CARDOSO (2000), através de ensaio imunocitoquímico, a presença de JBE na parede celular de leveduras de *P. brasiliensis*, com maior expressão nas regiões de brotamento.

Diante de tal observação, postulou-se haver alguma interferência de JBE, presente na superfície do fungo, na invasão de células do hospedeiro. No presente estudo, utilizou-se macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c estimulados previamente com meio tioglicolato de Sódio 3%, para ensaio de adesão e fagocitose frente a leveduras de *P. brasiliensis*. Após feita a marcação com fluoresceína e incubação com N-acetil-glicosamina das leveduras de *P. brasiliensis*, obteve-se um maior número de células aderidas e fagocitadas pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (Figura 4 e 5). O trabalho de ODA et al. (1983), mostrou o açúcar específico para uma lectina da superfície de *Sporothrix Schenlii* foi capaz de inibir a fagocitose. Em nosso estudo, tal fenômeno não foi observado. Porém, é conhecido um componente de *P. brasiliensis*, denominada NAG-I, com massa molecular de 205 kDa por Gel Filtração em Sephacril S-200. Esse componente foi definido como uma N-acetil- β -D-glicosaminidase (SOARES et al., 1999).

Postula-se que, a levedura de *P. brasiliensis* em contato com o açúcar específico para essa enzima possa estar interferindo no processo de facilitação da adesão e fagocitose. Por outro lado, consideramos que ensaio com pré-incubação dos macrófagos peritoneais de camundongos BAB/c com N-acetil-glicosamina seja necessário para concluirmos de forma adequada este fenômeno.

O presente trabalho demonstrou a variação na obtenção de JBE em quatro diferentes isolados de leveduras de *P. brasiliensis*, BAT, HE, DA e MA, com menor expressão no isolado MA e maior expressão no isolado BAT e que, a incubação prévia das leveduras de *P. brasiliensis* com o monossacarídeo N-acetil-glicosamina interfere na adesão e fagocitose por

macrófagos peritoneais de camundongos BAB/c, fenômeno observado qualitativamente no microscópio de fluorescência pelo número maior de leveduras aderidas e fagocitadas.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, F.P. (1930) Estudos comparativos do granuloma Paracoccidióico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. *An. Fac. Med. São Paulo*, **5**, 125-141.
- Almeida, S.R., and Lopes, J.D. (2001) The low efficiency of dendritic cell and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **34**, 529-37.
- Almeida, S.R., Unterkircher, C.S., and Camargo, Z.P. (1998) Involvement of the major glycoprotein(gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. *Med. Mycol.*, **36**(6), 405-411.
- Andrieu, S. (1969) Etude antigenique des agents de mycoses profondes par l'analyse compare des milieux de culture. I. *Histoplasma capsulatum* et *H. Duboisii*. Relations avec. *H. farciminosum*, *gymnoascus demonbreunii*, *Blastomyces dermatitidis* et *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*, **39**, 97-108.
- Arango, M., Yarzabal, L.T. (1982) Cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, **79**, 115.
- Bava, J.A., Mistchenko, A.S., Palacios, M.F., Esteves, M.E., Tirabosci, N.I., Negroni, R., and Diez, R.A (1991) Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol- immunol*, **35**, 167.
- Bernard, G., Mendes-Giannini, M.J., Juvenale, M., Miranda E.T., and Duarte, A.J. (1997) Immunossupression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two
- Blumer, S.O., Jalbert, M., and Kaufman, L. (1984) Rapid and reliable method for production of a specific *Paracoccidioides brasiliensis* immunodiffusion test antigen. *J. Clin. Microbiol.*, **19** 404-407.
- Normas do item 5 segundo a revista *Glycobiology*

