



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
E PARASITOLOGIA APLICADAS

... MG
582-28
C331-
T E S/M E

Fernanda Caroline de Carvalho

Avaliação de **JBE** ("Jacalin Binding Exoantigen"- Exoantígeno Ligante de Jacalina) na fagocitose de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* por macrófagos peritoneais murinos

SISBI/UFU



1000215598

UBERLÂNDIA-MG

2004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
E PARASITOLOGIA APLICADAS

Fernanda Caroline de Carvalho

Avaliação de **JBE** (“**J**acalin **B**inding **E**xoantigen”- Exoantígeno Ligante de Jacalina) na fagocitose de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* por macrófagos peritoneais murinos

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção o título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientador (a): Prof. Dra Margareth Leitão Gennari Cardoso

UBERLÂNDIA-MG

2004

Agradecimentos

A realização de qualquer trabalho requer estudo, dedicação, atenção e, principalmente, a colaboração de pessoas. Agradeço:

Pelo incentivo, orientação e paciência de Margareth Leitão Gennari Cardoso.

Pela importante colaboração provinda do Laboratório da Prof. Dra Maria Cristina Roque Antunes Barreira do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bióagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Pelo auxílio da professora Eloísa Amália Viera Ferro na parte de microscopia eletrônica.

Pelo incentivo e colaboração dos colegas do Laboratório de Imunologia, em especial Karine, Cinthia, Martha, Fernando, Áurea, Adriano, Sandra, Mônica, Jair Junior e Tomáz.

Pela atenção de professores como Janete O. Pena, Neide M. Silva, José Roberto Mineo e Ernesto A. Taketomi.

Pelo auxílio de técnicos e funcionários do Laboratório de Imunologia, em especial Cida, Junão, Deise e Andréia, e da Secretária do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Neto e Lucineide.

Pelo financiamento desse trabalho provindo da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

E, principalmente, pelo suporte moral e material da minha família e amigos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1- INTRODUÇÃO	5
1.1 - <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> : aspectos gerais	5
1.2 - Antígenos de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	10
1.3 - Interações entre fungos e fagócitos	18
1.3.1 - Células dendríticas	19
1.3.2 - Neutrófilos	20
1.3.3 - Macrófagos	20
1.4 - Interações lectina-carboidrato na relação entre agentes patogênicos e hospedeiro	23
2- OBJETIVO	27
3 - MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 - Cultivo de leveduras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e obtenção de JBE ("Jacalin Binding Exoantigen" - Exoantígeno Ligante de Jacalina)	28
3.1.1- Amostras de <i>P. brasiliensis</i>	28
3.1.2 - Condições de cultivo das leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	28
3.1.3 - Obtenção do sobrenadante de cultura de leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	29
3.1.4 - Cromatografia de afinidade, em coluna Sepharose®-Jacalina, do sobrenadante de cultura líquida de leveduras do isolado BAT de <i>P. brasiliensis</i> para obtenção de JBE	30
3.1.5 - Análise de JBE por eletroforese em gel de poliacrilamida	30
3.2 - Detecção de JBE em leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por Microscopia Eletrônica	31
3.2.1 - Preparo das leveduras de <i>P. brasiliensis</i> para Microscopia Eletrônica	31
3.2.2 - Ensaio imunohistoquímico para Microscopia Eletrônica	32
3.3 - Produção da IgG de camundongo anti- JBE e de fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti- JBE	33
3.3.1 - Produção de anticorpo policlonal anti- JBE em camundongo BALB/c	33
3.3.2 - Ensaio enzimático de imunoabsorbância (ELISA) indireto	34
3.3.3 - Purificação da IgG anti- JBE produzida em camundongos BALB/c	35
3.3.4 - Obtenção dos fragmentos F(ab) a partir da IgG anti- JBE produzida em camundongo BALB/c	36
3.4 - Preparo das leveduras de <i>P. brasiliensis</i> para o ensaio de fagocitose	37
3.4.1 - Marcação das leveduras de <i>P. brasiliensis</i> com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	37
3.4.2 - Incubação das leveduras de <i>P. brasiliensis</i> com monossacarídeos	37
3.4.3 - Incubação das leveduras de <i>P. brasiliensis</i> com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti- JBE	38

3.5 - Ensaio de fagocitose	39
3.5.1 - Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	39
3.5.2 - Ensaio de fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c pré-tratados com JBE na presença de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> pré-tratadas com diferentes monossacarídeos	40
3.5.3 - Ensaio de fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c pré-tratados com monossacarídeos na presença de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> pré-tratadas fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti- JBE	41
3.5.4 - Ensaio de fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c pré-tratados JBE na presença de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> pré-tratadas fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti- JBE	42
3.5.5 - Preparo das lâminas para determinação do Índice fagocítico (IF)	42
3.5.6 - Dosagem indireta de Óxido Nítrico (NO) utilizando o método de Griess	43
3.6 - Ensaio enzimático de imunoabsorbância (ELISA) indireto de competição por N-acetil-D-glicosamina e D-Galactose	44
3.7 - Análise estatística	44
4 - RESULTADOS	45
4.1 - Análise eletroforética da obtenção do sobrenadante de cultura líquida de leveduras do isolado BAT de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	45
4.2 - Cromatografia de afinidade, em coluna de Sepharose®-Jacalina, do sobrenadante de cultura líquida de leveduras do isolado BAT de <i>P. brasiliensis</i>	47
4.3 - Imunolocalização de JBE em leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	49
4.4 - Produção de anticorpo policlonal anti- JBE em camundongos BALB/c, purificação da IgG de camundongo anti- JBE e obtenção de fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti- JBE	51
4.5 - Efeito de JBE no ensaio de fagocitose (índice fagocítico – IF) e na produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos peritoneais murinos	53
4.6 - Inibição da fagocitose por fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti- JBE	56
4.7 - Efeito da fagocitose (índice fagocítico – IF) de macrófagos pré-tratados com JBE incubados com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti- JBE	58
4.8 - Efeito da incubação da IgG de camundongo anti- JBE com N-acetil-D-glicosamina e D-Galactose	59
5 - DISCUSSÃO	60
6 - CONCLUSÕES	69
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AF = forma adulta ou crônica da Paracoccidiodomicose
AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Ca⁺ = cátions de Cálcio
CR3 = Receptor do Complemento 3
cDNA = ácido desoxirribonucléico complementar
CO₂ = dióxido de carbono
DCs = células dendríticas
DNA = ácido desoxirribonucléico
DTH = teste de hipersensibilidade tardio
EDTA = ácido etilenodiaminotetracético
ELISA = Ensaio Enzimático de Imunoabsorbância
FasL = ligante de Fas
FITC = Isotiocianato de Fluoresceína
Fig = Figura
FPLC = Cromatografia líquida de proteínas
FMRP-USP = Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
Gal = D-Galactose
GlcNAc = N-acetil-D-glicosamina
Glu = D-Glucose
GM-CSF = fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos
Gp = glicoproteína
Gp 43-GST = glicoproteína de 43 kDa acoplada a glutathione S transferase
HIV = vírus da imunodeficiência humana
H₂O₂ = peróxido de hidrogênio
H₃PO₄ = ácido fosfórico
H₂SO₄ = ácido sulfúrico
IgA = imunoglobulina A
IgE = imunoglobulina E
IgG(s) = imunoglobulina(s) G
IgM = imunoglobulina M
IF = índice fagocítico
IL = interleucina
IFN- γ = Interferon γ
JF = forma juvenil ou aguda da Paracoccidiodomicose
kDa = quilodalton
M = molar
mA = miliampere
Man = D-Manose
M-CSF = fator estimulador de colônia de monócitos
2-ME = 2-mercaptoetanol
MIP-1 α , MIP-2 = proteína inflamatória de macrófagos 1 α e 2, respectivamente.
mg = miligramas
mg/mL = miligramas por mililitros
MHC = complexo principal de histocompatibilidade
mL = mililitros
mM = milimolar
n^o = número
N = normal
NaCl = cloreto de sódio
Na₂HPO₄ = fosfato de sódio dibásico
NK = células exterminadoras naturais

nm = nanômetros
NO = óxido nítrico
NO₂ = nitrito
OPD = Orto-fenilenodiamina
PBS = salina tamponada com fosfato
PBS-T = salina tamponada com fosfato acrescida de Tween-20
PCM = Paracoccidiodomicose
pH = porcentual hidrogeniônico
PMSF = fluoreto de fenilmetilsulfonil
rpm = rotação por minuto
RPMI-SBF = meio RPMI acrescido de soro fetal bovino
SDS = duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE = gel de poliacrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio
TBS = salina tamponada com Tris
TBS-T = salina tamponada com Tris acrescida de Tween-20
TGF-β = Fator de crescimento e transformação β
TLR = receptor “ toll-like”
TNF-α = Fator de necrose tumoral α
Tris HCl = solução de Tris tamponada com ácido clorídrico
UI/mL = unidades internacionais por mililitros
VLA-5 = antígeno tardio tipo 5
x g = vezes a gravidade
μg = micrograma
μL = microlitro
μM = micromolar
μg/mL = micrograma por mililitro
μgJBE/mL = micrograma de JBE por mililitro
% = por cento/porcentagem
°C = graus Celsius
β-D-Gal(1-3)D-GalNAc = β-D-Galactose(1-3)D-N-acetil galactose

RESUMO

Componentes antigênicos presentes na superfície de *Paracoccidioides brasiliensis* são capazes de promover interação com as células do hospedeiro, favorecendo a patogênese da infecção. O presente estudo buscou verificar a presença de **JBE** ("Jacalin Binding Exoantigen" - Exoantígeno Ligante de Jacalina) no sobrenadante de cultura líquida de leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis* e, também, nas leveduras, bem como investigar seu efeito na fagocitose de leveduras deste fungo por macrófagos peritoneais murinos. **JBE** foi obtido no sobrenadante de cultura líquida ao 16º dia de cultivo de leveduras, em meio F-10 acrescido de 0,5 % de D-Glicose, sua análise, por SDS-PAGE e coloração pela prata, evidenciou uma banda de 190 kDa e, sob condições redutoras uma de 70 kDa. O ensaio imunohistoquímico utilizando IgG de coelho anti-gp190 e IgG ligada ao ouro coloidal, localizou o componente de **JBE**, predominantemente, na superfície das leveduras. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram tratados com **JBE** (50 e 100 µg/mL) e incubados com leveduras de *P. brasiliensis* marcadas com FITC pré-tratadas com 50 mM de monossacarídeos: N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), ou D-Glicose, ou D-Galactose ou D-Manose. **JBE**, quando presente nos macrófagos, foi capaz de promover a inibição da fagocitose (40 %) e a produção de NO, e ao serem incubados com leveduras pré-tratadas com GlcNAc a inibição foi ainda maior (64 %), porém houve inibição na produção de NO. As leveduras de *P. brasiliensis* marcadas com FITC foram tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE** (50 e 100 µg/mL) e os macrófagos foram tratados com 50 mM de monossacarídeos, esse tratamento promoveu inibição na fagocitose e essa inibição aumentou quando houve a incubação de ambos. A inibição da fagocitose foi verificada também em macrófagos tratados com **JBE** (50 µg/mL) incubados com leveduras pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE** (50 µg/mL) (61,5 %). Esses resultados sugerem que **JBE** esteja envolvido na interação entre o fungo e as células do hospedeiro, inferido por sua localização, bem como, **JBE** mostrou-se capaz de potencializar a fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos peritoneais murinos. Provavelmente, a inibição da fagocitose e da produção de NO promovida por GlcNAc possa ser pela afinidade da gp70 de **JBE** por esse monossacarídeo. Os fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE**, provavelmente, ocupam os sítios de interação nas leveduras e aumentam a taxa de inibição da fagocitose pelos monossacarídeos ou por **JBE**, nos macrófagos. Em conclusão, **JBE** possui componente capaz de promover a invasão do fungo.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, macrófagos, exoantígeno, carboidrato.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis has antigenic components on surface able to promote the interaction between fungus and host, and promote the infection. In the present study the presence of JBE (Jacalin Binding Exoantigen) in culture supernatant of BAT *P. brasiliensis* isolate and on yeast cells were verified and the effect of JBE in attachment to murine peritoneal macrophages was investigated. JBE was obtained in yeast cells culture supernatant (liquid F-10 medium containing 0.5 % D-Glucose) and showed by SDS-PAGE and silver nitrate staining a 190 kDa component and, under reducing conditions, a 70 kDa component. Moreover, JBE was localized by rabbit anti-gp190 IgG and immunogold reaction on yeast cells surface. Peritoneal macrophages from BALB/c mice were treated with JBE (50 e 100 µg/mL) and incubated with *P. brasiliensis* yeast cells FITC labelling pre-treated with 50 mM monosaccharides: N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), or D-Glucose, or D-Galactose or D-Mannose. JBE was able to promote phagocytosis inhibition (40 %) and NO release by JBE-treated macrophages. The phagocytosis inhibition increased to 64 % when JBE-treated macrophages were incubated with yeast cells pre-treated with GlcNAc, though NO release was decreased. Yeast cells were treated with mice anti-JBE IgG F(ab) polyclonal fragments (50 e 100 µg/mL) and macrophages treated with 50 mM monosaccharides promoted phagocytosis inhibition, the incubation of both promoted a increase on phagocytosis inhibition. The incubation of JBE-treated macrophages (50 µg/mL) and yeast cells pre-treated with anti-JBE IgG F(ab) (50 µg/mL) promoted phagocytosis inhibition (61,5 %). This results suggest that JBE could be involved on the fungus and host interaction because its localization. Furthermore, JBE potentializes the phagocytosis of *P. brasiliensis* yeast cells by murine peritoneal macrophages. Probably, the phagocytosis inhibition and NO decrease by GlcNAc is due to gp 70 affinity to GlcNAc. The anti-JBE IgG F(ab) probably occupies sites of interaction on yeast cells and improve the phagocytosis inhibition by monosaccharides or JBE on macrophages. In conclusion, JBE has component able to promote invasion of fungus.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, macrophages, exoantigen, carbohydrates.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - *Paracoccidioides brasiliensis*: aspectos gerais

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), micose profunda existente na América Latina, com alta incidência no Brasil (FRANCO et al., 1987). O relato da doença 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 por *P. brasiliensis* iniciam-se pela inalação de fragmentos miceliais ou de conídios. Estes se transformam em leveduras, no pulmão, segundo observações feitas em camundongos (McEWEN et al., 1987). A maior susceptibilidade à PCM reflete-se na incidência de 13 a 87 vezes maior em homens que em mulheres (STOVER et al., 1986; KUROKAWA et al., 1998), o que é atribuível ao efeito inibitório do estradiol sobre a transformação de conídios e micélios em leveduras, acarretando um retardo na adaptação do fungo aos tecidos do hospedeiro (RESTREPO et al., 1984).

