

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise comparativa de preparações antigênicas obtidas a partir de isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, Pb BAT e Pb 18, na detecção de anticorpos IgG em amostras de soros de pacientes com paracoccidioidomicose

Melina Menezes Campos

UBERLÂNDIA – MG
JULHO - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise comparativa de preparações antigênicas obtidas a partir de isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, Pb BAT e Pb 18, na detecção de anticorpos IgG em amostras de soros de pacientes com paracoccidioidomicose

Melina Menezes Campos

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Monografia apresentada à Coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

UBERLÂNDIA – MG
JULHO - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise comparativa de preparações antigênicas obtidas a partir de isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, Pb BAT e Pb 18, na detecção de anticorpos IgG em amostras de soros de pacientes com paracoccidioidomicose

Melina Menezes Campos

Aprovado pela Banca Examinadora em / / . Nota:

Dr. José Roberto Mineo
Orientador

Dr. Adriano Mota Loyola
Membro da Banca Examinadora

Dr. Paulo Rogério de Faria
Membro da Banca Examinadora

Uberlândia, de de 2007.

*Sim, todo amor é sagrado
E o fruto do trabalho
É mais que sagrado, meu amor...*

(Beto Guedes - Ronaldo Bastos)

Agradecimentos

A Deus, que sempre me abençoa com sua luz, dando-me força e coragem para enfrentar as provas necessárias à minha evolução.

A minha família pelo apoio moral e material que são fundamentais em minha vida.

A meu namorado pela paciência e compreensão em todos os momentos de ansiedade.

Aos meus amigos pelo companheirismo e pela atenção.

A meu orientador, Dr. José Roberto Mineo, pela confiança depositada, pelo exemplo de profissionalismo, e por toda atenção e paciência diante de minhas limitações.

A minha co-orientadora, Dra. Margareth Leitão Gennari Cardoso, por ter me apresentado essa linha de pesquisa, confiando-me muitos ensinamentos, mesmo na distância.

Aos membros da banca examinadora que se dispuseram a participar deste fechamento de mais uma etapa de aprendizado.

A toda a equipe do Laboratório de Imunoparasitologia, professores, secretário, técnicos e pesquisadores pela preciosa colaboração diária.

A pessoas fundamentais nesta pesquisa, Samantha, Taísa, Gabriele, Cristiane, Jorge, Dâmaso, Leandro e Priscila, que sempre estiveram prontas a ajudar, ensinando-me muito.

Enfim, a todos aqueles que de certa forma contribuíram para a construção deste trabalho incentivando meu crescimento profissional e pessoal.

Muito obrigada...

Resumo

Paracoccidioides brasiliensis é o agente etiológico de uma das principais micoses sistêmicas da América Latina, a paracoccidioidomicose (PCM). Estudos mostraram a importância de se isolar componentes fúngicos para o desenvolvimento de ensaios sorológicos. Neste sentido, este estudo analisou 2 isolados, Pb BAT e Pb 18, em 3 preparações antigênicas distintas Pb BAT, Pb BAT-JBE e Pb 18; e teve como objetivos: isolar JBE (*Jacalin Binding Exoantigen*) de *Paracoccidioides brasiliensis* proveniente do sobrenadante de cultura líquida de leveduras por cromatografia de afinidade em coluna de jacalina imobilizada, fazer uma análise comparativa entre as preparações por ELISA e *immunoblotting*, utilizando-se amostras de soros provenientes de pacientes com suspeita de paracoccidioidomicose, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia – UFU/MG, e reconhecer a preparação de antígenos mais representativa para testes sorológicos utilizados no diagnóstico de PCM.

A fração JBE foi caracterizada pela presença de bandas de 70 e 190 kDa em condições redutoras quando realizado SDS-PAGE. No teste ELISA houve alto índice de positividade das amostras de soros com a preparação Pb 18 (84,2 %), sendo um índice significativo quando comparados aos de Pb BAT e Pb BAT-JBE. De acordo com o teste *immunoblotting*, a reatividade em Pb BAT-JBE foi bastante expressiva ao apresentar a banda de 190 kDa evidente em todas as 6 amostras de soros testadas. Na preparação Pb 18 as bandas de 24, 43, 70 e 95 foram reativas em 2 amostras e em Pb BAT as de 64 e 160 kDa destacaram-se em 3 amostras de soros.

Diante deste estudo foi possível destacar as características distintas de 3 preparações antigênicas, o que incentiva novos estudos de exoantígenos purificados (Pb BAT-JBE) e antígenos somáticos no sentido de disponibilizar componentes isolados que propiciem o desenvolvimento de ensaios, cujas sensibilidades e especificidades, lhes atribuam importância no diagnóstico e no monitoramento de pacientes com PCM.

Palavras-chaves: *Paracoccidioides brasiliensis*, JBE, ELISA, *Immunoblotting*.

Sumário

1- Introdução.....	1
1.1- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> : aspectos gerais e morfológicos.....	1
1.2- Paracoccidioidomicose: ecoepidemiologia.....	2
1.3- Paracoccidioidomicose: transmissão, formas clínicas da doença e defesa imunitária.....	3
1.4- Antígenos de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	5
1.5- Exoantígeno glicosilado de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	6
2- Material e Métodos.....	8
2.1- Amostras de soros.....	8
2.2- Cultivo de leveduras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e obtenção de antígenos.....	9
2.2.1-Amostras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	9
2.2.2- Condições de cultivo das leveduras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> isolado BAT.....	9
2.2.3- Obtenção de antígenos somáticos de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , isolado Pb 18.....	9
2.2.4- Obtenção de exoantígeno de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , isolado BAT.....	10
2.2.5- Obtenção de exoantígeno ligante de jacalina (JBE) de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , isolado BAT.....	10
2.3- Análise de exoantígenos de Pb BAT, Pb BAT-JBE e Pb 18 por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	11
2.4- ELISA.....	11
2.5- <i>Immunoblotting</i>	12
2.6- Análises estatísticas.....	12
2.7- Normas de biossegurança.....	12
3- Resultados.....	13
3.1- Cromatografia de afinidade para obtenção de Pb BAT-JBE e rendimento das preparações antigênicas.....	13
3.2- Análise de perfis eletroforéticos das preparações antigênicas.....	14
3.3- ELISA.....	17

3.4- <i>Immunoblotting</i>	21
4- <i>Discussão e Conclusão</i>	24
5- <i>Referências Bibliográficas</i>	29
<i>Anexo 1</i>	39
<i>Anexo 2</i>	40

1 – Introdução

1.1 – *Paracoccidioides brasiliensis*: aspectos gerais e morfológicos

Paracoccidioides brasiliensis (SPLENDORE, 1912; ALMEIDA, 1930), pertencente ao Reino Fungi, Filo ou Divisão Ascomycota, Classe Plectomycetes, Ordem Onygenales, Família Onygenaceae (SAN-BLAS *et al.*, 2002), é um fungo assexuado e termodimórfico, apresenta-se na forma micelial a 25°C e leveduriforme a 37°C e, é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM). Esta por sua vez, é uma micose profunda e predominante na América Latina, com alta incidência no Brasil (FRANCO *et al.*, 1987). 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.

A forma micelial apresenta parede celular, medindo 80-150 μm , composta por camadas de β -1,3-glucana sobre a membrana plasmática. De modo distinto, as leveduras apresentam mucopolissacarídeos, hexoses, na extremidade da parede celular, variando de 200 a 600 nm, composta por α -1,3-glucana, sobre a membrana citoplasmática. Os septos dos micélios são formados por parede celular. *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo que pode ser multinucleado tanto na fase micelial quanto na leveduriforme. As organelas são as mesmas para ambas as formas. O crescimento vegetativo da hifa ocorre no ápice onde a parede celular é mais espessa. Este fungo, na forma micelial, também produz uma variedade de propágulos, dependendo das condições do meio. Um possível constituinte transicional entre as duas formas citadas é a forma de conidia (QUEIROS-TELLES, 1994).

1.2- Paracoccidioidomicose: ecoepidemiologia

A PCM representa um importante problema de Saúde Pública devido ao seu alto potencial incapacitante e à quantidade de óbitos que provoca, principalmente a trabalhadores ligados a atividades agrícolas. Os indivíduos acometidos por esta micose, usualmente, encontram-se na fase mais produtiva da vida, sendo assim, a doença leva a um impacto social e econômico (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

O habitat natural de *Paracoccidioides brasiliensis* ainda não foi estabelecido, porém sabe-se que seu desenvolvimento ocorre em solos úmidos, ricos em matéria orgânica, com poucas variações de temperatura e coberto por vegetação (FRANCO *et al.*, 2000).

Na natureza, *Paracoccidioides brasiliensis* apresenta-se como estruturas filamentosas, contendo propágulos infectantes chamados conídios. Quando inalados, os propágulos dão origem a formas leveduriformes que constituirão sua forma parasitária no tecido do hospedeiro. Os seres humanos eram considerados os únicos hospedeiros naturalmente infectados, mas recentemente, tatus foram encontrados como portadores da doença (RESTREPO-MORENO, 1994; LACAZ *et al.*, 2002).

Nas últimas décadas, notáveis alterações têm sido observadas na frequência, nas características demográficas da população atingida e na distribuição geográfica da PCM. É possível que o aumento da urbanização, a melhoria no diagnóstico e fatores ambientais decorrentes da abertura de novas fronteiras agrícolas expliquem, em partes, essas alterações (VALLE *et al.*, 1992; WANKE & LONDERO, 1994).

Uma vez que a PCM não é uma doença de notificação compulsória, não há dados precisos sobre sua incidência. Na América do Sul, a maioria dos casos ocorre no Brasil (FRANCO *et al.*, 1989), porém há relatos de ocorrência na Colômbia, Venezuela, Chile, Guiana, Guiana Francesa e Suriname (LONDERO & DEL-NEGRO, 1986; BRUMMER *et al.*, 1993). Após 1990, foram reportados casos na Europa e nos Estados Unidos, provavelmente de viajantes que visitaram a América do Sul (AJELLO & POLONELLI, 1985).