- Bocca, A.L., Hayashi, E.E., Pinheiro, A.G., Furlanetto, A.B., Campanelli, A.P., Cunha, F.Q., and Figueiredo, F. (1998) Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis* infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell mediated immune response. *J. Immunol.*, **161**(6), 3056-3063.
- Borges-Walmsley, M.I., Chen, D., Shu, X. and Walmsley, A.R. (2002) The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.*, **10** (2), 80-87.
- Boyd, W.C. and Shapleigh, E. (1954) Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, Washington., **119**, 419.
- Brummer, E., Hanson, L.H.; Restrepo, A., and Stevens, D. A. (1989) Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Inf. Immun.*, **57**(8), 2289-2294.
- Burgos, L.C., Cano, L.E., and Restrepo, A. (1985) Purificación de antígenos somáticos del *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudio preliminar. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, **27**(2) 76-81.
- Calich, V.L.G., Burger, E., Kashimo, S.S., Fazioli, R.A., and Singer-Vermes, L.M. (1987) Resistance to *P. Brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. *Infect. Immunol.*, **55**, 1919.
- Calich, V.L.G., Kipnis, T.L., Mariano, M., Fava Neto, C., and Dias, W.D. (1979) The activation of the complement system by a *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **12**, 200-300.
- Calich, V.L.G., Singer-Vermes, L.M., Siqueira, A.M., Burger, E. (1985) Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br. J. Exp. Pathol.*, **66**, 585.
- Calvi, S.A., Peraçoli, M.T.S., Mendes, R.P., Marcondes-Machado, J., Fecchio, D., Marques, S.A. and Soares, A.M.V.C. (2003) Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect.*, **5**, 107-113.
- Camargo, Z.P., Unterkircher, C., Campoy, C.P. and Travassos, L.Q. (1988) Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 21-47.
- Campanelli, A.P., Martins, G.A, Souto, J.T., Pereira, M.S., Livonesi, M.C., Martinez, R. and Silva, J.S. (2003) Faz-Faz ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4

- engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. *J. Infect. Dis.*, **187** (9), 1496-1505.
- Carmona, AK., Puccia, R., Oliveira, M.C., Rodrigue, E.G., Juliano, L., and Travassos, L.R. (1995) Characterization of in exocellular serine-thiol proteinase activity in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Biochem J.*, **209**-14.
- Casotto, M. (1990) Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. *J. Clin. Microbiol.*, **28**(6)1188-1193.
- Castañeda, E (1985). Immunological studies in murine paracoccidioidomycosis. *PhD thesis University of California*, San Francisco..
- Chaves-Borges, F.A., and Mineo, J.R. eds. (1997) *Medidas de biossegurança em laboratório*. EDUFU, Uberlândia, 55p.
- Chequer-Bou-Habib, D., Oliveira-Neto, M.P., Ferreira Da Cruz, M.F., and Galvão-Castro, B. (1989) The possible role of circulating immune complexes in the deficiency of cell mediated immunity in paracoccidioidomycosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **22**, 205.
- Cormack, B.P., Ghorí, N. And Falkow, S. (1999) An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Scienc.*, **285** (5427), 578-582.
- Costa, J.C., Pagnano, P.M.G., Bechelli, L.M., Fiorillo, A.M., and Lima-Filho, E.C. (1983) Lymphocyte transformation test in patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathol.*, **84**, 55-63.
- Diniz, S.N., Cisalpino, P.S., Freire, A.T.F., Silva-Teixeira, D.N., Contigli, C., Rodrigues, V., and Goes, A.M. (2001) *In vitro* granuloma formation, NO production and Cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Human immunol.*, **62**, 799-808.
- Diniz, S.N., Cisalpino, P.S., Koury, M.C., Andrade, G.M., Nogueira, M.G., and Goes, A.M. (1999) *In vitro* human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. *Microbes Infect.*, **1**, 353.
- Fava-Neto, C. (1976) Imunologia da paraoccidioidomicose. *Rev. Inst. Med. Trop.*, **18**, 42.
- Fava-Neto, C. and Rphael, A. (1961) A reação intradérmica com polissacarídeo do *Paracoccidioides brasiliensis*, na blastomicose sul-americana. *Rev. Trop. São Paulo*, **3**, 161.