Um grande espectro de manifestações clínicas, patológicas e imunológicas pode ser observado nos pacientes infectados, incluindo: infecções assintomáticas, que compreende o maior grupo de indivíduos infectados; formas clínicas polares da PCM hiperérgica (ou localizada), com envolvimento pulmonar, cutâneo e visceral; e PCM anérgica (ou doença disseminada), com envolvimento de linfonodos, hepatoesplenomegalia, disfunção de medula óssea (FRANCO; MONTENEGRO, 1984).

A PCM tem sido classificada em duas formas clínicas principais: forma aguda ou juvenil (JF), caracterizado pela PCM anérgica e forma crônica ou adulta (AF), caracterizado pela PCM hiperérgica (FRANCO et al., 1987). Do ponto de vista imunopatológico, JF tende a se caracterizar por lesões necróticas com abundantes células fúngicas, prejuízo da imunidade mediada por células e altos títulos de anticorpos circulantes. Já AF, apresenta lesões raramente disseminadas, imunidade mediada por células mais preservada e baixo nível de anticorpos circulantes, estando associada aos granulomas e pequeno número de células fúngicas (DEL-NEGRO et al., 1994).

Estudos mostram que o perfil de resposta imunológica Th2 ocorre em JF, caracterizado pela produção de IL-4, IL-10 e IL-5, elevados níveis de anticorpos IgG4 e IgE anti-*P. brasiliensis* e eosinofilia (MAMONI et al., 2002; OLIVEIRA et al. 2002). Esses fatores associados à baixa concentração de IFN- γ e níveis de proliferação de linfócitos são correlacionados a mais severa manifestação da doença. Em contraste, indivíduos sadios que vivem nas áreas endêmicas mostram um padrão Th1 de resposta com níveis substanciais de IFN- γ , TNF- α e IL-2 e pouco ou nenhum nível de IL-4, IL-5 e IL-10. Assim, esses indivíduos provavelmente desenvolvem uma resposta imunológica mais eficiente, sendo capazes de prevenir a doença. Uma resposta imunológica intermediária é observada em pacientes AF, cuja produção de IFN- γ e IL-10 não difere da observada no grupo JF, embora os níveis de IL-4 e IL-5 sejam significativamente baixos (OLIVEIRA et al., 2002).

A ativação policlonal de linfócitos B é um fenômeno característico na AF, associa-se a hipergamaglobulinemia, ao aumento dos níveis de complexos imunes circulantes e a ativação do sistema complemento pela via clássica (MUNK et al., 1992). Altos níveis séricos de IgG, IgE e IgA estão diretamente correlacionados com a gravidade da doença (BIAGIONI et al., 1984), bem como os altos níveis de anticorpos séricos anti-gp43 e anti-gp70, nos mesmos pacientes, que reforçaram a idéia da existência de uma resposta Th2 na PCM, relacionada

com a incapacidade do sistema imunitário de controlar a infecção (BENARD et al., 1997). Esses anticorpos foram caracterizados, sendo que IgG e IgA foram detectados em todas as formas da doença e IgM, nos casos agudos (GIANNINI et al., 1990).

A expressão de isotipos de anticorpos específicos para a gp43 mostrou altos níveis de IgG em JF, com predomínio de IgG4, que corresponde ao isotipo regulado por IL-4. Já IgG2, isotipo que predominou entre pacientes com AF, principalmente associada a quadros benignos da doença, é regulado por IFN- γ (BAIDA et al., 1999). A alta expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) na lesão de pacientes com JF representa um mecanismo pelo qual o fungo evade do sistema imunológico do hospedeiro contribuindo para a maior severidade e forma disseminada da doença (NEWORAL et al., 2003).

Em camundongos, a produção de IFN- γ e IL-2 e de anticorpos IgG2a está associada à resistência ao *P. brasiliensis*. Porém, a produção de baixos níveis de IFN- γ , 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). Camundongos com deficiência de IL-4 apresentam altos níveis de IFN- γ e leucócitos polimorfonucleares no pulmão, níveis reduzidos de IL-10, IL-12, IL-3, GM-CSF e proteína quimiotática de monócitos 1, além de organizar melhor a formação de granulomas (PINA et al., 2004).

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 apresentam 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). Alterações tímicas podem estar envolvidas no fenômeno de imunossupressão freqüentemente associado com a infecção por *P. brasiliensis* (SOUTO et al., 2003). A citocina

IL-10 e o 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 indução da NO-sintetase é dependente do sinergismo de ação de citocinas Th1, como IFN- γ e TNF- α , e de produtos liberados pelo próprio agente patogênico. A produção aumentada de NO correlaciona-se não só com o aumento da atividade microbicida dos macrófagos, mas também com fenômenos antagônicos, como a inibição da expressão do antígeno Ia na superfície de macrófagos e a supressão da resposta de células T específica para antígenos de *P. brasiliensis* (BOCCA et al., 1999). No estudo de Nascimento et al. (2002), foi relatado que a produção de NO por macrófagos, embora seja crítica no controle da multiplicação do fungo, tanto em camundongos resistentes e susceptíveis, representa um marco da suscetibilidade à infecção quando sua produção é alta e persistente.

A depressão da resposta mediada por células T, durante a infecção por *P. brasiliensis* 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). O mecanismo que leva a não-resposta das células T aos antígenos de *P. brasiliensis* na PCM é desconhecido. Sabe-se que não está associado com o desequilíbrio na produção de citocinas ou na ausência de CD28. Apenas células de pacientes infectados expressam altos níveis de CTLA-4, Annexin V(+) e FasL. O bloqueio de CTLA-4 e FasL resulta no aumento da produção de IFN- γ . A inibição de FasL e CTLA-4, mas não do TGF- β , leva à proliferação de células T em pacientes infectados. A apoptose mediada por Fas-FasL e o envolvimento de CTLA-4 estão envolvidos na modulação da resposta imune em pacientes infectados com *P. brasiliensis* (CAMPANELLI et al., 2003).

Gonzales et al. (2003) sugerem que citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-1, MIP-2, podem ser responsáveis pelo recrutamento de leucócitos no pulmão nos estágios

iniciais da infecção. Monócitos de pacientes com PCM são uma importante fonte de citocinas pró e anti-inflamatórias, como IL-1, IL-8, TNF- α , IL-6, IL-10 e TGF- β 1. O desequilíbrio dessas citocinas está associado à patogênese da doença (PERAÇOLI et al., 2003).

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

Células T CD8⁺ podem ter um importante papel na patogênese da PCM pulmonar. Estas células, encontradas no lavado bronco alveolar de pacientes com PCM, bem como citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos alveolares e anticorpos específicos contra *P. brasiliensis*, possivelmente seriam atraídas ao sítio da infecção via MIP-1 α (FORNAZIM et al., 2003).

Em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), a PCM não corresponde a uma intercorrência freqüente. A ocorrência da PCM na população infectada por HIV (vírus da imunodeficiência humana) parece não diferir da população com a micose cujos pacientes são soro-negativos para o HIV. Os quadros clínicos exuberantes e severos manifestados, quando da presença de ambas as infecções, sugerem uma alteração no curso natural da PCM como resultado da imunossupressão por HIV (SILVA-VERGARA et al., 2003). Autores sugerem que a PCM deve ser incluída como infecção oportunista da AIDS em áreas endêmicas de ocorrência dessa micose (CORTI et al., 2004).

1.2 - Antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*

Há uma variabilidade no padrão de proteínas sintetizadas entre diferentes isolados e diferentes formas fúngicas. Micélios de um isolado apresentam maior heterogeneidade de síntese protéica que as leveduras do mesmo isolado, sugerindo um padrão de expressão gênica mais homogêneo na forma adaptada ao hospedeiro que na fase saprofítica, quando micélios devem adaptar-se a diferentes condições ambientais (SALEM-IZACC et al., 1997).

Culturas de fungos em meio líquido contêm exoantígenos fúngicos altamente glicosilados (TRAVASSOS et al., 1995). 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, que proporciona a preparação de exoantígenos fúngicos e o tratamento químico ou a ruptura mecânica das células fúngicas, que fornece antígenos somáticos e metabólicos (NEGRONI, 1968; YARZÁBAL, 1982; CAMARGO et al., 1988).

Dentre os fatores próprios do fungo capazes de aumentar sua patogenicidade, os mais freqüentemente mencionados são os lípides e os polissacarídeos (SAN-BLAS; SAN-BLAS, 1982; SILVA; FAZIOLI, 1985) e, mais recentemente, a glicoproteína (gp) de 43 kDa, o antígeno predominante em *P. brasiliensis* (VICENTINI et al., 1994; LOPES et al., 1994).

Frações antigênicas mistas têm sido utilizadas em várias provas sorológicas para o diagnóstico da PCM, tais como: imunodifusão, contraímuno eletroforese, fixação do complemento, imunofluorescência indireta e em testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (DTH) (DEL NEGRO et al., 1991). A elaboração dos ensaios para diagnóstico deve levar em conta que vários antígenos identificados em *P. brasiliensis*, constitutivos ou secretados, são compartilhados por outros fungos patogênicos, tais como: *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitides*, levando a ocorrência de reações cruzadas, entre pacientes com diferentes micoses, em testes cutâneos e sorológicos

(ANDRIEU et al., 1969; YARZÁBAL et al., 1973). Tal fato é coerente com observações como a de Goldani et al. (1995) que, ao seqüenciarem um fragmento de DNA de 110 pares de bases de *P. brasiliensis*, detectaram homologia de 60 % com gene que codifica uma glicoproteína de superfície de *Pneumocystis carinii*.

Os polissacarídeos predominam na parede celular fúngica. A α -glucana é o principal polissacarídeo da parede de leveduras, estas apresentam apenas traços de β -glucana. Já na fase micelial, a β -glucana é a única glucana presente. Isso tem suscitado a hipótese de que a transformação dimórfica de *P. brasiliensis* exige um controle rigoroso da síntese de glucanas (BRUMMER et al., 1993). A presença de 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),

As formas miceliais e as leveduras de *P. brasiliensis* expressam na sua superfície glicoconjugados contendo ácido siálico (SOARES et al., 1993) e glicosilceramidas, sendo que doze diferentes tipos de ceramidas neutras encontradas não são reconhecidas por soros de pacientes (TAKAHASHI et al., 1996).

Restrepo e Drouhet (1970) utilizaram filtrado de cultura de leveduras de *P. brasiliensis*, para realização de imunoeletroforese frente a soros de pacientes com PCM. Eles identificaram cinco arcos de precipitação; um deles, denominado A, estava presente na reação com todos os soros que tinham atividade precipitante. Restrepo e Moncada (1974) detectaram, por imunodifusão, um componente que consideraram específico e denominaram banda 1, equivalente ao antígeno responsável pela formação do arco A e similar ao antígeno E2, que viria a ser descrito em 1976, sendo este considerado específico pelos autores que o caracterizaram por imunoeletroforese (YARZÁBAL et al., 1976). Brummer et al. (1984), através de imunodifusão de filtrado de cultura de duas semanas, utilizando seis diferentes isolados de *P. brasiliensis* na fase micelial, obtiveram uma fração que foi compartilhada pelos

diferentes isolados e considerada específica para PCM. Essa fração era equivalente ao antígeno do arco A, ao antígeno E2 e à banda 1, já descritos anteriormente. Puccia et al. (1986), ao estudarem antígenos extracelulares, determinaram a natureza do antígeno E2, como correspondente a uma glicoproteína de 43 kDa (gp 43).

O estudo imunoquímico mais completo do antígeno de Fava-Neto (FAVA-NETTO, 1976; FAVA-NETTO; RAPHAEL, 1961) verificou que bandas de massa molecular variadas eram reconhecidas por soros de pacientes com PCM. Dentre elas, a que corresponde a gp43, aplicada ao teste DTH em substituição a paracoccidioidina, cuja reatividade foi atribuída aos epítomos compartilhados entre a gp43 e o antígeno polissacarídico de Fava-Neto (RODRIGUES; TRAVASSOS, 1994). Além disso, as bandas de 30 e 90 kDa foram reconhecidas com alta frequência por soro de pacientes com PCM (MENDES-GIANNINI et al., 1995).

A gp43 foi identificada numa fração glicoprotéica do filtrado de cultura de sete dias de leveduras da cepa 339 de *P. brasiliensis*, separada por cromatografias de exclusão e de afinidade a coluna de Sepharose-Concanavalina A. A análise eletroforética dessa fração revelou três principais componentes de massas moleculares 43, 55 e 72 kDa (PUCCIA et al., 1986). A expressão da gp43 é variável nas diferentes formas do fungo, dependendo do isolado de *P. brasiliensis* utilizado, porém, não se conhece as implicações dessa expressão fase-específica da gp43 (MATTAR-FILHO et al., 1997).

A cinética de liberação da gp43 em cultura demonstrou ser 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). Nessas preparações, a predominância da gp43 nos filtrados foi

observada, pois o ensaio de imunodifusão de exoantígenos de *P. brasiliensis*, frente a soro de pacientes com PCM, revelou identidade imunológica entre a principal linha de precipitação e a obtida com gp43 purificada (CAMARGO et al., 1988).

Os aspectos estruturais e expressão da gp43 foram caracterizados por clonagem. A proteína de fusão recombinante, expressa em *Escherichia coli*, é reconhecida por anticorpo específico anti-gp43 e por soro de pacientes com PCM (CISALPINO et al., 1996). O oligossacarídeo N-ligado à cadeia polipeptídica da gp43 contém um core de manose, ao qual se associam cadeias de poli-manose, de comprimento variado; há uma unidade terminal de β -D-galactofuranose ligada a manose (ALMEIDA et al., 1996). Quando deglicosilada, a gp43 passa a ter a mobilidade eletroforética de uma proteína de 38 kDa, provavelmente pela perda de oligossacarídeos N-ligados com alto conteúdo de manose, e ser reconhecida especificamente por soro de pacientes com PCM, eliminando as reações cruzadas com anticorpos contra *H. capsulatum* (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991a, PUCCIA; TRAVASSOS, 1991b, TRAVASSOS et al., 1995).

Anticorpos séricos, em pacientes com PCM, específicos para a gp43 vêm sendo demonstrados, e essa detecção tem sido utilizada no diagnóstico sorológico da PCM por hemaglutinação passiva (TABORDA; CAMARGO, 1993), “dot imunobinding” (TABORDA; CAMARGO, 1994), ensaio imunoenzimático de captura com anticorpos monoclonais específicos, pelo menos para dois diferentes epítomos da gp43, para detectar anticorpos anti-gp43 no soro de pacientes com PCM, proporcionando alta sensibilidade e especificidade (CAMARGO et al., 1994). Em soros de pacientes com PCM, a proteína exocelular de fusão, gp43-GST, foi reconhecida, através de imunoblot, não sendo reconhecida por soro de pacientes sadios ou com candidíase, aspergilose ou histoplasmose (DINIZ et al., 2002).