A incidência varia de 3 a 4 novos casos/milhão até 1 a 3 novos casos por 100 mil habitantes ao ano em áreas endêmicas. Autores apontam a PCM como oitava causa de mortalidade por doença infecciosa predominantemente crônica entre as doenças infecciosas e parasitárias (COUTINHO *et al.*, 2002).

Com relação à distribuição entre os gêneros, o acometimento de PCM em adultos varia entre 10 a 15 homens para 1 mulher infectada. Tal fato é explicado pela inibição de hormônios femininos (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 tecido do hospedeiro (RESTREPO *et al.*, 1984). A PCM não é usualmente relacionada a doenças imunodepressoras, porém há casos desta micose associada a neoplasias e transplantes de órgãos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Em pacientes imunocomprometidos, principalmente devido à AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), a PCM também não corresponde a uma intercorrência freqüente (GOLDANI & SUGAR, 1995), porém alguns casos foram relatados.

1.3- Paracoccidioidomicose: transmissão, formas clínicas da doença e defesa imunitária

Infecções com *Paracoccidioides brasiliensis* iniciam-se pela inalação de fragmentos miceliais ou de conídias do solo. Estes se transformam em leveduras, no pulmão, poucas horas após a inalação, segundo observações feitas em modelo experimental em camundongos (McEWEN *et al.*, 1987). Não há evidências de transmissão humano-humano de PCM (ALMEIDA *et al.*, 2003). Um grande espectro de manifestações clínicas, patológicas e imunológicas pode ser observado nos pacientes infectados.

Dentre as formas clínicas propostas recentemente, inclui-se desde infecções assintomáticas, compreendendo o maior grupo de indivíduos infectados, até formas clínicas polares, denominadas de Forma Progressiva Crônica ou Adulta (FC) e Forma Aguda ou Juvenil (FA) (FRANCO *et al.*, 1987).

A forma progressiva crônica ou adulta (FC) da doença responde por mais de 90% dos pacientes, afetando predominantemente homens adultos entre 30 e 60 anos. É também conhecida como PCM hiperérgica, pois tem um curso benigno, progredindo lentamente, podendo levar anos até que seja diagnosticada. Além disso, o padrão de resposta imunológica é do tipo Th1, com imunidade celular preservada, formação de granulomas compactos e baixos níveis de reatividade de anticorpos (ALMEIDA *et al.*, 2003). Há alta freqüência de envolvimento pulmonar, de mucosas, cutâneo e adrenal. Pode ser caracterizada por duas formas de apresentação: a unifocal e a multifocal. É

considerada uma apresentação unifocal quando a micose está restrita a somente um órgão. Os pulmões podem ser o único órgão afetado em até 25% dos casos. Geralmente, a doença envolve mais de um órgão simultaneamente, considerando-se a apresentação multifocal (GIRALDO *et al.*, 1976; FRANCO *et al.*, 1987; FRANCO *et al.*, 1989; BERNARD & DUARTE, 2000; MENDES & SHIKANAI-YASUDA, 2003).

Em contraste, a forma aguda ou juvenil (FA) é responsável por 3 a 5% dos casos da doença, predominando em pacientes jovens (crianças e adolescentes, eventualmente, acomete indivíduos de até 35 anos de idade) de ambos os sexos e é caracterizada por envolvimento do sistema linfático, hepatoesplenomegalia e outras formas de envolvimento visceral (GIRALDO *et al.*, 1976; FRANCO *et al.*, 1987; FRANCO *et al.*, 1989; BERNARD & DUARTE, 2000; MENDES & SHIKANAI-YASUDA, 2003). Pacientes com PCM aguda apresentam a forma clínica mais severa da doença, caracterizada tipicamente por altos níveis de anticorpos específicos, ativação policlonal de células B, antigenemia e diminuição da resposta imune celular (RESTREPO, 1985; BRUMMER *et al.*, 1993; DEL-NEGRO *et al.*, 1994), evidenciando um padrão de resposta imunológica Th2. O padrão da resposta granulomatosa difusa está associada à supressão de células T (DINIZ *et al.*, 1999).

As diferentes manifestações da doença estão associadas a vários fatores, alguns próprios do parasita, como sua virulência e patogenicidade, e outros do hospedeiro, como susceptibilidade genética à infecção e estado imunitário. Os critérios de gravidade (leve, moderado e grave) são subjetivos, podendo variar conforme a análise individual do clínico (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). A virulência e patogenicidade da isolado infectante são determinadas por componentes químicos presentes na parede celular, os mais frequentemente mencionados são os lipídeos e os polissacarídeos (SILVA & FAZIOLI, 1985), em destaque o α -1,3-glucano (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1977; ZACHARIAS *et al.*, 1986), e mais recentemente, as proteases como a gp43 (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1990). Há muitos estudos que sugerem que a gp43 tanto favoreça a virulência quanto se contraponha aos mecanismos de resposta protetora do hospedeiro (VICENTINI *et al.*, 1994; LOPES *et al.*, 1994).

O contato inicial de *Paracoccidioides brasiliensis* com o hospedeiro se faz através das células fagocíticas, que constituem um importante compartimento da defesa inata do organismo. Essas participam da reação granulomatosa da PCM, que envolve ainda células epitelióides e gigantes multinucleares, matriz celular organizada (KERR *et al.*, 1988), além de linfócitos T e outras células (MOSCHARDI-BACHI *et al.*, 1989).

Assim, o controle da infecção depende de resposta imune celular efetiva, geralmente associada ao padrão Th1 da resposta imunológica. Pacientes infectados que evoluem para doença apresentam depressão da resposta Th1, o que tem sido atribuída aos fatores séricos produzidos pelo hospedeiro (COSTA *et al.*, 1983), anticorpos específicos (CASTAÑEDA, 1985), complexos imunes e populações de células supressoras (SUGIZAKI *et al.*, 1999). Neste contexto, formas mais graves evoluem com predomínio de resposta imunológica Th2, onde há maior ativação de linfócitos B e altos níveis de reatividade de anticorpos específicos (BERNARD & FRANCO, 2005).

A detecção de anticorpos específicos nos soros tem sido uma das principais ferramentas para diagnóstico de paracoccidiodomicose, e pode ser utilizada no monitoramento da evolução da doença e na sua resposta ao tratamento (MENDES-GIANINI *et al.*, 1994). Os testes sorológicos comumente utilizados para diagnóstico são: imunodifusão (CAMARGO *et al.*, 1988), ELISA (CAMARGO *et al.*, 1984; CAMARGO *et al.*, 1989; MENDES-GIANNINI *et al.*, 1990), contraímunoeletroforese (CONTI-DIAZ *et al.*, 1978) e *Immunoblotting*.

1.4- Antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*

Existem vários isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, dentre eles: BAT e Pb-18. Estes apresentam diferentes antígenos segundo PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2003.

Os antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* incluem componentes constitutivos e produtos liberados pelo fungo. Dentre eles, muitos são imunogênicos, o que já justifica o investimento em seu estudo. Os procedimentos para obtenção de componentes de *Paracoccidioides brasiliensis* são de dois tipos principais (NEGRONI, 1968; YARZÁBAL, 1982; RESTREPO *et al.*, 1984; CAMARGO *et al.*, 1988). A coleta de sobrenadante da cultura em meio líquido, após a filtração, proporciona preparação de exoantígenos fúngicos. O tratamento químico ou ruptura mecânica das células fúngicas fornece antígenos somáticos ou metabólicos.

Entre os antígenos utilizados em métodos sorológicos, a gp43 é o principal componente estudado de *Paracoccidioides brasiliensis* (PUCCIA *et al.*, 1986; CAMARGO *et al.*, 1989; BLOTTA & CAMARGO, 1993; CISALPINO *et al.*, 1996;). A cinética de liberação da gp43 em cultura demonstrou ser esta molécula continuamente secretada pelas leveduras na fase exponencial de crescimento (pico máximo de liberação detectado no sétimo dia de cultura), caindo bastante na fase estacionária

(queda acentuada no vigésimo quinto dia e níveis quase indetectáveis no trigésimo dia), o que pode indicar a degradação dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos usados na sua detecção (CAMARGO *et al.*, 1988; STAMBUK *et al.*, 1988).

O estudo dos antígenos fúngicos tem aberto perspectivas no sentido de disponibilizar componentes isolados que propiciem o desenvolvimento de ensaios, cujas sensibilidades e especificidade, lhes atribuem importância no diagnóstico ou no acompanhamento de pacientes com PCM. Anticorpos séricos em pacientes com PCM, específicos para a gp43 têm sido demonstrados (TABORDA & CAMARGO, 1993). Esses anticorpos foram caracterizados como sendo isotipos G, A, E e M. IgG e IgA são detectados em todas as formas da doença.

Embora muitos ensaios utilizando a gp43 serem aplicados no diagnóstico da infecção da paracoccidioidomicose, outros antígenos devem ser considerados. O estudo realizado por PANUNTO-CASTELO *et al.* (2003), mostrou a presença de diferentes bandas de exoantígeno de levedura de *Paracoccidioides brasiliensis* reagentes com IgG de soros de pacientes com PCM ativa. As bandas de 70 e 160 kDa, juntamente com a gp43 foram as que apresentaram maior reconhecimento pelo soro dos pacientes.

1.5- Exoantígeno glicosilado de *Paracoccidioides brasiliensis*

Segundo FREITAS-DA-SILVA (1996), o maior número de componentes antigênicos por amostra foi detectado na preparação de exoantígenos do isolado BAT, havendo 23 componentes, com massas moleculares entre 20 e 160 kDa. Estudos prévios do nosso laboratório, da disciplina de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia – MG, juntamente com o laboratório de Glicobiologia e Biologia Celular da Dra. Maria Cristina Roque-Barreira da Faculdade de Medicina da USP – RP têm mostrado a presença de componentes antigênicos de 190 e 70 kDa de uma preparação de exoantígenos proveniente de interação do sobrenadante de cultura de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* ligante de uma lectina de *Arthocarpus integrifolia*, denominada jacalina. Tal preparação foi denominada **JBE (Jacalin Binding Exoantigen – antígeno ligante de jacalina)** e contém bandas de 70 e 190 kDa (COLTRI *et al.*, 2006).