- Figueroa, J.L., Hamilton, A.J., Allen, M.H. and Hay, R.J. (1995) Isolation and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* 58 KDa extracellular glycoprotein which is recognized by human immune sera. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **89**(5), 566-572.
- Franco, M., and Montenegro, M.R. (1984) Anatomia patológica. In: Del-Negro, G., Lacaz, C.S., and Fiorillo, A.M. eds. *Paracoccidioidomycose (blastomycose sul-americana)*. Savier-EDUSP, São Paulo, pp. 97-117.
- Freitas Da Silva and Roque-Barreira. (1992) Antigenemia in Paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, **30**(2), 381-385.
- Friedman, R.D. (1962) Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrylamide gels. *Annals of Biochemistry.*, **126** (2), 346-349.
- Gennari-Cardoso, M.L. (2000) *Paracoccina: lectina de Paracoccidioides brasiliensis, ligante de N-acetil-glicosamina interage com componentes de matriz extracelular*. Tese de Doutorado (Dpto de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da FMRP/USP).
- Goihman-Yahr, M., Essensfeld-Yahr, E., Albornoz, M.C., Yarzabal, L., Gomez, M.H., San-Martin, B., Ocanto, A., Gil, F., and Convit, J. (1981) Defect of in vitro digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. *Inf. Imm.*, **28**, 557.
- Goldani, L.Z., Monteiro, C.M.C., Donadi, E.A., Martinez, R., and Voltarelli, J.C. (1990) HLA antigens in Brazilian patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, **114**, 89-91.
- Goldstein, I.J., So, L.L., Yang, Y., and Callies, Q.C. (1969) Protein-carbohydrate interaction: the interaction of concanavalina A with IgM and glycoprotein phytohemagglutinins of the maxbean and the soybean. *J. Immunol.*, **103**, 695.
- Gomez, B.L., Figueroa, J.L., Hamilton, A.J., Ortiz, B., Rovledo, M.A., Hay, R.J., and Restrepo, A. (1997) Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J. Clin. Microbiol.*, **35**(12), 3278-3283.
- Gomez, B.L., Figueroa, J.L., Hamilton, A.J., Diez, S., Rojas, M., Tobon, A.M., Hay, R.J. and Restrepo, A. (1998) Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87 kDa determinant during and after antifungal therapy. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, (11), 3309-3316.
- Gonzalez, A., Gregori, W., Velez, D., Restrepo, A., and Cano, L.E. (2000) Nitric Oxide participation in the fungicidal mechanism of Gamma Interferon-Activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect. Immun.*, **68**(5), 2546.

- Hogan, L.H., and Klein, B.S. (1994) Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infect. Immun.*, **62**(8), 3543-3546.
- Jentof, N. (1990) Why are proteins O-glycosylated? **15**, 291-294.
- Jimenez, B.E., and Murphy, J.M. (1984) *In vitro* effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. *Infect. Immun.*, **46**, 552.
- Kanetsuma, F., Carbonell, L.M., Moreno, R.E., and Rodriguez, J. (1969) Cell Wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.*, **97**(3), 1035-1041.
- Kanetsuma, F., Carbonell, L.M., Azuma, I., and Yamamura, Y. (1972) Biochemical studies on thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.*, **110**, 208-218.
- Kashino, S.S., Fazioli, R.A., Cafalli-Favati, C., Meloni-Bruneri, L.H., Vaz, C.A., Burger, E., Singer, L.M., and Calich, V.L. (2000) Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J. Interferon Cytokine Res.*, **20**, 89-97.
- Kerr, I.B., Araripe, J.R., Oliveira, P.C., and Lenzi, H.L. (1988) Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **30**, 366.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Shreckemberger, P.C., and Winn, W.C. eds. (1997) *Color atlas and text book of diagnostic microbiology*. Lippincott, Philadelphia-New York.
- Kurita, N., Oarada, M., Ito, E., and Miyaji, M. (1999) Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology.*, **37**, 261-267.
- Kurokawa, C.S., Sugissaki, M.F., Peraçoli, M.T. (1998) Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, **40**(3), 125-135.
- Laemmli, O.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lopes, J., Moura-Campos, M.C., Vicentiini, A.P., Gesztesi, J.L., Souza, W. and Camargo, Z.P. (1994) Characterization of glycoprotein gp 43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **27** (9), 2309-2313.