O mapeamento de um epítomo de 15 aminoácidos da gp43 foi procedido baseado na indução de linfoproliferação em células primadas de três diferentes haplotipos. Sequências de

12 resíduos foram exigidas para o peptídeo ser ativo, o que indica a apresentação por moléculas de MHC de classe II, reforçada pela observação de que a resposta proliferativa observada envolvia linfócitos TCD4+ secretores de IFN- γ e IL-2. Imunização de camundongos com gp43, ou com o peptídeo mapeado, leva à vigorosa proteção manifestada frente ao desafio intratraqueal com formas virulentas de *P. brasiliensis*; este peptídeo não induziu resposta humoral. O efeito protetor do peptídeo é atribuído à sua capacidade de induzir resposta imune celular mediada por IFN- γ (TABORDA et al., 1998).

O segundo antígeno protéico de *P. brasiliensis* mais estudado tem massa molecular de 58 kDa e foi descrito por Figueroa et al. (1995). Há indicações químicas que a gp58 tenha um oligossacarídeo O-ligado a cadeia polipeptídica. O antígeno de 58 kDa foi detectado por imunohistoquímica no citoplasma de micélios e leveduras de *P. brasiliensis*, bem como em secções de amostras de tecidos coletadas de pacientes com PCM. Através de "western blot", verificou-se que a gp58 é reconhecida por 81 % dos soros de pacientes com PCM testados. O mesmo laboratório que estudou o antígeno de 58 kDa descreveu a identificação de um componente fúngico de massa molecular 87 kDa. O anticorpo monoclonal, que reconhece este componente, foi utilizado para o desenvolvimento de um teste 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 seguimento 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).

Uma preparação bruta de exoantígenos e de antígenos somáticos de *P. brasiliensis* foi utilizada por Freitas-da-Silva e Roque-Barreira (1992) para produzir anticorpos em coelho, que foram utilizados no desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático que detectou antígenos fúngicos circulantes em pacientes com PCM. Essa metodologia foi utilizada em estudo que correlacionou antigenemia em pacientes com PCM com a baixa resposta

proliferativa das células mononucleares do sangue periférico, sugerindo que antígenos de *P. brasiliensis* no plasma de pacientes, mesmo em baixas concentrações, pode ser fator determinante de redução da resposta imune celular e participar da gênese das alterações imunorregulatórias que se observam na doença (SUGIZAKI et al., 1999). Uma variante metodológica para detecção de antígenos circulantes na PCM foi descrita por Gómez et al. (1997), substituindo os anticorpos policlonais anti-*P. brasiliensis* por um anticorpo monoclonal específico para um antígeno glicoprotéico fúngico, de 87 kDa.

Atividades de colagenase, elastase e gelatinase foram detectadas em preparações de antígenos extracelulares de *P. brasiliensis* (VAZ et al., 1994). No filtrado de cultura de leveduras de *P. brasiliensis* foi identificado a presença de atividade correspondente a uma enzima pertencente à subfamília de serinas-proteases (CARMONA et al., 1995). O componente com atividade proteolítica serina-tiol degrada a membrana basal da matriz extracelular através da clivagem de laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanas, o que confere papel potencial na etapa inicial de invasão tecidual pelo fungo (PUCCIA et al., 1998). Puccia et al. (1999) demonstraram que o componente proteolítico que degrada a membrana basal localiza-se na faixa de migração entre 43 e 69 kDa.

Enzimas do sistema quitinolítico de fungos que, juntamente com as quitinases, desempenham papel importante na morfogênese de fungos, foram isoladas e purificadas a partir de extrato celular total de leveduras de *P. brasiliensis*. Uma delas, NAG I, foi reconhecida por soro de pacientes com PCM (SOARES et al., 1999). Enzimas como catalase, aldolase, duas isoformas de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, triosefosfato isomerase e malato desidrogenase, foram identificadas em *P. brasiliensis*, assim como em outros patógenos (FONSECA et al., 2001). San-Blas et al. (1998) identificaram componentes citosólicos com atividade proteinase nas duas fases morfológicas de *P. brasiliensis*. Nas preparações miceliais diversos componentes ativos foram identificados na faixa de massa

molecular entre 58 e 112 kDa. Um componente único, de 70 kDa, foi encontrado nas preparações de leveduras.

Dois glicolípideos ácidos também foram encontrados em micélios e leveduras de *P. brasiliensis*. Apenas um deles é reconhecido por soros de pacientes com PCM (TOLEDO et al., 1995). Esse glicolípideo imunogênico contém uma galactofuranose, cuja remoção reduz significativamente sua reatividade por soros de PCM, indicando a presença de anticorpos anti-galactofuranose no soro desses doentes (LEVERY et al., 1996). Suzuki et al. (1997), mostraram que um anticorpo monoclonal específico para a β -galactofuranose do antígeno glicolípídico de *P. brasiliensis* reage cruzadamente com *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi*, reconhecendo resíduos ligados a manose.

Burgos et al. (1985) purificaram por cromatografia antígenos somáticos da cepa 339 de *P. brasiliensis*, que haviam sido identificados como responsáveis por reação de imunodifusão específica da PCM, isolando duas frações protéicas 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 também várias outras frações que possuíam reatividade cruzada com soro de pacientes com histoplasmose, candidíase e aspergilose.

Salina et al. (1998), detectaram antígenos de *P. brasiliensis* em amostras de urina de pacientes com PCM, através de um teste ELISA competitivo e "western blot". As bandas de 43 e 70 kDa foram as mais detectadas principalmente em amostras coletadas antes do início do tratamento e foi observado que a reatividade diminuía nas amostras coletadas durante a recuperação clínica e aumentou nas ocasiões de recidiva.

Um gene que codifica uma proteína de 27 kDa de *P. brasiliensis* foi clonado a partir de uma biblioteca de cDNA da fase micelial, sequenciado e caracterizado como codificador de uma cadeia peptídica de 259 aminoácidos com uma massa molecular de 28,6 kDa e de

27 kDa. O fragmento de DNA clonado foi expresso em *E. coli* (McEWEN et al., 1996). Essa proteína recombinante foi utilizada para desenvolver um teste ELISA indireto para detecção de anticorpos específicos na PCM. O ensaio proporcionou alta sensibilidade e apresentou reatividade cruzada com soros de pacientes com histoplasmose e aspergilose (ORTIZ et al., 1998).

Além do estudo de componentes de forma isolada, o estudo com fracionamento de antígenos solúveis de *P. brasiliensis* por cromatografia líquida de proteínas (FPLC), proporcionou a obtenção de sete frações (F0 - FVI) com múltiplas bandas protéicas, variando de 18 a 114 kDa, e apenas a fração VI não foi reconhecida por soro de pacientes com PCM. A caracterização biológica das preparações obtidas por esse fracionamento, mostrou que as frações III e V estimulam a resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico, FII e FIII aumentam a formação de granuloma *in vitro*, associado à produção de TNF- α e IFN- γ , apesar de ser observado diminuição da produção de NO. A fração F0, por sua vez, induz baixa resposta proliferativa, promove a formação de granuloma, eleva significativamente a produção de IL-10 e a produção de NO (DINIZ et al., 1999; DINIZ et al., 2001). Camundongos BALB/c imunizados com F0 apresentaram resposta celular e humoral com produção significativa de IFN- γ , IgG2a e IgG3; os imunizados com FII produziram IFN- γ , IL-10, IgG2a e IgG1; e os imunizados com FIII produziram IFN- γ , IL-10, TGF- α , IgG2a e IgG1 (DINIZ et al., 2004).

Panunto-Castelo et al. (2003), estudando o isolado BAT, encontraram um alto número de proteínas antigênicas. Mais de 80 % dessas proteínas foram reconhecidas por IgG do soro de pacientes, resultados maiores que o obtido para isolado B-339, largamente utilizado para diagnóstico sorológico da infecção por *P. brasiliensis*. Nesse estudo detectou-se que 50 % das proteínas do exoantígeno do isolado BAT são compartilhadas com outros isolados e estão entre 22 e 70 kDa, o que não ocorreu com as proteínas de alto peso (160 a 172 kDa), que

foram detectadas em BAT e em mais dois isolados, estando ausentes em P-18 e B-339. Para o isolado BAT, as altas frequências de reconhecimento por IgG foram obtidas para os antígenos de 43 kDa (97 %), 160 kDa (78 %) e 70 kDa (60 %).

Recentemente foi isolado uma proteína de 61 kDa, reativa com soro de pacientes com PCM, descrito por Moreira et al. (2004), mostrando que essa proteína foi identificada como uma catalase, possuindo homologia funcional com catalases de outros fungos. Esta catalase está altamente expressa durante a transição de micélio para levedura. Parece possível que essa catalase possa atuar na defesa de *P. brasiliensis* contra o mecanismo de morte dependente de oxigênio.

1.3 - Interação entre fungos e fagócitos

A defesa contra fungos requer uma resposta bem coordenada do sistema imune inato e adaptativo. A defesa por neutrófilos e macrófagos é importante para eliminação de micoses, enquanto as células dendríticas contribuem para iniciar a imunidade adaptativa (MANSOUR; LEVITZ, 2002).

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 deste fungo e fagócitos é facilitado pela ativação da via alternativa do sistema complemento, que leva a 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 gp43 (ALMEIDA *et al.*, 1998).

1.3.1 - Células dendríticas

As células dendríticas (DCs) parecem ser capazes de diferenciar as diferentes formas fúngicas, pois como observado para DCs murinas, essas células foram capazes de responder de maneira distinta às duas fases de *Candida albicans*, iniciando uma resposta Th2 para hifas e Th1 para leveduras (OSTIANI *et al.*, 2000) e também distinguem entre as fases de *Aspergillus fumigatus*, polarizando uma resposta Th1 para conídios e Th2 para hifas (BOZZA *et al.*, 2002).

As DCs exercem atividade contra *C. albicans* comparável aos macrófagos e parece funcionar de maneira independente dos radicais de oxigênio e nitrogênio. Observações similares são vistas para *A. fumigatus*, *H. capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Malassezia furfur*. Estimuladas por esses fungos, as DCs regulam positivamente moléculas co-estimulatórias como MHC de classe II, B7-1 e B7-2, importantes para iniciar uma resposta mediada por células. As DCs promovem fagocitose e morte dos fungos e produzem citocinas como IL-12 (MANSOUR; LEVITZ, 2002). Leveduras de *H. capsulatum* se ligam a VLA-5 na superfície de DCs humanas levando a internalização das leveduras e eventual processamento dos antígenos deste fungo. As DCs humanas são superiores aos macrófagos em controlar o crescimento intracelular de *H. capsulatum* (GILDEA *et al.*, 2001).

Durante a PCM, ocorre baixa eficiência das células dendríticas e também de macrófagos na estimulação de células T que secretam citocinas de perfil Th1 de resposta *in vitro*, este processo pode estar envolvido na progressão da doença *in vivo* (ALMEIDA; LOPES, 2001). Segundo Ferreira *et al.* (2004), a infecção por *P. brasiliensis* e a própria gp43

purificada, promovem a regulação negativa das moléculas do MHC de classe II e das propriedades de adesão das DCs imaturas.

1.3.2 - Neutrófilos

Os neutrófilos representam uma abundante população de fagócitos, normalmente são ausentes do aparato requerido para a apresentação de antígenos, porém, fagocitam com eficiência micróbios opsonizados, pois possuem receptores Fc para imunoglobulinas e receptores para o complemento. Estes fagócitos são dotados de um potente mecanismo de morte oxidativa, formando radicais oxidativos que matam, por exemplo, *A. fumigatus* (MANSOUR; LEVITZ, 2002). Além de serem dotados de um mecanismo de morte não oxidativo, como defensinas com potente atividade contra *C. neoformans* (MAMBULA et al., 2000) e lactoferrina com atividade contra *C. albicans* (TANNIDA et al., 2001).

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

1.3.3 - Macrófagos

Embora possuam o aparato requerido para a apresentação de antígenos, os macrófagos contribuem principalmente para morte de patógenos. Esse processo é melhorado após a ativação por IFN- γ , além disso, este fagócito secreta citocinas como TNF- α e IL-12, quimiocinas como MIP-2 e outras substâncias imunomodulatórias (MANSOUR; LEVITZ, 2002). Estudos com citocinas que se relacionam à capacidade dos macrófagos em fagocitar

mostram, por exemplo, que GM-CSF restaura a atividade contra conídias de *A. fumigatus* (BRUMMER et al., 2001) e que monócitos humanos tratados com M-CSF aumentam a produção de ânions superóxidos e a fagocitose de blastoconídias de *C. albicans* (GIOULEKAS et al., 2001), assim como IL-13 também o faz (KATSIFA et al. 2001). As células NK melhoram a atividade de macrófagos contra *C. neoformans* pela produção de IFN- γ em resposta às citocinas produzidas por células TCD4+, como IL-12 (KAWAKAMI et al., 2000).

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 matam as leveduras fagocitadas (BRUMMER et al., 1989). Durante os estágios iniciais da infecção por *P. brasiliensis*, a disseminação do fungo é limitada por macrófagos ativados associado à ocorrência de altos níveis de TNF- α (PARISE-FORTES et al., 2000). Em camundongos, IFN- γ ativa macrófagos que matam conídios de *P. brasiliensis* através do mecanismo de Óxido Nítrico-L-Arginina (GONZALES et al., 2000). Para extermínio efetivo de *P. 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 macrófagos, durante o processo de fagocitose, ativam um mecanismo de captura de micróbios mediado pelo citoesqueleto, sob ligação de partículas ligantes de micróbios aos receptores de superfície específicos. Os macrófagos possuem receptores de opsonização que reconhecem componentes do soro que são depositados nos micróbios, como o receptor Fc para imunoglobulinas e receptores para complemento. Já os receptores não-dependentes de opsonização distinguem entre as células inofensivas do hospedeiro e as moléculas de superfícies de micróbios, potencialmente perigosos, bem como o material liberado por eles (LINEHAN et al., 2000).

Os diversos caminhos dos macrófagos na defesa do organismo são refletidos na variedade de receptores lectínicos dos macrófagos. Os receptores de manose, específicos para oligossacarídeos terminados em manose, fucose e N-acetil-glicosamina, interagem com ligantes microbicidas, proteases lisossomais, glicosidases e peroxidases, estando envolvido na fagocitose e endocitose e na eliminação de resíduos do próprio organismo e de microrganismos. O sítio lectínico CR3, específico para β -D-glucanas e alguns oligossacarídeos contendo manose e N-acetil-glicosamina, tem como ligantes naturais os micróbios. O receptor de galactose de macrófagos, específico para oligossacarídeos com terminação em galactose ou N-acetil-galactose, se liga aos antígenos tumorais e existe a possibilidade da ligação por micróbios (LINEHAN et al., 2000).