A preparação **JBE** é resultado do isolamento de glicoconjugado por cromatografia de afinidade em coluna de lectina imobilizada (jacalina). Esse exoantígeno está presente em pequena quantidade no fungo, mas tem alta

imunogenicidade, uma vez que foi reconhecido em todos os soros de pacientes testados por GENNARI-CARDOSO, 2000.

O presente estudo teve como objetivos (1) isolar **JBE** (*Jacalin Binding Exoantigen*) de *Paracoccidioides brasiliensis* proveniente do sobrenadante de cultura líquida de leveduras por cromatografia de afinidade em coluna de jacalina imobilizada, (2) fazer uma análise comparativa entre: exoantígenos de Pb BAT, exoantígenos ligantes de jacalina de Pb BAT (fração JBE) e antígenos somáticos de Pb-18 por SDS-PAGE, ELISA e *Immunoblotting*, utilizando-se amostras de soros provenientes de pacientes com suspeita de paracoccidioidomicose, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia – UFU/MG, e (3) reconhecer a preparação de antígenos mais representativa para testes sorológicos utilizados no diagnóstico de PCM.

2- Material e Métodos

Os experimentos do presente trabalho foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia durante os anos de 2006 e 2007, de acordo com os passos que se seguem.

2.1 – Amostras de soros

As amostras de soros foram cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Simão Ferreira, provenientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia UFU/MG. Foram utilizadas 38 amostras de soros de pacientes com diagnóstico clínico suspeito de PCM. Além disso, também foram utilizadas 20 amostras de soros humanos de cordão umbilical para controle, obtidas junto ao Prof. Dr. José Roberto Mineo. Esse estudo obteve a aprovação do Conselho de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, de acordo com a Resolução CNS 196/96-Parecer nº 007/07 (Anexo 1).

Todos os pacientes analisados eram adultos, a maioria do sexo masculino, que moraram ou trabalharam em zona rural na região do Triângulo Mineiro. Das amostras testadas apenas 42,1% (n = 16) possuíam diagnóstico definido (positivo ou negativo para PCM), as outras 57,9% (n = 22) ou não possuíam diagnóstico definido ou não foi possível o acesso ao prontuário correspondente por falta de informações nos rótulos dos soros.

2.2 - Cultivo de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* e obtenção de antígenos

2.2.1- Amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*

Foram utilizados dois isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* denominados: Pb 18 e BAT. O isolado BAT foi recuperado de lesões de paciente com Paracoccidioidomicose em fase aguda, atendido no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) e 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 isolado Pb 18 vem sendo cultivado e estudado no mesmo laboratório. Os fungos foram enviados na forma de leveduras em meio Sabouraud-Dextrose-Ágar (Difco - Laboratories, Detroit, Mich., EUA), acrescido de 0,01 % de tiamina (Difco - Laboratories, Detroit, Mich., EUA), a 35 °C. Repiques foram feitos a cada quinze dias em meio YPD sólido (0,5% extrato de levedura, 0,05% de peptona, 1,5% de D (+) glicose, 2,0% ágar), como descrito por RAY *et al.* (1992) com modificações.

2.2.2 - Condições de cultivo das leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* isolado BAT

Após sete dias de crescimento em meio YPD sólido, a massa de leveduras de Pb BAT foi repicada em 100 mL de meio de cultura YPD líquido (0,5% extrato de levedura, 0,05% de peptona, 1,5% de D (+) glicose), e mantido a 35 °C numa câmara giratória a 80 rpm por dezoito dias.

2.2.3- Obtenção de antígenos somáticos de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb 18

Após sete dias de crescimento em meio YPD sólido, as leveduras do isolado Pb 18 foram suspensas em 2 mL de PBS (salina tamponada com fosfato, pH 7,2) estéril contendo inibidores de protease (aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 50 µg/mL e PMSF a 1,6 mM). Em seguida foram realizados 15 ciclos de congelamento e descongelamento em N₂ líquido e banho-maria a 37°C. O extrato antigênico foi então submetido a 6 ciclos

de 1 minuto em ultra-som e posteriormente macerado em N₂ líquido. Após esse processo a suspensão foi centrifugada a 8.000 g a 4°C por 15 minutos e armazenada a -20°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de LOWRY *et al.* (1951).

2.2.4- Obtenção de exoantígeno de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado BAT

Após o período de cultivo das leveduras como descrito no item 2.2.2, o crescimento das células fúngicas foi paralisado através da adição de 0,01% digluconato de clorexidina (DM Ind. Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil.), por 18 hs a 4 °C. O sobrenadante de cultura líquida foi filtrado em papel de filtro Whatman n° 3 (Whatman International Ltda – Maidstone, England) e, em seguida, foi adicionado 1 mM do inibidor enzimático PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil - Sigma Chemical Co, St.Louis, EUA).

O filtrado foi concentrado em membrana YM-30 (Amicon - Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA) e dialisado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M pH 7,2, a 4 °C. Após diálise, a solução foi centrifugada por 4 minutos a 8000 g para clarificação.

2.2.5 – Obtenção de exoantígeno ligante de jacalina (JBE) de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado BAT

Em coluna de 5 mL de Sepharose®-Jacalina (coluna gentilmente cedida pelo laboratório da Dra. Maria Cristina Roque Barreira, FMRP-USP), equilibrada com PBS 0,01 M pH 7,2, foram aplicados 3,0 mL da preparação de exoantígeno. A preparação permaneceu incubada durante 5 horas, a 4 °C, sob agitação lenta. Após esse período, a coluna, mantida a 4 °C, foi lavada exaustivamente com PBS 0,01 M pH 7,2, coletando-se frações de 2 mL, que foram submetidas a leitura em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, Brasil) com absorvância em 280 nm, até que a mesma fosse inferior a 0,02. O material adsorvido à coluna foi eluído com D-galactose (Sigma, Chemical Co, St. Louis, EUA) a 0,4 M em PBS 0,01 M pH 7,2, coletando-se frações de 2 mL a cada 2 minutos, monitoradas pela leitura em espectrofotômetro até que o valor chegasse a zero. O material ligante, eluído da coluna, foi concentrado em membrana YM-30 e posteriormente dialisado em solução salina tamponada com fosfato (PBS).

2.3 - Análise de exoantígenos de Pb BAT, Pb BAT-JBE e Pb 18 por eletroforese em gel de poliacrilamida

Os antígenos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) num gradiente de 8 % (LAEMMLI,1970). As preparações foram diluídas em tampão de amostra {SDS (Sigma, Chemical Co, St. Louis, EUA) a 1 %, Tris-HCl (Sigma, Chemical Co, St. Louis, EUA) pH 6,8 e glicerol a 50 %}, submetidas a tratamento redutor na presença de 2% de 2-mercaptoetanol (LKB, Produktet AB, Bromma, Sweden), seguido de aquecimento a 100°C por 5 minutos, e aplicadas no gel na concentração de 12 µg. O gel foi colocado num sistema de eletroforese vertical (mini-V 8.10, BRL, Life Technologies, Inc.), sob 250 volts constantes, com corrente de 20 mA, durante 80 minutos. A presença de componentes protéicos foi revelada pela coloração com nitrato de prata otimizada (BLUM *et al.*, 1987) e os seus pesos moleculares aparentes foram determinados com base na linha de calibração estabelecida pela migração de proteínas com peso molecular (Sigma marker wide ranger – M.W. 6,500-205,00 – Sigma).

2.4 – ELISA

Neste ensaio, microplacas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar® 3590, New York, EUA) foram sensibilizadas com 2 µg/mL das preparações: Pb BAT, Pb BAT- JBE e Pb-18, diluídos em tampão carbonato (pH 9,6) e incubados a 4°C por 18 horas. As placas foram lavadas com PBS-Tween 20 (0,05%) e bloqueadas com soro normal de cabra 5% em PBS-T, durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguiram-se 3 lavagens sucessivas e foram acrescidas as amostras de soros dos pacientes positivos e negativos para PCM, diluídas 1:100 em solução soro normal de cabra 5% e PBS-T. Após incubação por 2 horas a 37°C, as placas foram lavadas 6 vezes e foi adicionado conjugado enzimático anti-IgG humano/peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em diluição de 1:1500 em solução soro normal de cabra 5% e PBS-T. As placas foram incubadas em 37°C por mais 1 hora, lavadas novamente e reveladas pela adição de OPD (1,2-phenylendiamin, Merck) como substrato. A absorbância foi determinada em 492 nm no leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Genebre, Suíça) após a paralisação da reação com ácido sulfúrico (2N H₂ SO₄). O critério de positividade foi definido de acordo com o

Índice ELISA (IE), no qual $IE = \text{média aritmética dos valores de absorbância de amostras de soros negativos, acrescentando-se ao valor, três desvios padrão da média}$; e Índice Sinal Ruido (ISR), no qual $ISR = \text{média das absorbâncias positivas dividida pela média das absorbâncias negativas}$.

2.5- Immunoblotting

As membranas de nitrocelulose previamente transferidas com as preparações: Pb BAT, Pb BAT-JBE e Pb 18 foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras de soros humanos positivas e negativas para PCM foram adicionadas em diluição de 1:50 em PBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado e incubadas por 18 horas a 4°C. Após lavagens com PBS-T e PBS 0,01M durante 5 minutos, as tiras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com conjugado enzimático anti-IgG humano/peroxidase, diluído 1:1000 em PBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado. Novas lavagens foram feitas e a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático DAB (Sigma FastTM 3,3-diaminobenzidine tablet sets, Sigma Chemical Co., EUA) e interrompida pela adição de água destilada, assim que as bandas foram visualizadas.