- Lowry, O.H., Rosembrough, N.V., Farr, R.V., and Randall, R.J. (1951) Protein measurements with the lofin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lutz, A. (1908) Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyblastomycoses americanas. *Brasil-med.*, **22**, 121-144.
- Mamoni, R.L., Nouer, S.A., Oliveira, S.J., Musatti, C.C., Rossi, C.L., Camargo, Z.P. and Blotta, M.H.S.L. (2002) Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology*, **40**, 153-159.
- Mamoni, R.L., Rossi, C.L., Camargo, Z.P., and Blotta, M.H. (2001) Capture enzyme-linked immunosorbente assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **65**(3), 237-241.
- Mattar-Filho, R., Azedo, M.O., Pereira, M., Jesuino, R.S., Salem-Izacc, S.M., Brito, W.A., Gesztesi, J.L., Soares, R.B., Felipe, M.S. and Soares, C. M. (1997) Expression of glycoprotein gp 43 in stage-specific forms and during dimorphic differentiation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.*, **35** (5), 341-345.
- McEwen, J.C., Brummer, S.D.A., and Restrepo, A. (1987) Effect of messine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **36**(3), 603-608.
- Mendes-Giannini, M.J., Toscano, E., Del-Negro, G.B. Assis, C.M. and Garcia, N.M. (1995) Immunochemical study of a *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide-like antigen. *J. Med. Vet. Mycol.*, **33** (6), 379-383.
- Moscardi-Bacchi, M., Soares, A., Mendes, R., Marques, S., and Franco, M. (1989) *In situ* localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, **27**, 149-158.
- Munk, M.E., Fazioli, R.A., Calich, V.L.G., and Kaufmann, S.H.E. (1995) *Paracoccidioides brasiliensis* - Stimulated human Y/d Teels support antibody production by B cells. *Inf. Immun.*, **63**, 1608-1610.
- Musatti, C.C., Peraçoli, M.T.S., Soares, A.M.V.C., and Rezlallah-Iwasso, M.T. (1994) Cell-mediated Immunity in Patients With paracoccidiomycosis. In: *Paracoccideomycosis*.
- Negróni, R. (1968) Nuevos estudios acerca de antígenos para las pruebas sorológicas en la bastomicosis sudamericana, *Derm. Iberolat. Amer.*, **4**, 409.

- Neworal, E.P.M., Altemani, A, Mamoni, R.L, Noronha, I.L. and Blotta, H.S.L. (2003) Immunocytochemical localization of cytines and inducible nitric oxide syntase in oral mocosa and lymphnodes of patients with Paracoccidioidomycosis. *Cytokine.*, 21, 234-241.
- Oda, L.M., Kubelka, C.K., Alviano, C.S., and Travassos, L.R. (1983) Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Inf. Immun.*, 39(2), 497-504.
- Paracoccidioides brasiliensis glycoprotein that elicit strong humoral immune response. *J. Infect. Dis.*, 175(5), 1263-1267.
- Parise-Fortes, M.R., Da-Silva, M.F., Sugizaki, M.F., Defaveri, J., Montenegro, M.R., Soares, A.M., and Peraçoli, M.T. (2000) Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: funficidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. *Med. Mycol.*, 38(1), 51-60.
- Peraçoli, M.T.S., Fortes, M.R., Silva, M.F., and Montenegro, M.R. (1995) Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the syrian hamster. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 37(2), 129-136.
- Pitzurra, L., Vecchiarelli, A., Peducci, R., Cardinali, A. and Bistoni, F. (1997) Identification of a 105 kDa Cryptococcus neoformans mannoprotein involved in human cell-biding immune response. *J. Med. Vet. Mycol.*, 35, 299-303.
- Popi, A.F., Lopes, J.D. and Mariano, M. (2002) Gp 43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage function. An evasion mechanism of the fungus. *Cellular immunol.*, 218, 87-94.
- Puccia, R., Schernkman, S., Gorin, P.A.J. and Travassos, L.R. (1986) Extracellular componentes of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect. Immun.*, 53 (1), 199-206.
- Puccia, R., Takaoka, D.T. and Travassos, L.R. (1991) Purification of the 43 kDa glycoprotein from extracellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). *J. Med. Vet. Mycol.*, 29 (1), 57-60.
- Puccia, R., Travassos, L. R., Rodrigues, E.G., Carmona, A.K., Oliveira, M.C. and Juliano, L. (1994) Purification of the specific exocellular antigen gp 43 from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological and proteolytic activities. In: MARESCA, B.; KOBAYASHI, G.S. (Ed.) *Molecular biology of pathogenic fungi: a laboratory manual*. New York: Telos Press, p.507-515.