Outros receptores de macrófagos, já caracterizados, incluem: os receptores das células de Kupffer, específico para oligossacarídeos terminados em galactose, fucose e N-acetil-galactose, têm como ligantes as células apoptóticas; a Galectina-3, uma lectina específica para oligossacarídeos que contêm galactose e que tem como ligantes IgE e outras moléculas do próprio organismo; o receptor específico para β -glucanas; as sialoadesinas, específicas para oligossacarídeos terminados em ácido siálico, apresentando como ligante de eritrócito de carneiro, mediando interação entre células; e a lectina tipo-C de macrófagos murinos, cuja especificidade e ligantes ainda não estão definidos (LINEHAN et al., 2000).

Receptores inatos como os receptores Toll-like (TLR) expressos em macrófagos e DCs reconhecem moléculas associadas aos patógenos em bactérias e vírus. Esses receptores também vêm mostrando importância no reconhecimento de fungos, pois foi demonstrado que o componente polissacarídeo mais importante da cápsula de *C. neoformans*, glicuronoxilomanana, interage com TLR4 (SHOHAM et al., 2001) e que camundongos deficientes de TLR4 tem alta carga fúngica em modelos de candidíase, quando comparados aos camundongos normais (NETEA et al., 2002).

1.4 - Interações lectina-carboidrato na relação entre agentes patogênicos e hospedeiro

Segundo Lis e Sharon (1986), as lectinas representam uma classe de glicoproteínas de origem não imune que se ligam especificamente aos carboidratos, com capacidade de aglutinar células ou precipitar conjugados. Além de específica, elas se ligam de forma reversível. Embora as lectinas sejam conhecidas há muitas décadas, a idéia que elas possam mediar fenômenos biológicos pelo reconhecimento de moléculas é recente.

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

A propriedade da jacalina, lectina capaz de ligar-se especificamente a diversos glicoconjugados, e que contém na sua composição, oligossacarídeos com um núcleo dissacarídeo β -D-Gal(1-3)D-GalNAc, vem sendo utilizada para isolar glicoproteínas O-ligadas. Desse modo, se liga seletivamente às glicoproteínas solúveis e tem sido utilizada para isolar e caracterizar glicoproteínas (SASTRY et al., 1986; ROQUE-BARREIRA; CAMPOS-NETO, 1985).

Interações lectina-carboidrato representam um 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, na 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).

Lectinas, devido a sua habilidade de reconhecimento e discriminação entre açúcares, são excelentes candidatas a mediar interações entre parasitas e células do hospedeiro. Várias glicoproteínas com atividade lectínica ou capazes de interagir com lectinas vêm sendo estudadas. Málaga e Yoshida (2001) verificaram que existe uma associação inversa entre a infectividade e a expressão da gp90 da superfície de *T. cruzi*, na sua fase metacíclica, pois esta gp se liga às células de mamíferos por um receptor independente do sinal de Ca^{2+} em contraste com a gp82, que implica com a invasão ao hospedeiro e mobilização de Ca^{+} . Thomsson et al. (2002) revelam que glicoproteínas, mucinas de alto peso molecular da saliva, MG1 e MG2, criam um enorme repertório para sítios ligantes por microrganismos, sendo um dos principais portais para que estes invadam o hospedeiro.

Tani et al. (2001) revelam que a interação da gp64 do envelope de baculovírus e fosfolípidos na superfície celular é um importante caminho para infecção celular em mamíferos. Enquanto que Hung et al. (2000) evidenciam que a glicoproteína SOW de superfície celular de *Coccidioides immitis* é o principal antígeno que leva à resposta imune humoral e celular em pacientes infectados com esta coccidioidomicose. Mansour et al. (2002) verificam que manoproteínas solúveis de *C. neoformans* são ligantes de receptores de manose de macrófagos e que a estimulação de células T é funcionalmente inibida por bloqueio competitivo de manoproteínas e por resíduos de carboidratos.

Vários estudos sobre o papel da gp43 mostram seu envolvimento na patogenicidade de *P. brasiliensis*, sugerindo que ela favoreça a virulência do fungo e se contraponha aos mecanismos de resposta protetora do hospedeiro. A secreção da gp43, *in vivo*, e sua circulação como antígeno livre, ou complexado, podem inibir a atividade das células NK e induzir células supressoras. A gp43 se liga à laminina de matriz extracelular, essa interação medeia a adesão de leveduras à superfície de células epiteliais, facilitando a disseminação tecidual do fungo (VICENTINI et al., 1994).

A gp43 está ainda envolvida na adesão de *P. brasiliensis* aos macrófagos peritoneais murinos, fenômeno que leva à fagocitose e pode favorecer a morte do fungo. Este efeito é inibido por anticorpos anti-gp43. As hemácias revestidas com gp43 foram mais eficientemente internalizadas por macrófagos que as hemácias não sensibilizadas. Ensaio de inibição indicam o envolvimento de resíduos de fucose e manose na fagocitose do fungo ou das hemácias (ALMEIDA et al., 1998). Popi et al. (2002) relatam que a gp43 também pode estar envolvida num mecanismo de evasão do fungo inibindo a liberação de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio, envolvidos na atividade microbicida do macrófago.

Mattos-Grosso et al. (2003), observaram que a gp70 é capaz de inibir a atividade de macrófagos através de receptores de manose e receptores Fc, além de inibirem a liberação de NO e H₂O₂ por macrófagos peritoneais *in vitro*. O tratamento com anticorpos monoclonais anti-gp70 aboliu a formação de granuloma no pulmão de modelos experimentais infectados com *P. brasiliensis* sugerindo que esta proteína facilita o estabelecimento e progressão da infecção.

Uma fração antigênica do sobrenadante de cultura de levedura do isolado BAT de *P. brasiliensis* foi isolada e caracterizada por sua habilidade de se ligar a jacalina imobilizada. Essa fração foi denominada **JBE** (“**J**acalin **B**inding **E**xoantigen” - Exoantígeno Ligante de Jacalina) e corresponde a 1,67 % das proteínas fúngicas secretadas. Ela possui uma banda de 190 kDa, freqüentemente associada a componentes de 70 e 55 kDa, essas duas bandas foram mais proeminentes sob condições redutoras. Estes componentes foram reconhecidos por anticorpos de coelho gerados por imunização com a banda de 190 kDa. Nenhum outro componente de preparação bruta de exoantígeno foi reconhecido pelos anticorpos anti-banda de 190 kDa (GENNARI-CARDOSO, 2000).

Através de ensaios de interação de amostras de **JBE** com esferas de diferentes açúcares, **JBE** apresentou a seguinte ordem de afinidade: N-acetil-D-glicosamina > D-Glicose

> D-Manose > melibiose. Não houve ligação à galactose-agarose ou às esferas de agarose não modificadas. Esses dados foram considerados sugestivos que a fração **JBE** contivesse um componente lectínico com afinidade para N-acetil-D-glicosamina, sendo purificada em coluna de Agarose-N-acetil-glicosamina, passando a ser denominada Paracoccina. A Paracoccina corresponde essencialmente ao componente de 70 kDa da fração **JBE**. **JBE** mostrou-se capaz de se ligar a laminina e induzir liberação de NO (GENNARI-CARDOSO, 2000). A expressão da Paracoccina é compartilhada por vários isolados de *P. brasiliensis*, podendo também apresentar diferentes extensões da lectina e diferentes atividades enzimáticas (RUAS et al., 2002).

Conhecendo a importância dos antígenos de *P. brasiliensis* no entendimento da sua patogênese, bem como da interação desses antígenos com o hospedeiro, o entendimento da interação entre leveduras de *P. brasiliensis* e fagócitos torna-se relevante, uma vez que estas células representam uma importante linha de defesa contra este patógeno. Assim, nosso estudo busca avaliar a relação de **JBE** na interação entre leveduras de *P. brasiliensis* e macrófagos peritoneais murinos.

2 - OBJETIVOS

- Verificar a presença de **JBE** (“**J**acalin **B**inding **E**xoantigen” - Exoantígeno Ligante de Jacalina) em leveduras do isolado BAT de *Paracoccidioides brasiliensis*, cultivadas em meio líquido F-10 acrescido de 0,5 % de D-Glicose, através de técnicas imunohistoquímicas e Microscopia Eletrônica.
- Investigar o efeito de **JBE** na fagocitose de leveduras do isolado BAT de *Paracoccidioides brasiliensis* por macrófagos peritoneais murinos, bem como a inibição, nesse evento, pela presença de monossacarídeos e a avaliação da produção de Óxido Nítrico.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Cultivo de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* e obtenção de JBE (“Jacalin Binding Exoantigen” - Exoantígeno Ligante de Jacalina)

3.1.1- Amostras de *P. brasiliensis*

Nosso estudo utilizou um isolado de *P. brasiliensis* denominado BAT recuperado de lesões de paciente com PCM de forma aguda atendido no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e gentilmente cedido pela Dra Maria Cristina Roque Antunes Barreira, do Departamento de Biologia Celular e Molecular de Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). O fungo nos foi enviado na forma de leveduras em meio Sabouraud-Dextrose-Ágar (Difco - Laboratories, Detroit, Mich., USA) acrescido de 0,01 % de tiamina (Difco - Laboratories, Detroit, Mich., USA) e mantido a 35 °C. Repiques foram feitos a cada 15 dias neste meio de cultura.

3.1.2 - Condições de cultivo das leveduras de *P. brasiliensis*

Após sete dias de crescimento em meio Sabouraud-Dextrose-Ágar, a massa de leveduras provenientes de um tubo de cultura de 12,5 mL foi homogeneizada, com auxílio de pérolas de vidro, em um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de meio líquido de cultura F-10 (Gibco-BRL, Life technologies, NY, USA) acrescido de 0,5 % de D-Glicose (Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA). Em seguida foram feitas contagens das células fúngicas utilizando-se uma câmara de Neubauer (Weber Scientific International, Lancing,

Sussex, England) e microscópio óptico, objetiva de 40 x (Olympus Optical Co, LTD, Japan). O volume total desse homogeneizado foi repicado em um Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido de cultura F-10 acrescido de 0,5 % de D-Glicose e este material mantido por sete dias em uma câmara giratória (TE-420, Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) na rotação de 80 rpm a 35 °C. Após este período, o crescimento celular foi verificado por nova contagem de unidades fúngicas e o repique procedido em um volume correspondente a 10^7 células para outro frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido de cultura F-10 acrescido de 0,5 % de D-Glicose. Este frasco foi mantido a 35 °C em câmara giratória na rotação de 80 rpm por 16 dias.

3.1.3 - Obtenção do sobrenadante de cultura de leveduras de *P. brasiliensis*

Após o período de cultivo das leveduras como descrito no item 3.1.2, as células fúngicas foram mortas através de contato com timerosal (Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA) a 0,02 %, durante uma noite a 4 °C. A cultura foi centrifugada a 1125 x g por 10 minutos para separação das leveduras. O sobrenadante de cultura líquida foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 3 (Whatman International Ltda – Maidstone, England), concentrado em membrana YM-30 utilizando-se aparelho Amicon (Amicon - Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) até a obtenção de um volume final de 5 mL e submetido a duas diálises sucessivas contra 100 mL de solução de salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M (pH 7,2) a 4 °C. Ao final dessa diálise, a preparação de exoantígenos foi submetida à dosagem de proteínas pelo método de Lowry et al. (1951) e distribuída em alíquotas de 3 mL, seguido da adição de 1 mM do inibidor enzimático PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil - Sigma Chemical Co, St.Louis, USA).

3.1.4 - Cromatografia de afinidade, em coluna Sepharose®-Jacalina, do sobrenadante de cultura líquida de leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis* para obtenção de **JBE**

Em coluna com leito de 5 mL de Sepharose®-Jacalina (coluna gentilmente cedida pelo laboratório da Dra Maria Cristina Roque Antunes Barreira, FMRP-USP), equilibrada com PBS 0,01 M (pH 7,2), foram aplicados 3,0 mL da preparação de exoantígeno (5 mg de proteína). A preparação permaneceu incubada durante 6 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). Frações de 2 mL cada uma (eluato PBS) foram coletadas e submetidas à leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, Brasil) com absorvância em 280 nm, até a obtenção de uma leitura inferior a 0,02. O material adsorvido à coluna foi eluído com PBS 0,01 M (pH 7,2) acrescido de 0,4 M de D-Galactose (Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA) e frações de 2 mL cada uma (eluato D-Gal) foram coletadas e monitoradas pela leitura da DO até obtenção de um valor próximo de zero. O eluato D-Gal foi ultradiafiltrado por três vezes sucessivas contra água deionizada em aparelho Amicon, membrana YM-30, submetido à concentração para 2 mL e posterior diálise em água deionizada em 40 vezes o volume inicial. Ao final desse procedimento, um volume de 1 mL foi obtido e a dosagem protéica foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

3.1.5 - Análise de **JBE** por eletroforese em gel de poliacrilamida

A preparação **JBE** foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 8 % (LAEMMLI,1970). A preparação **JBE** (3 µg) foi diluída em tampão de amostra {1 % de SDS (Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA), Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) (Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA) e 50 % de glicerol

(Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil)}, 20 μ L da solução foram aplicados na pista do gel e a placa colocada num sistema de eletroforese vertical (mini-V 8.10, BRL, Life Technologies, Inc.) sob 200 volts constantes e corrente variando de 150 a 200 mA durante 75 minutos. As preparações foram previamente submetidas ao tratamento redutor na presença de 2,8 % de 2-mercaptoetanol (LKB, Produkt AB, Bromma, Sweden), seguido de aquecimento a 100 °C por 3 minutos. O mesmo procedimento foi efetuado para o volume do material não ligante à coluna (eluato PBS). A presença de componentes protéicos foi revelada pela coloração de Nitrato de Prata otimizada (BLUM et al., 1987) e os seus pesos moleculares aparentes determinados com base na reta de calibração estabelecida pela migração de proteínas com pesos moleculares previamente conhecidos: anidrase carbônica (30 kDa), soralbumina bovina (67 kDa) e IgG de coelho (150 kDa).

3.2 - Detecção de JBE em leveduras de *P. brasiliensis* por Microscopia Eletrônica

3.2.1 - Preparo das leveduras de *P. brasiliensis* para Microscopia Eletrônica

Das culturas obtidas com 4, 8, 12 e 16 dias de cultivo, descrito no item 3.3.2 e 3.1.3, após a obtenção do sobrenadante através da centrifugação, foi separado também o precipitado que consistia de células fúngicas mortas. Essas células fúngicas foram lavadas através de centrifugação a 1125 x g em 40 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, os fungos foram transferidos para um Eppendorf e submetidos a mais duas lavagens com 1 mL do mesmo tampão. O sobrenadante foi desprezado e as células fúngicas foram mantidas em uma solução fixadora {4 % de Paraformaldeído (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios, Diadema, SP, Brasil) e 0,5 % de Glutaraldeído (Fluka AG, Chem. Buchs) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4)} por 40 minutos sob agitação lenta.