2.6- Análises estatísticas

As análises estatísticas, para obtenção dos resultados, foram realizadas em software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism v. 4.0, GraphPad Software, Inc.). Foi utilizado o teste paramétrico Qui-quadrado, com índice de significância $p < 0,05$.

2.7- Normas de biossegurança

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

3-Resultados

Foram avaliadas três preparações antigênicas de dois isolados, Pb BAT, Pb BAT-JBE e Pb 18 a fim de identificar a preparação mais significativa em testes sorológicos. Após 7 dias de cultivo em meio sólido as preparações foram obtidas de diferentes formas: Pb BAT por meio de diálises e concentrações de meio de cultura líquido; Pb BAT-JBE através de cromatografia de afinidade do sobrenadante da cultura do isolado BAT de *Paracoccidioides brasiliensis*; e Pb 18 por meio de ciclos de congelamento e descongelamento com posterior sonicação.

3.1 –Cromatografia de afinidade para obtenção de Pb BAT-JBE e rendimento das preparações antigênicas

Durante o trabalho foram obtidos 15 litros (n = 30) de meios de cultura líquida de *Paracoccidioides brasiliensis* do isolado BAT, que foram devidamente preparados e cromatografados para a obtenção do extrato antigênico.

Como exemplo do resultado da cromatografia de afinidade, demonstra-se abaixo, na Figura 1, o material ML 3 (terceiro meio de cultura líquido obtido) eluído da coluna após 18 dias de cultura. O perfil cromatográfico apresentou um primeiro pico de densidade ótica chegando a 1,88, e sua posterior queda até o valor de 1,23 - fase correspondente à eluição com PBS. Na fase que corresponde a eluição com D-gal, a curva demonstrou um pico mais alto, próximo a 1,06, e apresentou também pequenas

variações de absorvância dentro de valores positivos, porém menores que 0,25. É nessa fase, de eluição de D-gal, que se caracteriza a obtenção de JBE.

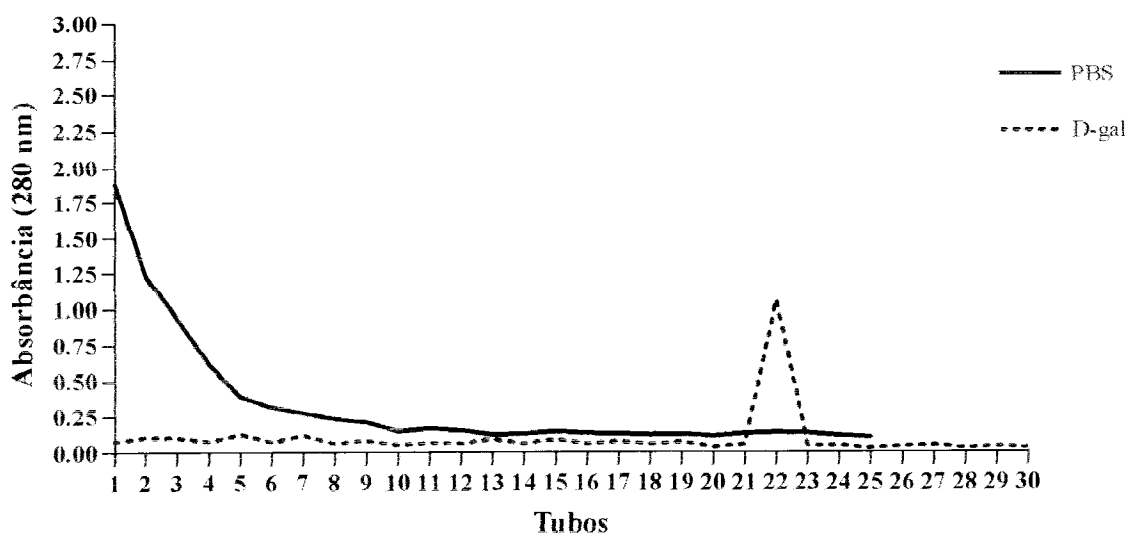


Figura 1. Cromatografia de afinidade do sobrenadante de cultura de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, após concentração e diálise, para obtenção da fração JBE.

As concentrações protéicas das preparações antigênicas Pb BAT, Pb BAT-JBE e Pb 18, segundo o método de LOWRY *et al.* (1951), foram, respectivamente: 341 $\mu\text{g/mL}$, 121 $\mu\text{g/mL}$ e 994 $\mu\text{g/mL}$.

O rendimento do material purificado, quando comparado com as outras preparações antigênicas é baixo, como mostra a Figura 1, na qual as leituras de absorvâncias são extremamente baixas para a obtenção de JBE no meio de cultura. A preparação JBE contém glicoproteínas, o que é comprovado pela afinidade de seus componentes antigênicos à jacalina, lectina ligante de resíduos de D-galactose.

3.2 -Análise de perfis eletroforéticos das preparações antigênicas

Os perfis eletroforéticos das preparações antigênicas analisadas mostraram-se diferentes. A Figura 2 demonstra a mobilidade dos componentes protéicos identificados em SDS-PAGE. A fração ligante JBE origina uma banda de 190 kDa, freqüentemente

associada com componente de 70 kDa. A preparação Pb BAT apresentou mais proeminentes as bandas de 160 kDa, 60 kDa, 54 kDa e 43 kDa. Já a preparação da isolado Pb 18 apresentou os seguintes componentes protéicos: 64 kDa, 43 kDa, 30 kDa, 28 kDa, e outras de menores valores.

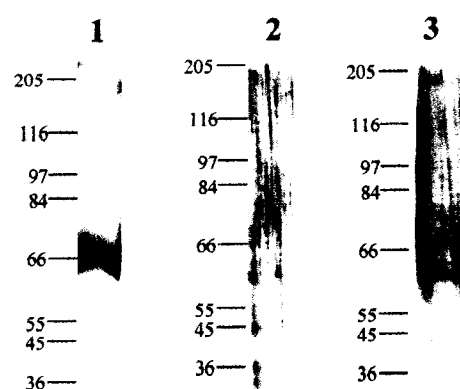


Figura 2. Eletroforese em SDS-PAGE 8%. Painel 1- Preparação antigênica Pb BAT-JBE (70 e 190 kDa); Painel 2- Preparação antigênica da isolado Pb 18 (64, 43, 33, 30, 28, 24 kDa); Painel 3- Preparação antigênica do isolado Pb BAT (160, 60, 54, 43 kDa). O padrão de massa molecular wide weight range (6,500-205,00) está indicado do lado esquerdo de cada painel.

3.3 -ELISA

A fim de comparar as três preparações antigênicas dos isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* frente a soros de pacientes com suspeita de paracoccidioidomicose realizou-se o teste ELISA. Nesse, observou-se diferenças nos números de amostras de soros de pacientes consideradas positivas para PCM, tal como mostra a Tabela 1.

Em relação aos níveis de reatividade de anticorpos IgG, em teste ELISA, a preparação do isolado Pb 18 apresentou 84,2% de amostras de soros positivas ($n = 32$), de acordo com o IE = 0,191 (Figura 3). O Índice Sinal Ruído (ISR), que relaciona soros reativos e soros não reativos, foi de 4,04.

Os níveis de reatividade de anticorpos em Pb BAT-JBE (Figura 4), a preparação purificada em coluna de Sepharose®-jacalina, apresentaram a menor variação entre os soros reativos e não reativos, caracterizando o ISR de 2,20. Entretanto, foi possível a confirmação de 65,8% ($n = 25$) de amostras de soro com diagnóstico positivo para PCM, de acordo com o IE = 0,351.

A preparação Pb BAT, tal como mostra a Figura 5, apresentou maiores níveis de reatividade de anticorpos IgG, com ISR de 3,04. Apesar disso, a porcentagem de pacientes com diagnóstico positivo foi de apenas 57,8% ($n = 22$) em IE = 0,444, considerado pequeno quando comparado as outras preparações antigênicas.

Tabela 1. Comparação entre a classificação diagnóstica realizada no HC-UFU e os resultados do teste ELISA com diferentes preparações antigênicas.

Nº Soro (Prontuário)	Diagnóstico HC-UFU	Absorbância BAT	Diagnóstico ELISA-BAT ¹	Absorbância BAT-JBE	Diagnóstico ELISA-BAT-JBE ²	Absorbância Pb18	Diagnóstico ELISA-Pb18 ³
1 (691641)	P	0,255	N	0,224	N	0,208	P
2 (669507)	P	1,058	P	0,373	P	0,081	N
3 (658407)	NC	0,161	N	0,291	N	0,391	P
4 (690561)	P	0,332	N	0,419	P	0,311	P
5 (-)	NC	0,588	P	0,477	P	0,453	P
6 (-)	NC	0,385	N	0,545	P	0,2	P
7 (294724)	NC	1,067	P	0,445	P	0,42	P
8 (659701)	P	0,411	N	0,384	P	0,579	P
9 (10522)	NC	0,932	P	0,473	P	0,564	P
10 (175620)	NC	0,202	N	0,258	N	0,125	N
11 (36333)	NC	0,048	N	0,475	P	0,447	P
12 (319908)	NC	0,810	P	0,469	P	0,607	P
13 (556898)	P	0,450	P	0,343	N	0,542	P
14 (-)	NC	0,894	P	0,516	P	0,585	P
15 (-)	NC	0,327	N	0,358	N	0,424	P
16 (442191)	P	0,514	P	0,361	P	0,378	P
17 (54126)	NC	0,892	P	0,469	P	0,54	P
18 (-)	NC	0,667	P	0,292	N	0,412	P
19 (136214)	P	0,717	P	0,212	N	0,442	P
20 (324919)	P	0,745	P	0,579	P	0,584	P
21 (756621)	N	0,782	P	0,418	P	0,435	P
22 (21711)	N	0,109	N	0,275	N	0,125	N
23 (501544)	NC	0,454	P	0,51	P	0,527	P
24 (235479)	P	0,349	N	0,512	P	0,525	P
25 (667097)	N	0,124	N	0,25	N	0,144	N
26 (421571)	N	0,141	N	0,358	N	0,215	P
27 (-)	NC	0,151	N	0,448	P	0,12	N
28 (-)	NC	0,483	P	0,39	P	0,455	P
29 (736624)	NC	0,177	N	0,313	N	0,336	P
30 (416045)	P	0,764	P	0,608	P	0,537	P
31 (130738)	P	0,506	P	0,412	P	0,551	P
32 (89514)	P	0,802	P	0,545	P	0,489	P
33 (-)	NC	0,550	P	0,387	P	0,531	P
34 (369180)	NC	0,409	N	0,357	N	0,093	N
35 (246789)	NC	0,531	P	0,55	P	0,288	P
36 (-)	NC	0,704	P	0,497	P	0,414	P
37 (-)	NC	0,381	N	0,492	P	0,399	P
38 (-)	NC	0,781	P	0,6	P	0,577	P