- Restrepo, A., and Vélez, H. (1975) Effect of phagocytosis in vitro on *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*, **13**(1), 1-10.
- Restrepo, A., Greer, D.L., and Vasconcellos M. (1973) Paracoccidioidomycosis. A review. *Rev. Med. Vet. Mycol.* **8**: 97-123, 1973.
- Restrepo, A., Salazar, M.E., Cano, L.E., Stover, E.P. Fildman, D. and Stevens, D.A. (1984) Estrogens inhibits mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.*, **46**, 346.
- Rodrigues, E.G. and Travassos, L.R. (1994) Nature of the reactive epitopes in *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide antigen. *J. Med. Vet. Mycol.*, **32** (1), 77-81.
- Roque-Barreira, M.C., and Campos- Neto, A. (1985) Jacalin: an IgA binding lectin. *J. Immunol.*, v. **134**, 1740.
- San-Blas, F., and San-Blas, G. (1982) Bioquímica y dimorfismo en *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Del-Negro, G, Lacaz, C.S., and Fiorillo, A.M. *Paracoccidioidomycose Blastomicose Sul-Americana*. I - São Paulo, Savier-Edusp, pp.35-58.
- Schaffner, A., Davies, E.E., Schaffner, T., Market, M., Douglas, H., and Braude, AI. (1986) *In vitro* susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J. Clin. Invest.*, **78**, 511.
- Sharon, N. and Lis, H. (1983) Lectins receptors as lymphocyte surface markers. *Adv. Immunol.*, **34**, 213-298.
- Sharon, N., and Lis, H. (1989) Lectins: Cell Recognition molecules. *Science*, **246**, 227-234.
- Shikanai-Yasuda, M.A., Pereira, P.M., Yamashiro-Lanashiro, E., Duarte, M.I.S., Assis, C.M., Geraldés, E.A., and Saldiva, P.H.N. (1997) Lung tissue mechanics in the early stages of induced paracoccidioidomycosis in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **30**, 1175-1179.
- Silva, C.L. and Facioli, R.A. (1985) *Paracoccidioides brasiliensis*, polysaccharide having granuloma-inducing toxic and macrophages-stimulating activity. *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 1497-501.
- Soares, R.B.A., Felipe, M.S.S., Ulhoa, C.J., and Soares, C.M.A. (1999) *Purificação e caracterização de N-acetil-Beta-D-Glicosaminidase do fungo patogênico humano Paracoccidioides brasiliensis*. In: Resumos do VII Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomycose, Campos do Jordão- São Paulo- Brasil. p.197