Posteriormente, a solução fixadora foi desprezada, as células foram lavadas com 1 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) e nelas acrescentado 500 µL de Ágar (Inlab, Brasil) a 1,5 % preparado em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Esse material foi submetido a centrifugação a 1620 x g em temperatura ambiente durante 5 minutos. O material obtido foi congelado a - 20 °C por 5 minutos, retirado do Eppendorf e guardado em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Deste material foram retirados fragmentos para análise em microscópio óptico, objetiva de 40 x, quanto à presença de leveduras e, posteriormente, foram imersos, em temperatura ambiente, respectivamente, em: Etanol (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil) a 70 % por três períodos de 5 minutos; em Etanol a 90 % por dois períodos de 7 minutos; em L.R. White (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) e Etanol a 90 % na diluição de 1:1 por dois períodos de 10 minutos; em L.R. White puro por uma noite; e em L.R.White puro por quatro períodos de 15 minutos. Em seguida este material foi incluído em L.R.White puro e polimerizado a 52 °C dentro de cápsulas de gelatina.

3.2.2 - Ensaio imunohistoquímico para Microscopia Eletrônica

Do material procedente item 3.2.1, cortes ultrafinos foram feitos e depositados sobre telas de Níquel (Ernest F. Fullan, Inc. NY, USA), recobertos por uma película de Parlódio (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) a 2 % e hidratados com TBS {0,02 M de Tris (Merck, Darmstadt, Germany) e NaCl a 0,85 % (Belga Química, Santa Maria, RS, Brasil)} por 15 minutos a temperatura ambiente. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação, o material foi incubado com TBS-T {TBS acrescido de 0,05 % de Tween-20 (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil)} acrescido de 3 % de gelatina (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) por 30 minutos em temperatura ambiente e sob agitação lenta. Como segundo bloqueio da reação, o material foi incubado com soro de cabra normal a 2,5 % (Obtido no Laboratório

de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia) preparado em TBS, por 1 hora a 37 °C. Em seguida, as telas foram incubadas com IgG de coelho anti-gp190 (Produzido no Laboratório da Dra Maria Cristina Roque Antunes Barreira, da FMRP-USP) na diluição de 1:1 em TBS-T acrescido de gelatina a 3 %, durante uma noite a 4 °C. Após cinco lavagens por um período de três minutos em TBS-T, as telas foram incubadas com IgG de cabra anti-IgG de coelho ligada ao ouro coloidal de partícula de 10 nm (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) na diluição de 1:25 preparada em TBS, por 1 hora a 37 °C. As telas foram lavadas cinco vezes por um período de três minutos com TBS e por fim com água destilada. Para contraste, as telas foram incubadas em Acetato de Uranila a 3 % (Merck, Darmstadt, Germany) a 37 °C por 30 minutos, lavadas em água destilada e imersas em solução de Citrato de Chumbo a 1 % (Fluka AG, Chem. Buchs) por 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente o material preparado como descrito acima, foi analisado e fotografado em um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109, Germany). O soro total de coelho imunizado com gp190 também foi utilizado nesse ensaio e, para o controle negativo, foi procedido a incubação do material com soro de coelho normal.

3.3 - Produção da IgG de camundongo anti-JBE e de fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE

3.3.1 - Produção de anticorpo policlonal anti-JBE em camundongo BALB/c

Dois camundongos BALB/c machos de seis semanas, obtidos e mantidos no Laboratório de Experimentação Animal, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, foram inoculados intraperitonealmente com 10 µg de JBE em 100 µL de PBS estéril 0,01 M (pH 7,2) e igual volume de adjuvante completo de Freund (Sigma

Chemical Co., St Louis, USA). Os camundongos foram re-inoculados intraperitonealmente, após 21 dias, com 10 µg de **JBE** em 100 µL e PBS estéril 0,01 M (pH 7,2) e igual volume de adjuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical Co., St Louis, USA). Após 35 e 42 dias da data inicial de inoculação esse mesmo procedimento foi repetido. O soro foi coletado após 3 dias da data da última inoculação e testado por ELISA indireto, conforme descrito no item 3.3.2.

3.3.2 - Ensaio enzimático de imunabsorbância (ELISA) indireto

Placas de poliestileno (Costar, Corning Incorporated, NY, USA) foram incubada com 2 µg de **JBE** em 75 µL de tampão carbonato 0,2 M (pH 9,6), por poço, durante 18 horas a 4 °C. Os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T {PBS 0,01 M (pH 7,2) contendo 0,05 % de Tween-20} e o bloqueio dos sítios inespecíficos foi procedido com 100 µL de PBS-T acrescido de gelatina a 3 %, por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T e incubados com o soro de camundongo anti-**JBE**, ou com a IgG de camundongo anti-**JBE** (obtenção descrita no item 3.3.3), diluídos em uma solução de PBS-T acrescido de gelatina a 1 %, por 1 hora a 37 °C. Após quatro lavagens dos poços com PBS-T, foi procedido a incubação com 100 µL de IgG de cabra anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase na diluição de 1:1000 (Obtido no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia) por 90 minutos a 37 °C. Os poços foram lavados novamente por quatro vezes com PBS-T e 100 µL do substrato {5 mg de Orto-fenilenodiamina (OPD) (Merck, Darmstadt, Germany), 12,5 mL de ácido cítrico 0,1 M (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil), Na₂HPO₄ 0,2 M (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios, Diadema, SP, Brasil) e 20 µL de H₂O₂ a 30 % (Caal, Casa Americana de Artigos para Laboratório, São Paulo, Brasil)} foi acrescentado. A reação foi interrompida pela

adição de 50 μ L, por poço, de H_2SO_4 a 1 N (Abbott, Laboratórios do Brasil, São Paulo, Brasil). A leitura da reação foi feita em fotocolorímetro (Titertek Muliskan Plus, Flow Laboratories International AS, Lugano, Suíça) a 492 nm. A reatividade do soro de camundongo anti-**JBE** ou da IgG de camundongo anti-**JBE** foi considerada satisfatória quando a absorbância correspondia à no mínimo 2,5 vezes maior que a obtida para o controle negativo nos títulos de 1:1600 e 1:200, respectivamente.

3.3.3 - Purificação da IgG anti-**JBE** produzida em camundongos BALB/c

1

Após a obtenção do soro de camundongo anti-**JBE**, como descrito no item 3.3.1, foi procedida a precipitação das imunoglobulinas do soro com diferentes concentrações de Sulfato de Amônia (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil) e posterior diálise contra água deionizada em aparelho Amicon (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), utilizando-se membrana YM-30, até a obtenção de um volume de 2 mL. Esse material foi submetido a duas diálises sucessivas contra 50 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 8) a 4 °C e concentrado para um volume de 2 mL. Esse volume de 2 mL foi incubado em uma coluna de Sepharose®-Proteína-G (Sigma, Chemical Co, St.Louis, EUA) a 4 °C por 2 horas, para purificação da IgG de camundongo anti-**JBE**. A coluna foi lavada com tampão fosfato 0,1 M (pH 8) e a eluição foi feita com Glicina a 0,1 M (pH 2,8) (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil). Todos os passos de purificação das Imunoglobulinas G foram monitorados por espectrofotômetro com absorbância em 280 nm. Os picos mais altos obtidos do eluato foram concentrados e ultradiafiltrados contra tampão fosfato 0,1 M (pH 8) em aparelho Amicon utilizando-se membrana YM-30. A reatividade da IgG de camundongo anti-**JBE** foi testada por ELISA indireto, como descrito no item 3.3.2.

3.3.4 - Obtenção dos fragmentos F(ab) a partir da IgG anti-JBE produzida em camundongo BALB/c

Uma solução contendo 5 mg da IgG de camundongo anti-JBE em 1 mL de tampão fosfato a 20 mM e EDTA a 10 mM (Reagen, Quimibras Industrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil) foi digerida pela adição de 0,5 mL de tampão de digestão {tampão fosfato a 20 mM, EDTA a 10 mM e cisteína a 20 mM (Fluka AG, Chem. Buchs)} e 0,5 mL de papaína (Pierce RKFD, Rackford, IL, USA). A papaína foi lavada por duas vezes com 4 mL de tampão de digestão e incubada por 20 minutos a 37 °C com este mesmo tampão antes da adição da solução contendo a IgG de camundongo anti-JBE. A mistura contendo IgG de camundongo anti-JBE, tampão de digestão e papaína foi incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação lenta. Posteriormente, 2 mL de Tris-HCl a 10 mM foi adicionado ao material e este centrifugado a 1000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi incubado em uma coluna de Sepharose®-Proteína-G por 2 horas a 4 °C. Os fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE foram obtidos durante a lavagem da coluna com tampão fosfato 0,1 M (pH 8), sendo que as IgGs intactas e os fragmentos Fc foram retidos na coluna. A digestão da IgG de camundongo anti-JBE foi analisada por SDS-PAGE a 8 %, de forma semelhante ao descrito no item 3.1.5, porém, sem a adição do agente redutor. A digestão de IgG de camundongo normal também foi procedida visando obter fragmentos F(ab) da IgG de camundongo normal para utilização no ensaio de fagocitose.

3.4 - Preparo das leveduras de *P. brasiliensis* para o ensaio de fagocitose

3.4.1 - Marcação das leveduras de *P. brasiliensis* com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)

Leveduras vivas de *P. brasiliensis*, provenientes das culturas líquidas de 16 dias, como descrito no item 3.1.2, foram obtidas por centrifugação da cultura a 1125 x g por 10 minutos. Posteriormente, as células fúngicas, provenientes de dois frascos de cultivo (2×10^7), foram lavadas com PBS estéril 0,01 M (pH 7,2) e incubadas com 1,53 mg¹ de isotiocianato de fluoresceína (Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA) em 1 mL de tampão carbonato 0,1 M (pH 9), durante 4 horas a 4° C sob agitação lenta. Em seguida, o material foi centrifugado a 1125 x g, o sobrenadante desprezado e as leveduras lavadas por duas vezes com 10 mL de PBS 0,01 M (pH 7,2) sob centrifugação a 1125 x g para retirada do isotiocianato de fluoresceína não ligado.

3.4.2 - Incubação das leveduras de *P. brasiliensis* com monossacarídeos

Uma parte do volume contendo leveduras marcadas com FITC, como descrito no item 3.4.1, foi incubada, em volumes separados, com 50 mM de N-acetil-D-glicosamina, ou D-Glicose, ou D-Galactose, ou D-Manose (Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA), em meio RPMI-1640 (Gibco-BRL, Life technologies, NY, USA) durante 5 horas a 4 °C sob agitação lenta. Posteriormente, essas leveduras foram centrifugadas a 1125 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado, as leveduras centrifugadas a 1125 x g por 10 minutos com 5 mL de meio RPMI-1640 para retirada do excesso de monossacarídeos e ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI-SBF a 10 % {meio RPMI-1640 acrescido de 10 % de soro fetal bovino

(Gibco-BRL, Life technologies, NY, USA), 2 mM de Glutamina (Gibco-BRL, Life technologies, NY, USA), 10.000 UI/mL de penicilina G (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 10 mg/mL de estreptomicina (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 1mM de piruvato de sódio e 100 mM de aminoácidos não essenciais (Gibco-BRL, Life technologies, NY, USA)} para a contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico, objetiva de 40 x.

3.4.3 - Incubação das leveduras de *P. brasiliensis* com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE**

Outra parte do volume contendo leveduras marcadas com FITC, como descrito no item 3.4.1, foi incubada, em volumes separados, com 100 ou 50 µg/mL de fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE** em meio RPMI-1640 por 30 minutos a 37 °C sob agitação lenta. Posteriormente, as leveduras foram centrifugadas a 1125 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado, as leveduras centrifugadas a 1125 x g por 10 minutos com 5 mL de meio RPMI-1640, para retirada do excesso de fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE**, e ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI-SBF a 10 % para a contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico, objetiva de 40 x. Outra parte de volume contendo leveduras marcadas com FITC foi incubada, em volumes separados, com 100 ou 50 µg/mL de fragmentos F(ab) da IgG de camundongo normal para utilização como controle no ensaio de fagocitose.

3.5 - Ensaio de fagocitose

3.5.1 - Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

Camundongos BALB/c machos de seis a dez semanas, obtidos e mantidos no Laboratório de Experimentação Animal, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, foram inoculados intraperitonealmente, 72 horas antes da coleta das células, com 1 mL de meio tioglicolato de sódio a 3 % (Difco - Laboratories, Detroit, Mich., USA) por animal. Os macrófagos foram coletados pela inoculação de 4 mL de meio RPMI-1640 na cavidade abdominal, seguido da retirada de 3 mL do líquido peritoneal que foi submetido à centrifugação a 1000 x g a 4 °C durante 10 minutos e acrescido de tampão de lise (pH 7,2) {Cloreto de Amônia a 0,15 M (Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA), Carbonato de Potássio a 1 mM (Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA) e EDTA a 0,1 mM}, 1 mL por animal, por 4 minutos em banho de gelo. Posteriormente, o exudato foi centrifugado a 1000 x g a 4 °C por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e procedido nova centrifugação das células com meio RPMI-1640 (4 mL por animal) a 1000 x g a 4 °C por 5 minutos. As células foram ressuspensas em meio RPMI-SBF a 10 % (1 mL por animal) e sua viabilidade determinada pela contagem em câmara de Neubauer após serem misturadas em igual volume a Azul de Tripán (Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA), foi utilizado para este fim microscópio óptico, objetiva de 40 x. As células (10^5 células por poço) foram cultivadas em um volume de 200 μ L de meio RPMI-SBF a 10 % em placas 48 poços (Corning, Corning Incorporated, NY, USA) contendo lamínulas de vidro (10 mm) por 120 minutos em estufa umidificada a 37 °C contendo CO₂ a 5 % (Fisher Scientific International Inc, USA). Após esse período, o sobrenadante foi aspirado para a remoção das células não aderentes. A cultura foi

incubada, por 24 horas, com 400 μL de meio RPMI-SBF a 10 % em estufa umidificada a 37 °C contendo CO_2 a 5 %.