¹ Índice de positividade de Pb BAT= 57,8% (n=22); ² Índice de positividade de Pb BAT-JBE= 65,8% (n=25); ³ Índice de positividade de Pb 18= 84,2% (n=32). Sendo Índice de positividade a porcentagem de indivíduos positivos, de acordo com o Índice ELISA de cada preparação.

P: positivo; N: negativo; NC: não confirmado.

(-): ausência de número de prontuário.

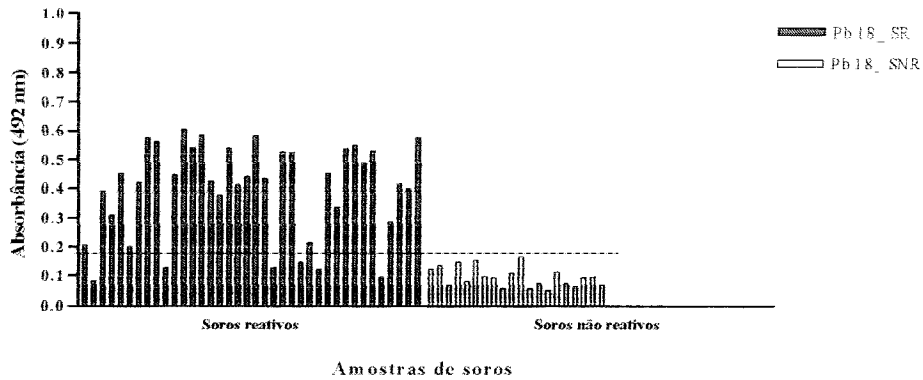


Figura 3. Níveis de reatividade de anticorpos frente a preparação antigênica Pb 18 em amostras de soros de pacientes suspeitos ou não de PCM.

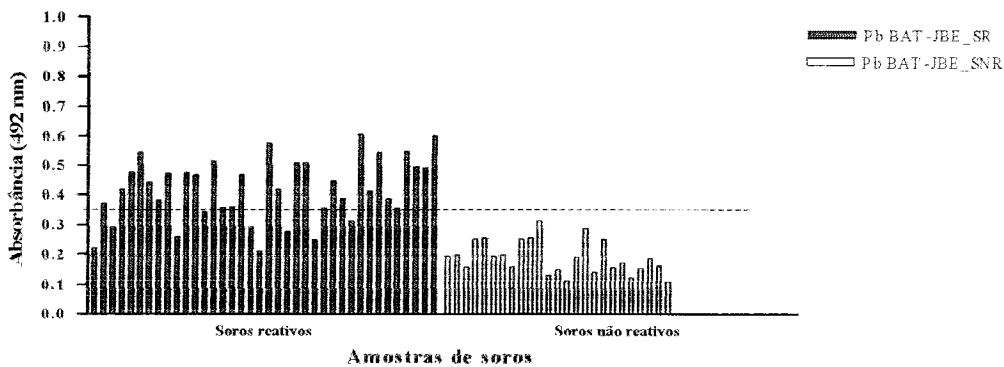


Figura 4. Níveis de reatividade de anticorpos frente a preparação antigênica Pb BAT-JBE em amostras de soros de pacientes suspeitos ou não de PCM.

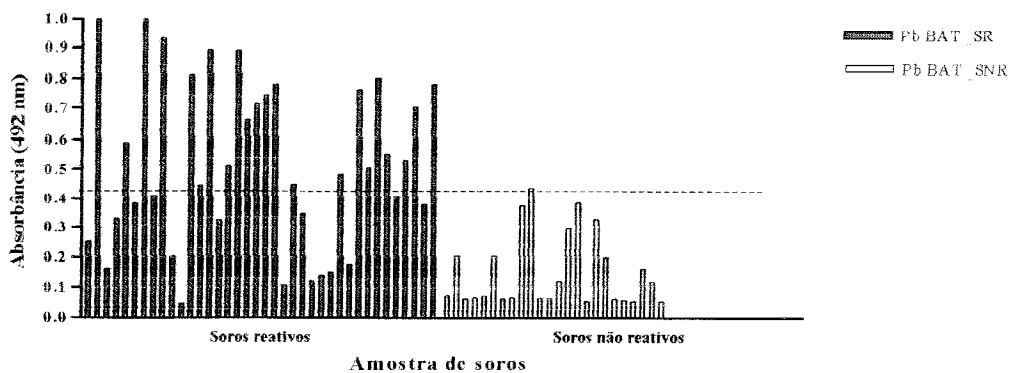


Figura 5. Níveis de reatividade de anticorpos frente a preparação antigênica Pb BAT em amostras de soros de pacientes suspeitos ou não de PCM.

De acordo com a Figura 6 foi possível visualizar uma diferença nos níveis de reatividade de anticorpos das amostras de soros reativos das preparações antigênicas. Os níveis de reatividade mais altos foram apresentados em Pb BAT. Houve uma menor variação entre os níveis de reatividade em Pb BAT-JBE e uma variação significativa nos níveis de reatividade de anticorpos em Pb 18.

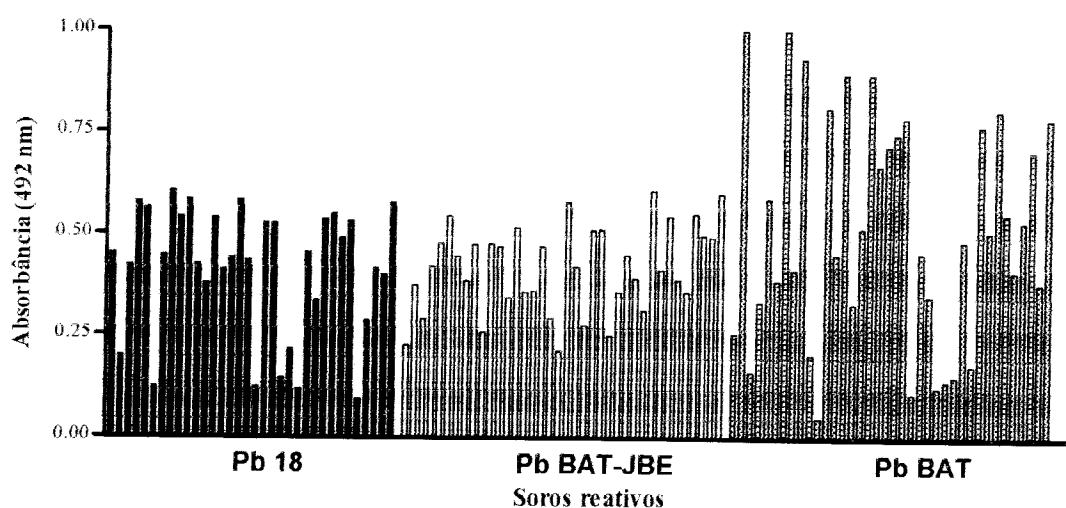


Figura 6. Comparação dos níveis de reatividade de anticorpos das amostras de soros reativos em ELISA frente às preparações antigênicas: Pb 18; Pb BAT-JBE e Pb BAT.

A fim de avaliar a probabilidade da diferença no número de amostras de soro positivas, foram realizadas análises estatísticas. A análise realizada foi do Qui-quadrado (GraphPad Prism v. 4.0, GraphPad Software, Inc.), de acordo com a Tabela 2. Quando relacionadas a preparações Pb 18 ($n = 32$) e Pb BAT ($n = 22$) a diferença entre as amostras de soros reativos foi significativa ($p = 0,0228$). Já Pb 18 ($n = 32$) e Pb BAT-JBE ($n = 25$) não houve significância ($p = 0,1120$), e o mesmo aconteceu quando comparados Pb BAT ($n = 22$) e Pb BAT-JBE ($n = 25$), ($p = 0,6367$).

Tabela 2. Análise estatística Qui-quadrado dos índices de positividade das preparações antigênicas.

Preparações Antigênicas	Número de amostras positivas	Número total de amostras reativas	Índices de positividade	Valor de p
Pb 18 / Pb BAT	32 / 22	38 / 38	84,2% / 57,8%	0,0228
Pb 18 / Pb BAT-JBE	32 / 25	38 / 38	84,2% / 65,8%	0,1120
Pb BAT / Pb BAT-JBE	22 / 25	38 / 38	57,8% / 65,8%	0,6367

3.4 – Immunoblotting

Analisou-se também a reatividade de algumas amostras de soros de pacientes com PCM frente às diferentes preparações antigênicas. Foram selecionadas 4 amostras: 2 com diagnósticos confirmados para PCM pelo HC/UFU (20, 32); e 2 com diagnósticos não confirmados pelo mesmo hospital (6, 38). As amostras selecionadas estão com seus níveis de reatividade de anticorpos, obtidos por ELISA, expressos na Figura 7.