- San-Blas, F., and San-Blas, G. (1982) Bioquímica y dimorfismo en *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Del-Negro, G, Lacaz, C.S., and Fiorillo, A.M. *Paracoccidioidomicose Blastomicose Sul-Americana*. I - São Paulo, Savier-Edusp, pp.35-58.
- Schaffner, A., Davies, E.E., Schaffner, T., Market, M., Douglas, H., and Braude, AI. (1986) *In vitro* susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J. Clin. Invest.*, **78**, 511.
- Sharon, N. and Lis, H. (1983) Lectins receptors as lymphocyte surface markers. *Adv. Immunol.*, **34**, 213-298.
- Sharon, N., and Lis, H. (1989) Lectins: Cell Recognition molecules. *Science*, **246**, 227-234.
- Shikanai-Yasuda, M.A., Pereira, P.M., Yamashiro-Lanashiro, E., Duarte, M.I.S., Assis, C.M., Geraldes, E.A., and Saldiva, P.H.N. (1997) Lung tissue mechanics in the early stages of induced paracoccidioidomycosis in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **30**, 1175-1179.
- Silva, C.L. and Facioli, R.A. (1985) *Paracoccidioides brasiliensis*, polysaccharide having granuloma-inducing toxic and macrophages-estimulating activity. *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 1497-501.
- Soares, R.B.A., Felipe, M.S.S., Ulhoa, C.J., and Soares, C.M.A. (1999) *Purificação e caracterização de N-acetil-Beta-D-Glicosaminidase do fungo patogênico humano Paracoccidioides brasiliensis*. In: Resumos do VII Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicose, Campos do Jordão- São Paulo- Brasil. p.197
- Souto, P.C., Brito, V.N., Gameiro, J., Cruz-Hofling, M.A and Verinald, L. (2003) Programmed cell death in thymus. *Med. Microbiol. Immunol.*
- Splendore, A. (1912) Un'affezione micotica com localizzazione nella mucosa della boca, osservata in Brasile, determinata da funghi appartenenti alla tribù degli Exoascei (*Zymonema brasiliense* n. sp) In: volume in onore del Prof. Angelo Celli nel 25° anno di insegnamento. Roma, G. Bertero, 412-458.
- Stover, E.P., Schar, G., Clemons, K.V., Stevens, D.A., Feldman, D. (1986) Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Infect. Immunol.*, **51**, 199.
- Sugizaki, M.F., Peraçoli, M.T.S., Mendes-Giannini, M.J., Soares, A.M.V.C., Kurokawa, C.S., Mendes R.P., Marques, S.A., and Freire-Maia, D.V. (1999) Correlation between

- antigenemia of *Paracoccidioides brasiliensis* and inhibiting effects of plasma in patients with paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, **37**, 277-284.
- Urquiola, G., Gohman-Yarh, M., Bastardo-De-Albornoz, M.C., Isturiz, G., Vilorio, N., Saavedra, N., Carrasqueiro, M., Pereira, J., Gomez, M.H., and Roman, A. (1993) Specific digestive deficiency of phagocytes in paracoccidioidomycosis. Its absence in peripheral blood neutrophils of members of the nuclear family of patients. Na initial report. *Mycoses.*, **36**, 283-287.
- Vardar-Unlu, G., McSharry, C. and Douglas, L.G. (1998) Fucose-specific adhesins on germ tubes of *Candida albicans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **20** (1), 55-67.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J. eds. (1999) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 85-114.
- Vicentini, A.P., Gesztesi, J.L., Franco, M.F., Souza, W., Moraes, J.Z., Travassos, L.R. and Lopez, J.D. (1994) Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp 43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect. Immun.*, **62**, (4), 1465-1469.
- Yarzabal, L. (1982) Composicion atigénica de *Paracoccidioides brasiliensis*, p. 59-67. In: G. Del Negro, C.S. Lacaz e A.M Fiorilo (ed.), Paracoccidioidomycose. Blastomycose sul-americana. *Sarvier-EDUSP*, São Paulo, Brazil.
- Yarzabal, L., Biguet, J., Vaucelle, T. Andrieu, S., Torres, J.M., and Da Luz, S. (1973) Análisis immunoquímico de extractos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*, **11**, 80-88.