3.5.2 - Ensaio de fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c pré-tratados com **JBE** na presença de leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com diferentes monossacarídeos

Após 24 horas de incubação das células, conforme descrito no item 3.5.1, o sobrenadante da cultura de macrófagos foi aspirado. Para proceder ao ensaio de fagocitose por macrófagos peritoneais murinos na presença de **JBE**, em uma das placas contendo os macrófagos foi acrescentada uma solução de 200 μL de meio RPMI-SBF a 10 % contendo **JBE** nas concentrações de 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$, por poço. Esta placa foi incubada por 30 minutos em estufa umidificada a 37 °C contendo CO_2 a 5 %. Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado, 300 μL de meio RPMI-1640 foi adicionado aos poços e novamente aspirado para retirada do **JBE** não ligado. Após a incubação dos macrófagos com diferentes concentrações de **JBE**, em cada poço da placa foi adicionada uma solução de 200 μL de meio RPMI-SBF a 10 % contendo leveduras previamente marcadas FITC (item 3.4.1) (6 leveduras para cada macrófago) e pré-tratadas com diferentes monossacarídeos (item 3.4.2). Essa placa contendo macrófagos pré-tratados com **JBE** e leveduras pré-tratadas com diferentes concentrações de monossacarídeos foi mantida por 24 horas em estufa umidificada a 37 °C contendo CO_2 a 5 %. O controle do ensaio de fagocitose foi procedido pela incubação de macrófagos não tratados com **JBE** e leveduras não tratadas com monossacarídeos. Após as 24 horas de incubação, o sobrenadante dos poços foi coletado para dosagem de NO, como descrito no item 3.5.6.

3.5.3 - Ensaio de fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c pré-tratados com monossacarídeos na presença de leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE.

Após 24 horas de incubação das células, conforme descrito no item 3.5.1, o sobrenadante da cultura de macrófagos foi aspirado. Para proceder ao ensaio de fagocitose de leveduras pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE, uma placa contendo os macrófagos peritoneais murinos foi incubada com meio RPMI-SBF a 10 % contendo 50 mM de N-acetil-D-glicosamina, ou D-Glicose, ou D-Galactose, ou D-Manose, por 30 minutos em estufa umidificada a 37 °C contendo CO₂ a 5 %. Após esse período, o sobrenadante foi aspirado, 300 µL de meio RPMI-1640 foi adicionado aos poços e novamente aspirado para retirada dos monossacarídeos não ligados. Uma solução de 200 µL de meio RPMI-SBF a 10 % contendo leveduras previamente marcadas com FITC (item 3.4.1) (6 leveduras para cada macrófago) e pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE, ou com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo normal (item 3.4.3), foi acrescentada aos poços. Essa placa contendo macrófagos pré-tratados com monossacarídeos e leveduras pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE, ou fragmentos F(ab) da IgG de camundongo normal, em diferentes concentrações foi mantida por 24 horas em estufa umidificada a 37 °C contendo CO₂ a 5 %. Alguns poços, nos quais os macrófagos não foram tratados com monossacarídeos foram incubados com leveduras pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE, ou fragmentos F(ab) da IgG de camundongo normal, ou com leveduras não tratadas para proceder ao controle do ensaio de fagocitose.

3.5.4 - Ensaio de fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c pré-tratados com **JBE** na presença de leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com fragmentos F(ab) de IgG de camundongo anti-**JBE**

Após 24 horas de incubação das células, conforme descrito no item 3.5.1, o sobrenadante da cultura de macrófagos foi aspirado. Para proceder ao ensaio de fagocitose por macrófagos peritoneais murinos na presença de **JBE** frente a leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE**, uma placa contendo os macrófagos foi incubada com meio RPMI-SBF a 10 % contendo 50¹ µg/mL de **JBE** por 30 minutos em estufa umidificada a 37 °C contendo CO₂ a 5 %. Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado, 300 µL de meio RPMI-1640 foi adicionado aos poços e novamente aspirado para retirada do **JBE** não ligado. Após a incubação dos macrófagos com **JBE**, em cada poço da placa foi adicionado uma solução de 200 µL de meio RPMI-SBF a 10 % contendo leveduras previamente marcadas com FITC (item 3.4.1) (6 leveduras para cada macrófago) e pré-tratadas com 50 µg/mL de fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE** ou com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo normal. Essa cultura foi mantida por 24 horas em estufa umidificada a 37 °C contendo CO₂ a 5 %. O controle do ensaio de fagocitose foi procedido pela incubação de macrófagos não tratados com **JBE** com leveduras não tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE**.

3.5.5 - Preparo das lâminas para determinação do Índice fagocítico (IF)

Após cada ensaio de fagocitose, o sobrenadante dos poços foi aspirado e neles acrescentado 500 µL de tampão carbonato 0,1 M (pH 9), que foi novamente aspirado, para retirada das leveduras livres. Em seguida, as células, contidas nas lamínulas dentro dos poços

da placa, foram fixadas com 200 μ L de metanol PA a 4 °C (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios, Diadema, SP, Brasil) por 10 minutos, lavadas duas vezes com tampão carbonato 0,1 M (pH 9) e tratadas com 200 μ L de uma solução de 0,2 % de Triton X-100 (Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA) e 0,5 % de Glicina preparado em PBS 0,01 M (pH 7,2) por 30 minutos a 37 °C para proceder a permeabilização. Após outras duas lavagens com tampão carbonato 0,1 M (pH 9), as células foram coradas com Azul de Evans (Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA) a 1 % preparado em PBS 0,01 M (pH 7,2), por 30 minutos, novamente lavadas por duas vezes com tampão carbonato 0,1 M (pH 9), as lamínulas montadas em lâminas para microscópio, com glicerol tamponado (pH 8,5) (9 partes de glicerol e 1 parte de tampão carbonato 0,5 M pH 9,5), e seladas com esmalte.

Um total de 200 macrófagos foram contados para determinar o índice fagocítico (IF), calculado pela porcentagem de células fagocitadas multiplicada pela média do número de partículas internalizadas. O ensaio de fagocitose foi realizado em triplicata. As contagens foram feitas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX50F-3, Olympus Optical Co, LTD, Japan).

3.5.6 - Dosagem indireta de Óxido Nítrico (NO) utilizando o método de Griess

O sobrenadante dos poços provenientes do item 3.5.2, no qual os macrófagos foram pré-tratados com **JBE** e incubados com leveduras pré-tratadas com monossacarídeos, foi utilizado para dosagem indireta de NO, pela mensuração de Nitrito (NO_2^-), utilizando o método de Griess (GRENN et al., 1982). A um volume de 50 μ L de cada amostra, assim como na curva padrão e branco, foram adicionados 50 μ L do reagente de Griess, em duplicata, em placa de 96 poços (Corning, Corning Incorporated, NY, USA) de fundo redondo. O reagente de Griess foi preparado misturando-se volumes iguais de uma solução de

sulfanilamida (Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA) a 1 % preparado em ácido fosfórico (H_3PO_4) (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil) a 2,5 % e uma solução de dihidrocloridrato de naftiletenodiamina (NEED, Sigma, Chemical Co, St.Louis, USA) a 0,1 % preparado em H_3PO_4 a 2,5 %. A curva padrão foi obtida a partir de uma solução de 200 μM de nitrito de sódio (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil) até 0,1903 μM , por diluição seriada na base dois e o branco da reação constituiu de meio RPMI-SBF a 10 %. A leitura da reação foi procedida a 570 nm em fotocolorímetro. A concentração de NO_2^- contida em cada amostra, foi determinada de acordo com uma reta de regressão linear, obtida a partir da curva padrão, em programa de computador (Microplate Manager, 4.0, Hercules, C.A.) e os resultados foram expressos como concentração de NO.

3.6 - Ensaio enzimático de imunoabsorbância (ELISA) indireto de competição por N-acetil-D-glicosamina e D-Galactose

Esse ensaio foi realizado conforme descrito no item 3.3.2, porém, o primeiro anticorpo utilizado na reação, IgG de camundongo anti-JBE na diluição de 1:200, foi previamente incubado por 90 minutos com 25 mM de N-acetil-D-glicosamina ou 25 mM de D-Galactose em uma solução de PBS-T acrescido de gelatina a 1 %.

3.7 - Análise estatística

A análise estatística utilizada para o ensaio de fagocitose foi procedida pela análise das variâncias com delineamento inteiramente ao acaso no esquema fatorial seguido pelo teste Tukey, com nível de significância a $P < 0,05$. Utilizou-se para tal fim o programa STATISTIC (ws Inc. Edmonton, Canada). Todos os valores foram expressos como média \pm desvio padrão.

4 - RESULTADOS

4.1 - Análise eletroforética da obtenção do sobrenadante de cultura líquida de leveduras do isolado BAT de *Paracoccidioides brasiliensis*

Para obtenção do exoantígeno de leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis* foi utilizado o sobrenadante de meio líquido de cultura meio F-10 acrescido de 0,5 % de D-Glicose com crescimento interrompido pela adição de timerosal a 0,02 %, nos tempos de cultivo especificados na legenda da Figura 1. A análise eletroforética do sobrenadante de cultura líquida do isolado BAT de *P. brasiliensis*, após a centrifugação e ultradiafiltração, proporcionou a obtenção de bandas mais evidentes ao 16º dia de cultivo (Fig 1, pista 4). Tal procedimento permitiu identificar esse “tempo ótimo” para paralisação das culturas de *P. brasiliensis* em meio líquido e proceder à cromatográfica de afinidade em coluna de Sepharose®-Jacalina para obtenção de **JBE** (“**J**acalin **B**inding **E**xoantigen” - Exoantígeno Ligante de Jacalina).

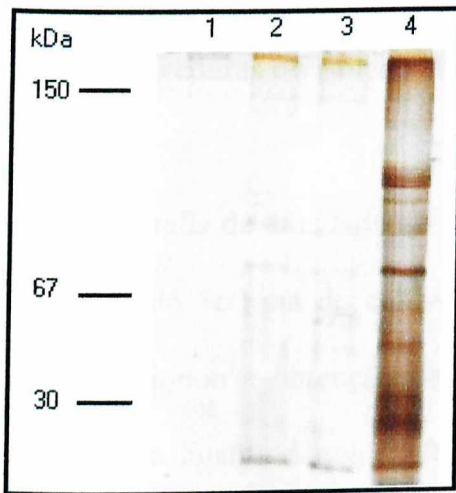


Figura 1. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 8 % do sobrenadante de cultura líquida de leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis*. Cultivo de leveduras em meio F-10 acrescido de 0,5 % de D-Glicose, material centrifugado e ultradiafiltrado. As pistas 1, 2, 3, e 4 correspondem ao 4º, 8º, 12º e 16º dia de cultivo, respectivamente. Amostra aplicada: 5 µg por pista. Material corado pela Prata. Os marcadores de peso molecular estão indicados no lado esquerdo do painel: 30 kDa (anidrase carbônica), 67 kDa (soroalbumina bovina) e 150 kDa (IgG de coelho).

4.2 - Cromatografia de afinidade, em coluna de Sepharose®-Jacalina, do sobrenadante de cultura líquida de leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis*

A cromatografia de afinidade do sobrenadante de cultura de leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis* do 16º dia de cultivo, em meio de cultura F-10 acrescido de 0,5 % de D-Glicose, proporcionou a obtenção de um gráfico através das leituras da densidade óptica (DO). A fração não ligante à coluna foi lavada com PBS 0,01 M (pH 7,2) e denominada eluato PBS. Essa fração apresentou um pico chegando à leitura de DO de aproximadamente 2,5 e valores decrescentes até próximo de zero (Fig 2, painel A). A fração retida na coluna foi eluída com PBS 0,01 M (pH 7,2) acrescido de D-Galactose 0,4 M e denominado eluato D-Gal. Essa fração, observada no gráfico a partir do 10º tubo, corresponde à preparação denominada **JBE**. A curva referente ao eluato D-Gal apresentou um pico de leitura de DO mais elevado, próximo a 0,02, e posterior variações de DO dentro de valores positivos, porém, menores que 0,02 (Fig 2, painel B). O valor de DO correspondente ao pico mais elevado do eluato D-Gal evidencia um baixo rendimento muitas vezes inferior a 1 µg de **JBE** por preparação de exoantígeno do sobrenadante de cultura cromatografado.

O material de aproximadamente seis cromatografias, após concentração e diálise, proporcionou a obtenção de **JBE** com DO de 0,6. Este material analisado em SDS-PAGE e tendo as bandas reveladas pela coloração com Nitrato de Prata otimizado evidenciou a obtenção de uma banda de 190 kDa e, sob condições redutoras, na presença de 2-mercaptoetanol, uma banda de 70 kDa (Fig 2, painel C).

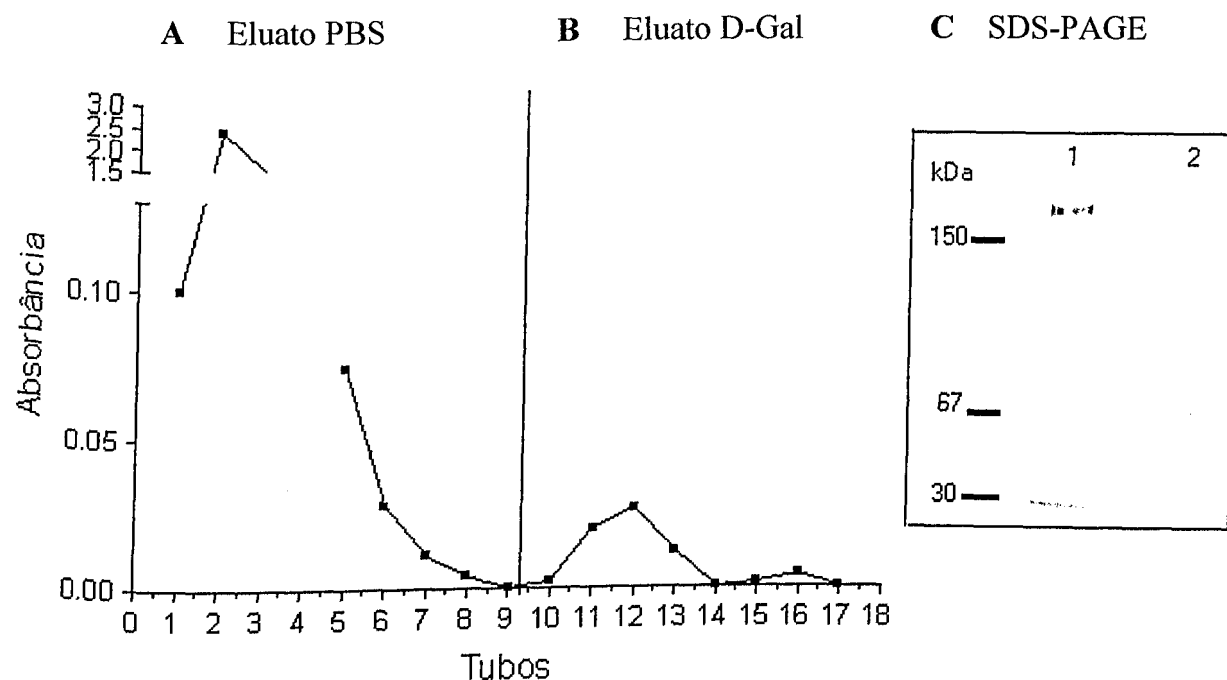


Figura 2. Gráfico da cromatografia em coluna de afinidade Sepharose®-Jacalina (5 mL) do sobrenadante da cultura líquida de leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis*. A) Eluato PBS, fração do sobrenadante de cultura de leveduras não ligante à coluna. B) Eluato D-Gal (obtenção de JBE), fração ligante à coluna e eluída com PBS 0,01 M (pH 7,2) acrescido de D-Galactose 0,4 M. Amostra aplicada na coluna: 5 mg de proteína em 3 mL de PBS 0,01 M (pH 7,2). Leitura de DO a 280 nm. C) Análise eletroforética em SDS-PAGE 8 % de JBE: as pistas 1 e 2 correspondem, respectivamente, a 3 µg JBE e 3 µg JBE sob condições redutoras (2-ME). Material corado pela Prata. Os marcadores de peso molecular estão indicados no lado esquerdo do painel: 30 kDa (anidrase carbônica), 67 kDa (soroalbumina bovina) e 150 kDa (IgG de coelho).