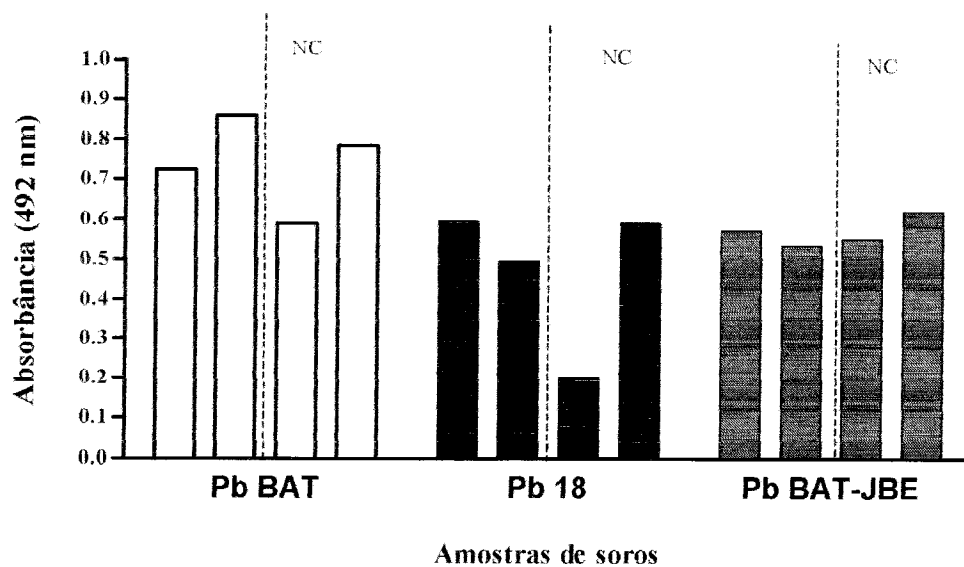


Figura 7. Níveis de reatividade de anticorpos das amostras de soros 20, 32, 6 e 38 em ELISA frente às preparações antigênicas: Pb BAT; Pb 18 e Pb BAT-JBE. NC- Amostras de soros de pacientes com diagnóstico de PCM não confirmado pelo HC/UFU.

Por meio do teste ELISA, as amostras com diagnósticos não confirmados tiveram suas positivities confirmadas, de acordo com o IE de cada uma das preparações antigênicas: Pb BAT (*cut-off* = 0,444); Pb 18 (*cut-off* = 0,191); Pb BAT-JBE (*cut-off* = 0,351).

Neste último experimento para análise comparativa das preparações antigênicas foram poucos os componentes protéicos reconhecidos pelas amostras de soros tal como mostra a Figura 8. Dentre as 4 amostras testadas, a amostra de soro 6, apesar de ter sido considerada positiva pelo teste ELISA nas preparações Pb 18 e Pb BAT-JBE,

apresentou reatividade apenas com Pb BAT-JBE. As amostras 20 e 38 apresentaram reatividade com todas as preparações, com diferentes antígenos reconhecidos.

A preparação Pb BAT-JBE apresentou reatividade em todas as amostras de soros testadas, evidenciando apenas uma banda (190 kDa). A preparação Pb 18 obteve o maior número de antígenos reconhecidos (24, 43, 70 e 95 kDa) pelo menor número de amostras de soros ($n = 2$). Já Pb BAT apresentou o reconhecimento das bandas de 64 e 160 kDa em 3 amostras de soros de pacientes. A Tabela 3 apresenta a reatividade nas diferentes preparações.

Tabela 3. Reatividade apresentada em *immunoblotting* entre os antígenos das diferentes preparações antigênicas e amostras de soros de pacientes com PCM.

Preparações Antigênicas	Amostras de soros testadas				Total de amostras reativas	Total de componentes antigênicos reconhecidos
	6	20	32	38		
Pb 18	–	X	–	X	2	4
Pb BAT	–	X	X	X	3	2
Pb BAT-JBE	X	X	X	X	4	1

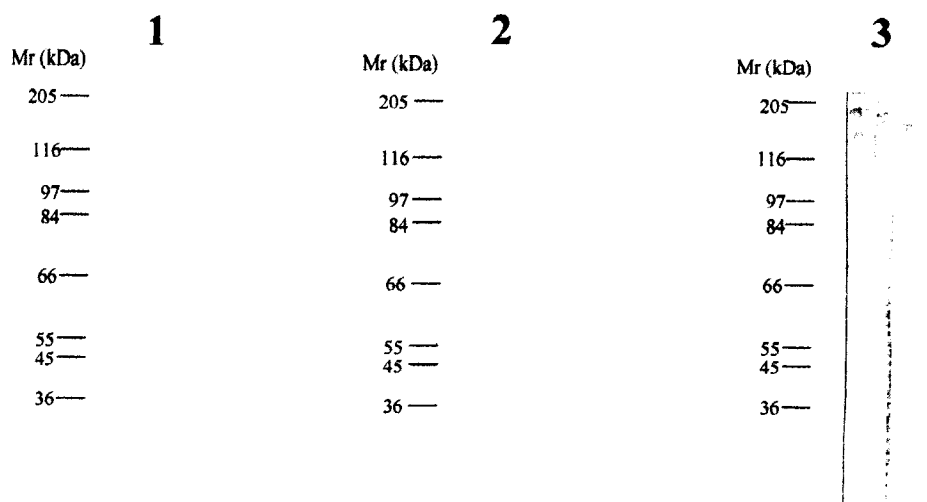


Figura 8. Immunoblotting realizado com as amostras de soros: 6, 20, 32, 38 e (-) controle negativo. Painei 1- Preparação antigênica da isolado Pb 18 (24, 43, 70, 95 kDa); Painei 2- Preparação antigênica do isolado Pb BAT (64 e 160 kDa); Painei 3- Preparação antigênica Pb BAT- JBE (190 kDa). O padrão de massa molecular wide weight range (6,500-205,00) está indicado do lado esquerdo de cada painei.

4- Discussão e Conclusão

O presente estudo isolou a fração antigênica JBE (*Jacalin Binding Exoantigen*) de *Paracoccidioides brasiliensis*, do isolado BAT e identificou suas bandas mais proeminentes em SDS-PAGE. Além disso, comparou 3 preparações antigênicas: exoantígeno Pb BAT, exoantígeno glicosilado Pb BAT-JBE e antígeno somático do isolado Pb 18, através de teste imunoenzimático (ELISA) e *Immunoblotting*. Tais testes foram realizados frente a amostras de soros de pacientes com suspeita de PCM, de acordo com o Hospital de Clínicas de Uberlândia/UFU, e amostras de soros de paciente normais.

Segundo TRAVASSOS *et al.* (1995), culturas de fungos em meio líquido contêm exoantígenos fúngicos altamente glicosilados. A lectina jacalina tem sido utilizada para isolar e caracterizar glicoproteínas (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1985). 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 (GOLDSTEIN & BLAKE, 1980). Nesse sentido, após cromatografia de afinidade em coluna de jacalina, foi possível obter a preparação JBE, o que foi comprovado pelas absorvâncias do sobrenadante de cultura de levedura.

A análise de JBE em SDS-PAGE mostrou a presença das bandas de 70 e 190 kDa, que foi mais proeminentes sob condições redutoras segundo GENNARI-CARDOSO (2000), evidenciando a capacidade da D-galactose 0,4 M em eluir a coluna com JBE. O eluato D-galactose, após diálise e concentração, sempre apresentou uma

baixa absorvância, refletindo a baixa concentração do glicoconjugado isolado do sobrenadante da cultura. Foi visto que em cada mL tem-se apenas 121 µg de proteínas.

Segundo PANUNTO-CASTELO *et al.* (2003) quando se compara preparações de exoantígenos de diferentes isolados, a preparação Pb BAT apresenta uma maior variedade de componentes protéicos, que abrange bandas de 22 a 160 kDa. Entretanto, de acordo com os perfis eletroforéticos apresentados neste trabalho, foram observadas mais bandas no isolado Pb 18, o qual era uma preparação de componentes estruturais das células do microorganismo e não uma preparação de exoantígenos. Os componentes de alto peso molecular foram detectados apenas nas preparações do isolado BAT, seja extrato bruto ou purificado. Outro fato a ser ressaltado foi a detecção da gp 43, principal glicoproteína secretada continuamente pelas leveduras na fase exponencial de crescimento (CAMARGO *et al.*, 1988; STAMBUK *et al.*, 1988), em Pb 18 e Pb BAT. Essa variedade de componentes protéicos, dentre os isolados, é um obstáculo no desenvolvimento de novos reagentes e ensaios no diagnóstico e no acompanhamento de PCM (CASOTTO *et al.*, 1991), o que justifica ainda mais estudos das preparações.

Após análise dos perfis eletroforéticos das preparações foi realizado o teste ELISA. Vários ensaios foram realizados para uma padronização.

Os resultados apresentados mostraram baixos níveis de reatividade de anticorpos IgG nas amostras supostamente positivas para PCM em todas as preparações. Dentre essas, a preparação Pb BAT apresentou os maiores níveis, quando comparada as outras. Deve ser levado em consideração o tempo de armazenamento das amostras de soros e as informações obtidas em alguns prontuários que confirmaram início de tratamento com medicamentos, tais como Bactrim, Cetaconazol, Intraconazol e Nizoral. É importante ressaltar que nem todos os prontuários dos soros testados foram analisados, pois se encontravam faltosos ou com informações incompletas nos arquivos do HC – UFU. Outro fator que deve ser levado em consideração é o período em que se manifestou a infecção. De acordo com PANUNTO-CASTELO *et al.* (2003), pacientes com PCM aguda possuem soro mais reativo. BAIDA *et al.* (1999) demonstrou que os mais altos níveis de IgG ocorrem na forma juvenil, que corresponde ao isotipo regulado por IL-4, citocina associada a respostas Th2. Sendo assim, as informações de alguns prontuários sugerem uma infecção crônica, pois as manifestações ocorreram anos após contato, houve grande acometimento pulmonar e os baixos níveis de reatividade de anticorpos indicam um padrão de resposta Th1. Entretanto, novos testes devem ser feitos para a confirmação de uma infecção aguda ou crônica.