4.3 - Imunolocalização de **JBE** em leveduras de *P. brasiliensis*

Entre os tempos de cultivo de leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis* em meio líquido F-10 acrescido de 0,5 % de D-Glicose (4°, 8°, 12° e 16° dias), através de ensaio imunohistoquímico e Microscopia Eletrônica, utilizando-se IgG de coelho anti-gp190 e IgG de cabra anti-IgG de coelho ligada com ouro coloidal (10 nm), foi observado a marcação da gp190, componente de **JBE**, nas leveduras ao 16° dia de cultivo. Tal marcação foi evidenciada predominantemente na superfície das leveduras de *P. brasiliensis* (Fig 3, painel D). Nesse mesmo ensaio, com a utilização de soro de coelho anti-gp190 a mesma marcação foi obtida, porém, com intensidade maior.

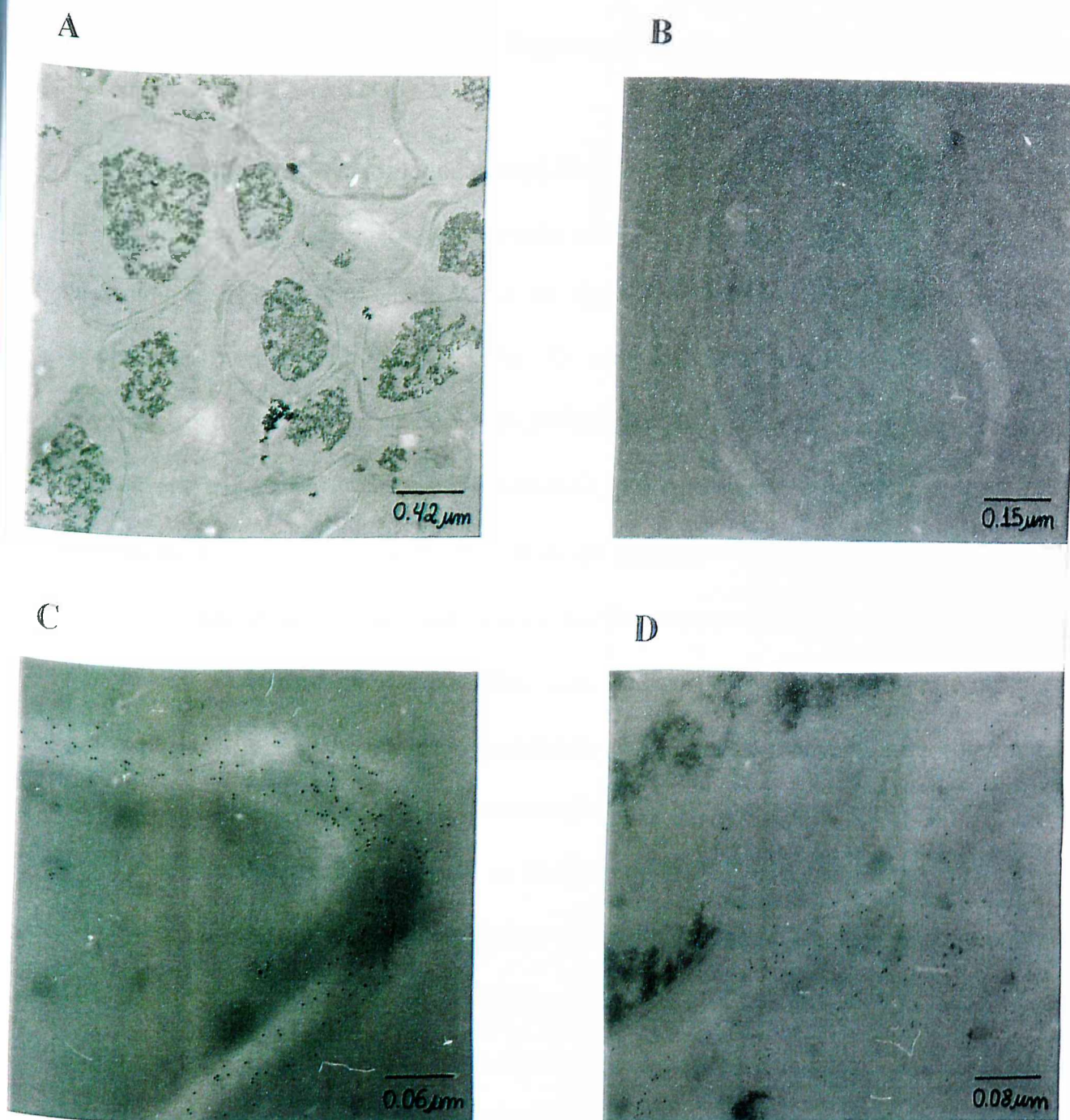


Figura 3. Imunolocalização de JBE por Microscopia Eletrônica na superfície de leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis* ao 16º dia de cultivo em meio líquido F-10 acrescido de 0,5 % de D-Glicose. **A)** Leveduras em menor aumento. **B)** Leveduras incubadas com soro de coelho normal (controle negativo). **C)** Leveduras incubadas com soro total de coelho anti-gp190. **D)** Leveduras incubadas com IgG de coelho anti-gp190.

4.4 - Produção de anticorpo policlonal anti-JBE em camundongo BALB/c, purificação da IgG de camundongo anti-JBE e obtenção de fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE

A imunização de camundongos BALB/c com JBE proporcionou a obtenção do soro anti-JBE e sua reatividade foi comprovada pelo teste ELISA indireto. O soro anti-JBE apresentou reatividade 2,5 vezes maior, na titulação de 1:1600, comparado ao soro de camundongo normal (Fig 4, painel A). O soro anti-JBE foi submetido a diferentes concentrações de Sulfato de Amônia para precipitação das imunoglobulinas e essa fração foi incubada em coluna de Sepharose®-Proteína-G, proporcionando a purificação da IgG de camundongo anti-JBE. A lavagem da coluna de Sepharose®-Proteína-G para retirada das proteínas e imunoglobulinas não ligantes foi procedida com tampão fosfato a 0,1 M (pH 8) e a eluição da IgG de camundongo anti-JBE, com Glicina a 0,1 M (pH 2,8). Foi obtida uma preparação de 5 mg/mL da IgG de camundongo anti-JBE cuja reatividade foi comprovada pelo teste ELISA indireto. A IgG de camundongo anti-JBE apresentou reatividade 2,5 vezes maior que a IgG de camundongo normal, na titulação de 1:200 (Fig 4, painel B).

Após a digestão de 5 mg/mL da IgG de camundongo anti-JBE pela papaína, foi obtido uma preparação de 150 µg/mL de fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE. A Figura 5 mostra a digestão procedida nas IgGs. A necessidade de fragmentação pela papaína das IgGs e o uso dos fragmentos univalentes F(ab) nos ensaios de fagocitose por macrófagos teve como objetivo eliminar qualquer influência dos fragmentos Fc de IgG, considerando-se que os macrófagos possuem receptores para a porção Fc das imunoglobulinas.

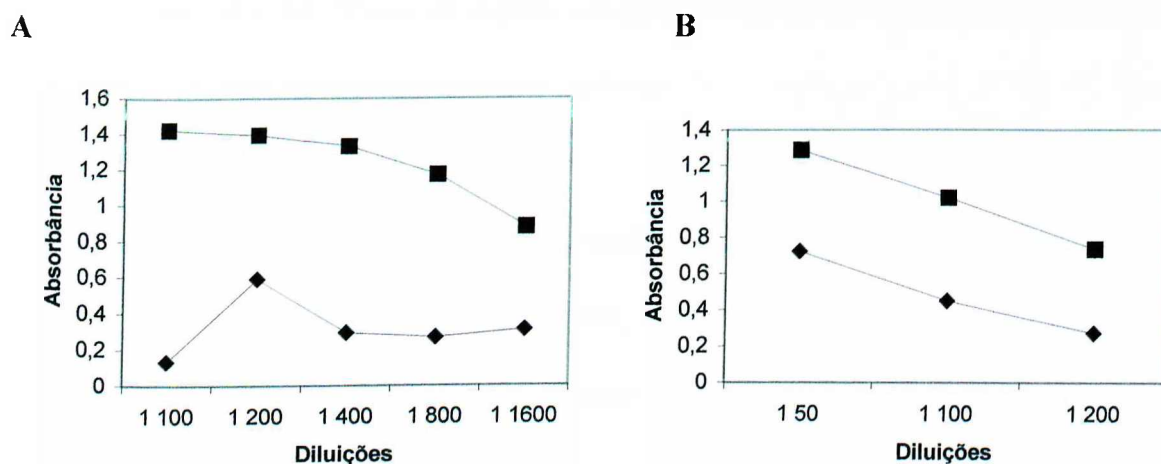


Figura 4. Teste ELISA indireto para avaliação do soro e das IgGs de camundongo BALB/c imunizado com JBE. Placa sensibilizada com 2 μ g de JBE; anticorpo primário: soro ou IgG de camundongo anti-JBE; anticorpo secundário: IgG de cabra anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase (1:1000); material revelado com OPD; leitura a 492 nm. **A)** (■) soro de camundongo anti-JBE; (◆) soro de camundongo normal. **B)** (■) IgG de camundongo anti-JBE; (◆) IgG de camundongo normal.

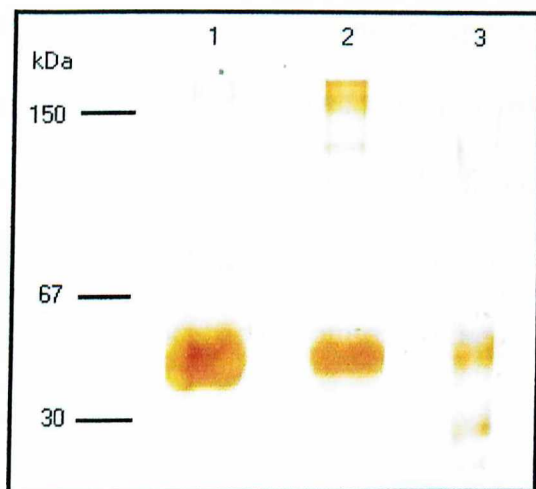


Figura 5. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 8 % da digestão da IgG de camundongo anti-JBE pela papaína para obtenção dos fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE. Pista 1) fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE, fração não ligante à coluna de Sepharose®-Proteína-G. Pista 2) fragmentos Fc e IgG de camundongo anti-JBE, fração retida na coluna de Sepharose®-Proteína-G. Pista 3) fragmentos totais da digestão pela papaína da IgG de camundongo anti-JBE. Amostra aplicada: 10 μ g. Material corado pela Prata. Os marcadores de peso molecular estão indicados no lado esquerdo do painel: 30 kDa (anidrase carbônica), 67 kDa (soroalbumina bovina) e 150 kDa (IgG de coelho).

4.5 - Efeito de **JBE** no ensaio de fagocitose (índice fagocítico - IF) e na produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos peritoneais murinos

O efeito de **JBE** em macrófagos peritoneais murinos no ensaio de fagocitose de leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis*, previamente marcadas com FITC, promoveu uma inibição significativa ($P < 0.001$) na fagocitose, aproximadamente 40 %, comparado ao controle (macrófagos não tratados incubados com leveduras não tratadas) (Fig 6, painel A). Porém, não foi observado efeito dose-dependente. Um nível de inibição semelhante ao promovido por **JBE** foi encontrado quando as leveduras de *P. brasiliensis* foram pré-tratadas com monossacarídeos e incubadas com macrófagos não tratados ($0 \mu\text{g JBE/mL}$).

No grupo em que as leveduras de *P. brasiliensis* foram pré-tratadas com N-acetil-D-glicosamina foi obtida uma inibição significativa da fagocitose ($P < 0.001$), aproximadamente 64 %, frente os macrófagos pré-tratados com **JBE**, comparando ao controle (macrófagos não tratados incubados com leveduras não tratadas). Porém, não foi observado efeito dose-dependente. A inibição da fagocitose nesse grupo também foi significativa ($P < 0.001$) comparado aos outros grupos cujas leveduras foram pré-tratadas com diferentes monossacarídeos e incubadas com macrófagos pré-tratados com diferentes concentrações de **JBE**.

As leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com D-Glicose promoveram inibição da fagocitose ($P < 0.001$) pelos macrófagos não tratados ($0 \mu\text{g JBE/mL}$), comparado ao controle (macrófagos não tratados incubados com leveduras não tratadas). Porém, dentro deste grupo de leveduras pré-tratadas com D-Glicose não ocorreu diferença no índice fagocítico quando foram incubadas com macrófagos não tratados ($0 \mu\text{g JBE/mL}$) ou com macrófagos tratados (50 e $100 \mu\text{g JBE/mL}$), ou seja, ambos componentes (**JBE** no macrófagos e D-Glicose nas leveduras) não influenciaram, juntos, na variação do índice fagocítico.

Quando as leveduras de *P. brasiliensis* foram pré-tratadas com D-Galactose ou D-Manose, a inibição da fagocitose em macrófagos tratados com **JBE** foi significativa ($P < 0.001$), comparado ao controle (macrófagos não tratados incubados com leveduras não tratadas). Nestes grupos, houve também diferença significativa ($P < 0.001$) entre as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g JBE/mL}$, porém, na concentração 50 $\mu\text{g JBE/mL}$ foi observado maior inibição do índice fagocítico.