Quando submetidos aos Índices Sinal-ruído (ISR= 4,04) e ELISA (IE= 0,191) os resultados mais significativos foram os do isolado Pb 18. Isso também se confirmou analisando a probabilidade das diferenças do número de amostras positivas para PCM. Para tal preparação o maior número de amostras positivas foi significativo diante das diferenças dos valores das outras preparações.

Após análise de alguns prontuários foi possível afirmar que a maioria dos pacientes (n= 22) não possuía diagnóstico confirmado. Diante disso, a comprovação de uma grande maioria (84,2%) de soros positivos, em teste com Pb 18, sugere reatividade cruzada. Esse fato pode ser atribuído a pouca especificidade do teste e a um alto índice de reações cruzadas de componentes de *Paracoccidioides brasiliensis*. Condizendo com MENDES-GIANNINI *et al.* (1984) o fato de nenhum falso-positivo ter sido apresentado em amostras de soros normais, não exclui a ocorrência de reações cruzadas, devido a antígenos de outras micoses. PANUNTO-CASTELO *et al.* (2003) confirmam tal fato quando analisaram a reatividade de exoantígenos do isolado BAT com anticorpos IgG de pacientes com outras micoses. Em seu trabalho, foi observada a reatividade dos componentes protéicos de 43, 70 e 160 kDa com amostras de soros de pacientes com histoplasmose, aspergilose e criptococose. Tais componentes protéicos foram observados em SDS-PAGE nas 3 preparações (Pb 18: 43 kDa; Pb BAT: 43 e 160 kDa; Pb BAT-JBE: 70 kDa). Dessa forma, o fato de Pb BAT-JBE apresentar níveis de reatividade de anticorpos menores e mesmo assim, um índice de positividade de 65,8%, sugere-se que tal preparação possa ser confiável e representativa em teste ELISA.

No teste *immunoblotting* foi avaliada a reatividade de anticorpos IgG frente aos antígenos das diferentes preparações. As amostras selecionadas (6, 20, 32 e 38) apresentaram positividade confirmada no teste ELISA.

Anticorpos IgG de pacientes com forma crônica de PCM reagem menos e reconhecem um menor número de frações eletroforéticas em exoantígenos de Pb BAT (PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2003). Nesse sentido, a pouca reatividade nos exoantígenos Pb BAT e Pb BAT-JBE é justificada por uma possível predominância de pacientes de forma clínica crônica. De acordo com BERNARD *et al.* (1997) a detecção de altos níveis de anticorpos séricos anti-gp43 e anti-gp70, nos mesmos pacientes, reforçam a idéia da existência de uma resposta Th 2 na PCM, relacionada com a incapacidade do sistema imunitário de controlar a infecção. Tal fato ocorreu em uma amostra testada (amostra 20) em Pb 18, sugerindo que tais componentes funcionem

como marcadores de fase aguda. Entretanto, novos ensaios devem ser feitos para se padronizar um marcador para cada forma clínica de PCM.

A gp 43, apesar de ter sido caracterizada em SDS-PAGE nas preparações brutas, não foi reconhecida em Pb BAT no teste *immunoblotting*.

O maior número de reconhecimentos de componentes antigênicos em *immunoblotting* ocorreu em Pb 18, sugerindo que preparações de antígenos somáticos apresentem diferentes epitopos, os quais podem ser muito imunogênicos, principalmente se tratando de um isolado considerado virulento. VAZ *et al.* (1998) confirmam tal fato quando avaliaram isolados virulentos e não-virulentos de *Paracoccidioides brasiliensis*. KUROKAWA *et al.* (2005), em seus experimentos, demonstraram que níveis de reatividade de anticorpos específicos para *Paracoccidioides brasiliensis* foram significativamente altos em animais infectados com isolados virulentos. Esse resultado é similar na PCM humana, em que altos níveis de reatividade não estão associados à proteção, mas a disseminação progressiva do fungo a vários órgãos do hospedeiro (FRANCO, 1986; CAMARGO *et al.*, 1994).

Quando se compara a frequência de reatividade observa-se uma maior frequência da banda de 190 kDa, a qual foi reconhecida por todas as amostras de soro testadas com a preparação Pb BAT-JBE, mesmo considerando início de tratamento, suspeita de pacientes em forma clínica crônica e a menor virulência do isolado BAT, quando comparado à isolado Pb 18. Tal fato sugere que a banda de 190 kDa possa ser um possível marcador da PCM. Muitas análises devem ser feitas para observar a reatividade de tal banda nas diferentes formas clínicas.

É possível que Pb BAT-JBE seja uma preparação confiável e representativa no diagnóstico da PCM. O fato da preparação apresentar um componente glicoprotéico específico, níveis de reatividade de anticorpos que garantem bom índice de positividade e menor probabilidade de reatividade cruzada, e além disso, alta frequência de reconhecimento de um componente específico em todas as amostras testadas, incentiva novos estudos para confirmar a potencialidade da fração JBE na aplicação em testes sorológicos. Além disso, os resultados significativos de uma preparação de antígenos somáticos em ELISA e *immunoblotting* também podem sugerir um potencial relevante do mesmo, quando comparado a preparações de exoantígenos. Muitos estudos devem ser realizados a fim de testar tais potencialidades, principalmente para confirmar reatividade cruzada e a presença de possíveis marcadores das diferentes formas clínicas da PCM.

Por tudo que foi demonstrado, faz-se necessário o estudo de antígenos fúngicos para a abertura de novas perspectivas no sentido de disponibilizar componentes isolados que propiciem o desenvolvimento de ensaios, cujas sensibilidades e especificidades, lhes possibilitem o diagnóstico e o monitoramento de pacientes com PCM.

5- Referências bibliográficas

AJELLO, L.; POLONELLI, L. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 1, p. 160-165, 1985.

ALMEIDA, F.P. Estudos comparativos do granuloma coccidióico nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasita brasileiro. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v. 5, p. 125-141, 1930.

ALMEIDA, O.P.; JUNIOR, J.J.; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, v. 14, p. 377-383, 2003.

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. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5587-5591, 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 juvenale and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 273-278, 1999.

BERNARD, G.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; JUVENALE, M.; MIRANDA, E.T.; DUARTE, A.J.S. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell

hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J. Infect. Dis.**, v. 175, 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 Infections Diseases**, v. 31, p. 1032-1039, 2000.

BERNARD, G.; FRANCO, M. Paracoccidioidomycosis. In: MERZ, W.G.; HAY, R.J. (eds) **Medical Mycology**, Topley's and Wilson's Microbiology and Microbiology infections, 10th edition, Hodder Arnold, p. 541-559, 2005.

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

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, J.H. Improved silver of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 89-117, 1993.

CAMARGO, Z.P.; GUESDON, J.L.; DROUHET, E.; IMPROVISI, L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 88, p.31-37, 1984.

CAMARGO, Z.P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, C.P.; TRAVASSOS, L.R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for Immunodiffusion tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 21-47, 1988.

CAMARGO, Z.P.; UNTERKIRCHER, C.; TRAVASSOS, L.R. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 27, p. 407-412, 1989.

CAMARGO, Z.P. & CANO, L.H. Humoral immunity. In: FRANCO, M.E.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; DEL-NEGRO, G. ed. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, CRC Press, p. 187-197, 1994.

CASOTTO, M.; PARIS, S.; CAMARGO, Z.P. Antigens of diagnostic value in three isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, p. 243-253, 1991.

CASTAÑEDA, E. Immunological studies in murine paracoccidioidomycosis. **PhD thesis**, University of California, 1985.

CHAVES-BORGES, F.A.; MINEO, J.R. Medidas de biossegurança em laboratório (eds). **EDUFU**, 1997.

CISALPINO, P.S.; PUCCIA, R.; YAMAUCHI, L.M.; CANO, M.I.; Da-SILVEIRA, J.F.; TRAVASSOS, L.R. Cloning, characterization and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 4553-4560, 1996.

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 Infect.**, v.8, p. 704-713, 2006.

CONTI-DIAZ, I.A.; MACKINNON, J.E.; CALEGARI, L.; CASSERONE, S. Estudio comparativo de la inmunoelectroforesis-inmunodifusión (IEOF-ID) e de la inmunoelectroforesis (IEF) en el diagnóstico de la paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 63, p. 161-165, 1978.

COSTA, J.C.; PAGNANO, P.M.G.; BECHELLI, L.M.; FIORILLO, A.M.; LIMA-FILHO, E.C. Lymphocyte transformation test in patients with paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia et Mycologia applicata**, v. 84, p. 55-63, 1983.

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

DEL-NEGRO, G.M.B.; LACAZ C.S.; ZAMITH V.A.; SIQUEIRA A.M. General clinical aspects: polar form of paracoccidiodomycosis, the disease in childhood. In: FRANCO M.; LACAZ, C.S.; RETREPO, A., DEL-NEGRO, G. (Eds.). **Paracoccidiodomycosis**. Boca Raton, CRC Press, p. 225-232, 1994.

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 *Paracoccidiodes brasiliensis* soluble antigens. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 353-360, 1999.

FRANCO, M. Host-parasite relationship in paracoccidiodomycosis. **J. Med. Vet. Mycol**, v. 25, p. 5-18, 1986.

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

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

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C.S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidiodes brasiliensis* from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 185-191, 2000.

FREITAS-DA-SILVA, G. Exoantigens de *Paracoccidiodes brasiliensis*: resposta sorológica de pacientes com paracoccidiodomycose e identificação de glicoconjugados ligantes de jacalina. **Tese de Doutorado** (Clínica Médica da FMRP/USP), p. 97-120, 1996.

GENNARI-CARDOSO, M.L. Paracoccina: lectina de *Paracoccidioides brasiliensis*, ligante de N-acetil-glicosamina interage com componente de matriz extracelular. **Tese de Doutorado** (Depto. de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da FMRP/USP), 2000.

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. **Mycol.**, v. 58, p. 63-70, 1976.

GOLDANI, L.Z.; SUGAR, A.M. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. **Clin. Infect. Dis**, v. 21, p. 1275-1281, 1995.

GOLDSTEIN, I.J.; BLAKE, D.A. Resolution of nucleotide sugars and oligosaccharides by lectin affinity chromatography. **Anal. Biochem.**, v. 102, p. 103-109, 1980.

KERR, I.B. ARARIPE, J.R.; OLIVEIRA, P.C.; LENZI, H.L. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. **Ver. Inst. Med. Trop.**, v. 30, p. 366, 1988.

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. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 47, p. 257-262, 2005.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Paracoccidioidomycosis. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. (eds). **Tratado de Micologia Médica**. Lacaz, Savier Editora de livros médicos Ltda., p. 639-729, 2002.

LAEMMLI, O.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LONDERO, A.T.; DEL-NEGRO, G. Paracoccidioidomicose. **J. Pneumol.**, v. 12, p. 41-60, 1986.

LOPES, J.D.; MOURA-CAMPOS, M.C.; VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; SOUSA, W.; CAMARGO, Z.P. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2309-2313, 1994.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.V.; FARR, R.V.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.

LUTZ, A. Uma micose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil: Contribuição ao conhecimento das hyblastomycoses americanas. **Brasil-Médico**, v. 22, p. 121-124/141-144, 1908.

McEWEN, J.C.; BRUMMER, S.D.A.; RESTREPO, A. Effect of messine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 36, p. 603-608, 1987.

MENDES, R.P.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Paracoccidioidomicose. In: CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. (eds) **Medicina Tropical**, 1ª ed., Atheneu, p. 505-545, 2003.

MENDES-GIANNINI, M.J.; CAMARGO, M.E.; LACAZ, C.S.; FERREIRA, A.W. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiology**, v. 20, p. 103-108, 1984.

MENDES-GIANNINI, M.J.; MORAES, R.A.; RICCI, T.A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 32, p. 384-385, 1990.

MENDES-GIANNINI, M.J.; BUENO, J.P.; SHIKANAI-YASSUDA, M.A.; STOLF, A.M.S.; MASUDA, A.; AMATO-NETO, V.; FERREIRA, A.W. Antibody responses to 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 43, p. 200-206, 1990.

MENDES-GIANNINI, M.J.; DEL-NEGRO, G.B.; SIQUEIRA, A.M. Sero-diagnosis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO A.; DEL-NEGRO, G. (ed.). **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press. Boca Raton, Fla, p.345-363, 1994.

MOSCARDI-BACCHI, M.; SOARES, A.; MENDES, R.; MARQUES, S.; FRANCO, M. *In situ* localization of lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.27, p. 149-158, 1989.

NEGRONI, R. Nuevos estudios sobre antígenos para las pruebas sorológicas en lablastomicosis sulamericana. **Derm. Ibero Lat. Amer.**, v. 4, p. 409, 1968.

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**, v. 5, p. 1205-1211, 2003.

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

QUEIROZ-TELLES, F. *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural finding. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; DEL-NEGRO, G. (eds.). **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press, Boca Raton, p. 27-47, 1994.

RAY, M. K.; DEVI, K. U.; KUMAR, G. S.; SHIVAJI, S. Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1918 – 1923, 1992.

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. **Infect. Immun.**, v. 46, p. 346-353, 1984.

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

RESTREPO-MORENO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M.F.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL-NEGRO, G. (eds). **Paracoccidioidomycosis**, 1st edition, CRC Press, Boca Raton, p. 121-130, 1994.

ROQUE-BARREIRA, M.C.; CAMPOS-NETO, A. Jacalin: a IgA binding lectin. **J. Immunol.**, v. 134, p. 1740, 1985.

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

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence – a review. **Mycopathol.**, v. 62, p. 77-86, 1977.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 225-242, 2002.

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. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 297-310, 2006.

SILVA, C.L.; FAZIOLI, R.A. A *Paracoccidioides brasiliensis*, polysaccharide having granuloma-inducing toxic and macrophages-stimulating activity. **J. Gen. Microbiol.**, v. 131, p. 1497-1501, 1985.

SPLENDRE, A. Un'affezione micotica com localizzazione nella mucosa della boca, asservota in Brasile, determinada da funghi appartenenti alla tribù degli Exoascei

(*Zymonema brasiliensis*, n., sp.). In: **Volume in onore del Prof. Angelo Celli** nel 25° anno di insegnamento, G. Bertero, 1912.

STAMBUK, B.U.; PUCCIA, R.; ALMEIDA, M.L.C.; TRAVASSOS, L.R.; SCHENKMAN, S. Secretion of the 43 kDa glycoprotein antigen by *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.26, p. 267-273, 1988.

SUGIZAKI, M.F.; PERAÇOLLI, M.T.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, A.M.V.C.; KUROKAWA, C.S.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; FREIRE-MAIA, D.V. Correlation between antigenemia of *Paracoccidioides brasiliensis* and inhibiting effects of plasma in patients with paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 37, p. 277-284, 1999.

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

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*. **Arch. Med. Res.**, v. 26, p. 297-307, 1995.

VALLE, A.C.F.; WANKE, B.; WANKE, N.; PEIXOTO, J.C.; PEREZ, M. Tratamento da paracoccidioidomicose: estudo retrospectivo de 500 casos. I-Análise Clínica, Laboratorial e epidemiológica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 67, p. 251-254, 1992.

VAZ, C.A.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. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 971-977, 1998.

VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; FRANCO, M.F.; SOUZA, W.; MORAES, J.Z.; TRAVASSOS, L.R.; LOPES, J.D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin

through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1465-1469, 1994.

WANKE, B.; LONDERO, A.T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO, M.F.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL-NEGRO, G. (eds). **Paracoccidioidomycosis**, 1st edition, CRC Press, Boca Raton, p. 109-120, 1994.

YARZÁBAL, L. Composicion antigénica de *Paracoccidioides brasiliensis*. In: DEL-NEGRO, G.; LACAZ, C.S.; FIORILLO, A.M. (eds) **Paracoccidioidomicose. Blastomicose sul-americana**. Sarvier- EDUSP, p. 59-67, 1982.

ZACHARIAS, D.; UEDA, A.; MOSCHARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M.; SAN-BLAS, G. A comparative histopathological, immunological and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 24, p. 445-454, 1986.

Anexo 1



Universidade Federal de Uberlândia
 Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 007/07

Registro CEP: 215/05

Projeto Pesquisa: "Caracterização sorológica de fração JBE (Jacalin Binding Exoantigen) de *Paracoccidiodies brasiliensis* por immunoblotting, frente a soros de pacientes com *paracoccidiodiomycose*"

Pesquisador Responsável: Margareth Leitão Gennari Cardoso

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do Relatório final: novembro/2007

12 de janeiro de 2007.


 Prof. Dra. Sandra Terezinha de Vasias Furtado
 Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cônjuge (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.1) e deve receber uma copia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.7), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requerem ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.
- Eventos modificáveis ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega do relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

Anexo 2

RELACÃO DE PACIENTES – HC/UFU

Prontuários	Nascimento	Diagnóstico	Sintomas	Tratamento	Coleta de soro
10522	NE	-	-	-	-
21711	29/11/1962	Doença de Adison	Lesões cutâneas e problemas gastrointestinais.	-	-
36333	NE	-	-	-	-
54126	NE	-	-	-	-
89514	26/02/1944	PCM cutânea e pulmonar	Assintomático. Lesões cutâneas e já apresentou problemas respiratórios.	Nizoral e Bactrim	31/07/1987
130738	12/09/1941	PCM cutânea e pulmonar	Paciente assintomático. Lesões orais e cutâneas.	Bactrim, Nizoral e Ketaconazol.	10/10/1984
136214	24/11/1939	PCM ganglionar	Lesão cervical e dores pelo corpo.	Nizoral	22/04/1993
175620	NE	-	-	-	-
235479	04/10/1956	PCM ganglionar	Lesão do tubo digestivo, nódulo cervical, desconforto abdominal.	Intraconazol	17/10/1995
246789	NE	-	-	-	-
294724	NE	-	-	-	-
319908	NE	-	-	-	-
324919	30/7/1945	PCM ganglionar	Lesão cutânea e oral, nódulos no pescoço, dor abdominal, cansaço	Cetaconazol, Bactrim, Nizoral	13/11/1991
369180	NE	-	-	-	-
416045	27/03/42	PCM pulmonar	Dor orofaríngea	Bactrim e Nizoral.	30/04/87
421571	24/11/1962	Leptospirose	-	-	-
442191	08/09/1945	PCM ganglionar	Lesões na pele e presença de nódulos. Assintomático.	Bactrim e Ketaconazol.	1988
501544	NE	-	-	-	-
556898	05/07/1962	PCM ganglionar	Nódulos cervicais e lesões orais. Assintomático.	Itraconazol	31/10/1995
658407	NE	-	-	-	-
659701	25/12/1945	PCM ganglionar e pulmonar	Nódulo no pescoço, tosse e adenofagia.	Ketaconazol e Bactrim	28/09/1993
667097	17/05/1971	Norcadiose	Dor cervical e torácica, febre. HIV positivo	-	-
669507	1965	PCM ganglionar	-	-	14/02/1995
690561	15/01/1960	PCM disseminado	Adenopatia e dor abdominal	Itraconazol	01/12/1994
691641	-	PCM cutânea, mucosa e pulmonar	Lesões orais	Bactrim	-
736624	21/11/1918	-	-	-	-
756621	30/10/1960	Malária	-	-	-

NE: não encontrado no arquivo.