Neste estudo foi avaliada a capacidade de **JBE** induzir macrófagos peritoneais murinos a liberarem NO (Fig 6, painel B). Apesar de se observar a liberação de NO, não houve diferença significativa dessa liberação, comparado ao controle (macrófagos não tratados incubados com leveduras não tratadas). Um aumento significativo ($P < 0.01$) na liberação de NO foi observado no grupo de macrófagos pré-tratados com **JBE**, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, incubados com leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com D-Galactose. Por outro lado, macrófagos pré-tratados com **JBE** e incubados com leveduras pré-tratadas com N-acetil-D-glicosamina, apresentaram queda na liberação de NO, apesar de não ter sido de maneira estatisticamente significativa.

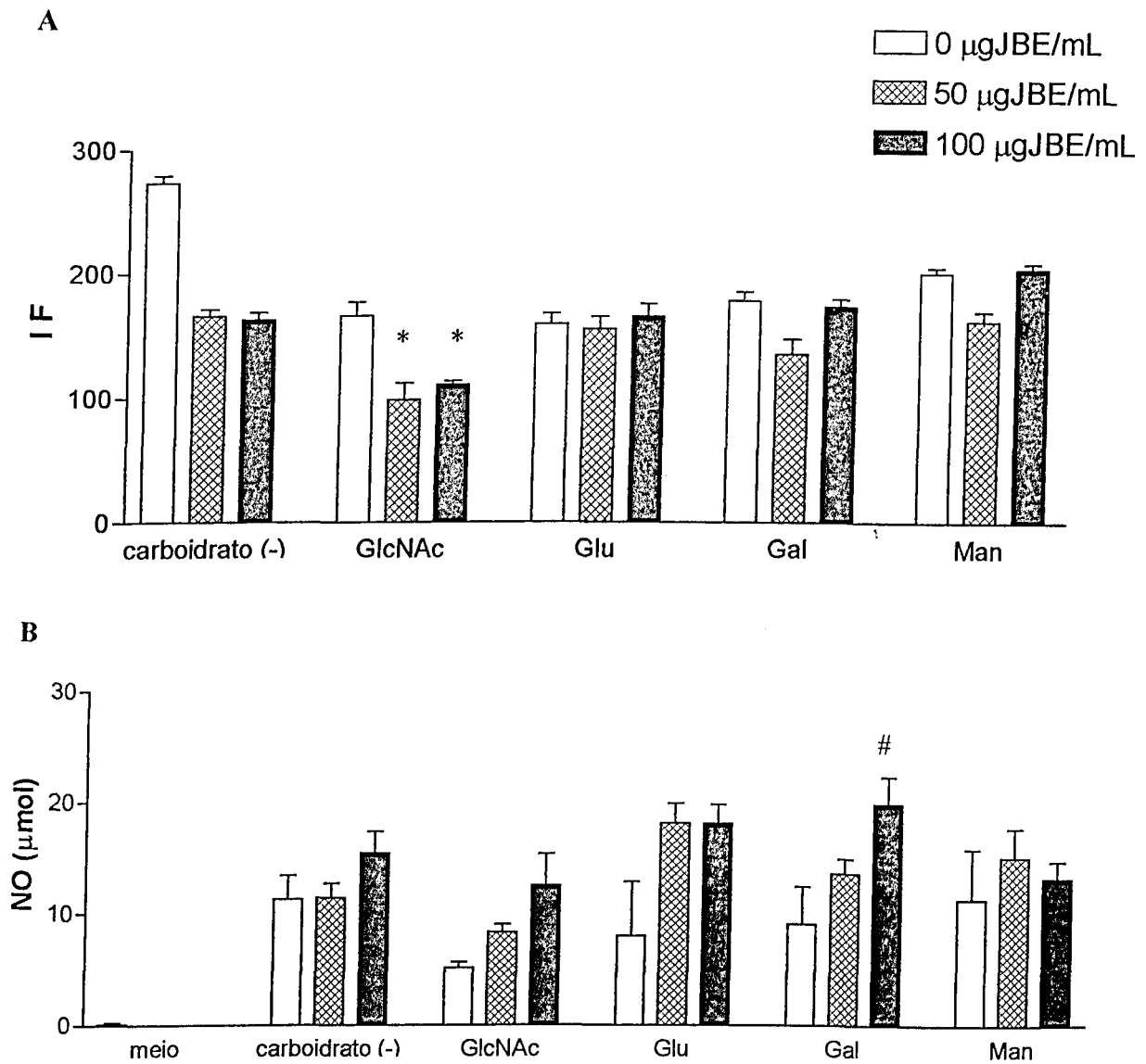


Figura 6. Efeito na fagocitose (índice fagocítico - IF) (A) e produção de Óxido Nítrico (NO) (B) de macrófagos peritoneais murinos pré-tratados com JBE e incubados com leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com monossacarídeos (50 mM). Carboidrato (-), ausência de carboidrato; GlcNAc, N-acetil-D-glicosamina; Glu, D-Glicose; Gal, D-Galactose; Man, D-Manose. Cada barra representa a média \pm desvio padrão. * ($P < 0.001$); # ($P < 0.01$).

4.6 - Inibição da fagocitose por fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE

Os dados da Tabela 1 mostram que o índice fagocítico (IF) para macrófagos pré-tratados com monossacarídeos frente a leveduras de *P. brasiliensis*, previamente marcada com FITC, não tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE foi significativamente menor ($P < 0.01$) comparado ao controle (macrófagos não tratados incubados com leveduras não tratadas). Quando as leveduras de *P. brasiliensis* foram incubadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE ($100 \mu\text{g/mL}$) e colocadas na presença de macrófagos não tratados com monossacarídeos, também houve inibição da fagocitose ($P < 0.01$), comparado ao controle (macrófagos não tratados incubados com leveduras não tratadas).

A incubação de leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ e macrófagos pré-tratados com monossacarídeos promoveu inibição da fagocitose ($P < 0.01$) comparado ao controle (macrófagos não tratados incubados com leveduras não tratadas).

A inibição da fagocitose na presença de fragmentos F(ab) da IgG de camundongo normal não diferiu do controle (macrófagos não tratados incubados com leveduras não tratadas) ou do grupo cujos macrófagos pré-tratados com monossacarídeos foram incubados com leveduras de *P. brasiliensis* não tratadas, sugerindo uma atividade específica dos fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE.

Os fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-JBE na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ foram capazes de promover uma inibição significativa da fagocitose ($P < 0.01$), comparado ao controle (macrófagos não tratados incubados com leveduras não tratadas), apesar de não ter

tido significativo quando comparado às concentrações de 0 e 100 µg **JBE**/mL, estando situado entre os valores destas concentrações (dados não mostrados).

Tabela 1. Efeito da fagocitose (índice fagocítico – IF) de macrófagos peritoneais murinos pré-tratados com monossacarídeos (50 mM) e posterior adição de leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE** ou fragmentos F(ab) de IgG de camundongo normal.

Pré-tratamento de macrófagos com monossacarídeos	Ausência de F(ab) nas leveduras	F(ab) de IgG de camundongo anti- JBE nas leveduras	F(ab) de IgG de camundongo normal nas leveduras
		100 µg/mL	100 µg/mL
Ausência de carboidrato	273.88 ± 5.84 <i>a</i>	197.96 ± 12.49 <i>cd</i>	262.88 ± 7.15 <i>a</i>
N-acetil-D-glicosamina	219.75 ± 4.71 <i>bc</i>	179.21 ± 4.88 <i>de</i>	250.33 ± 8.72 <i>ab</i>
D-Glicose	203.26 ± 1.99 <i>cd</i>	173.71 ± 4.54 <i>de</i>	225.41 ± 5.14 <i>bc</i>
D-Galactose	223.38 ± 5.72 <i>bc</i>	126.86 ± 13.87 <i>e</i>	196.30 ± 6.63 <i>cd</i>
D-Manose	180.88 ± 17.45 <i>d</i>	147.33 ± 14.49 <i>e</i>	219.65 ± 6.32 <i>cd</i>

Resultados expressos como média ± desvio padrão.

Diferentes letras (*a, b, c, d, e*) significam diferença estatística ($P < 0.01$).

4.7 - Efeito da fagocitose (índice fagocítico - IF) de macrófagos pré-tratados com **JBE** incubados com leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE**

Quando os macrófagos peritoneais murinos foram pré-tratados com **JBE** (50 µg/mL) e incubados com leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE** (50 µg/mL) ocorreu uma significativa inibição ($P < 0.001$) da fagocitose, aproximadamente 61,5 %, comparado ao controle (macrófagos não tratados incubados com leveduras não tratadas) e uma inibição da fagocitose também significativa ($P < 0.001$) comparado ao grupo cujos macrófagos foram tratados com **JBE** e incubados com leveduras não tratadas com fragmentos F(ab) ou tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo normal (Fig 7).

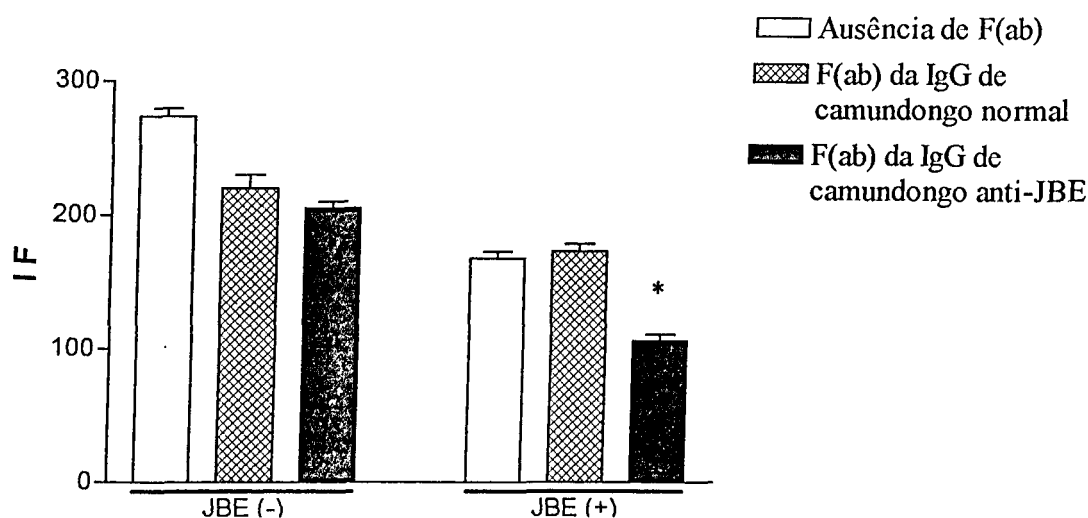


Figura 7. Efeito da fagocitose (índice fagocítico - IF) de macrófagos peritoneais murinos pré-tratados com **JBE** (50 µg/mL) incubados com leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE** (50 µg/mL). **JBE** (-), ausência de **JBE**; **JBE** (+), presença de **JBE** nos macrófagos. Cada barra representa a média ± desvio padrão. * ($P < 0.001$).

4.8 - Efeito da incubação da IgG de camundongo anti-**JBE** com N-acetil-D-glicosamina e D-Galactose

Tendo em vista os resultados obtidos mostrados na Tabela 1 e na Figura 7, foi realizado uma análise por teste ELISA indireto de competição para verificar a reatividade da IgG de camundongo anti-**JBE** frente a **JBE**. Para tal fim foi procedido a incubação prévia da IgG de camundongo anti-**JBE** com 25 mM de N-acetil-D-glicosamina ou 25 mM de D-Galactose. Tal análise evidenciou uma queda na leitura da absorbância para a IgG de camundongo anti-**JBE** incubada com os monossacarídeos, comparado ao controle (IgG de camundongo anti-**JBE** sem tratamento) (Fig. 8), mostrando haver uma possível interação da IgG de camundongo anti-**JBE** com D-Galactose e uma possível competição entre a IgG de camundongo anti-**JBE** e o monossacarídeo N-acetil-D-glicosamina pelo sítio ligante de N-acetil-D-glicosamina em componente de **JBE**.

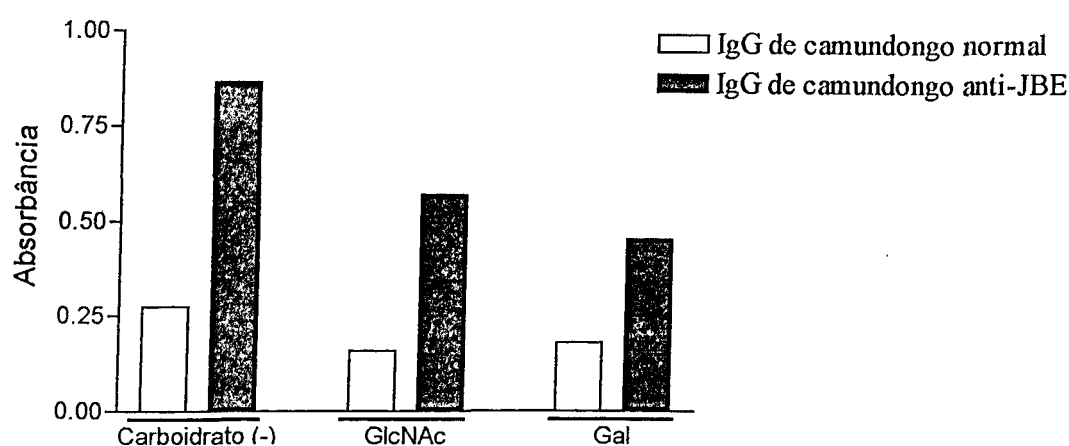


Figura 8. Teste ELISA indireto para avaliação da incubação de IgG de camundongo anti-**JBE** com N-acetil-D-glicosamina e D-Galactose. Placa sensibilizada com 2 µg de **JBE**; anticorpo primário: IgG de camundongo anti-**JBE** (1:200) previamente incubada com 25 mM de N-acetil-D-glicosamina ou 25 mM de D-Galactose; anticorpo secundário: IgG de cabra anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase (1:1000); material revelado com OPD; leitura a 492 nm. Carboidrato (-), ausência de carboidrato; GlcNAc, N-acetil-D-glicosamina; Gal, D-Galactose.

5 - DISCUSSÃO

Purificação e localização de JBE (“Jacalin Binding Exoantigen” - Exoantígeno Ligante de Jacalina) em leveduras do isolado BAT de *Paracoccidioides brasiliensis*

JBE foi descrito, inicialmente, pelo laboratório da Prof. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira (FMRP – USP) como uma fração ligante em coluna de Sepharose®Jacalina, proveniente de cultura de leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis* em meio Negroni modificado com 21 dias de cultivo. Essa preparação de **JBE** apresenta um componente de alto peso molecular de 190 kDa, fortemente corado pelo ácido periódico de Schiff e fracamente corado por nitrato de prata, indicando sua glicosilação pela possível presença de resíduos de D-Galactose, uma vez que a obtenção desse componente foi através da interação com jacalina, lectina com afinidade a resíduos do dissacarídeo β -D-Gal (1-3)D-GalNAc (ROQUE-BARREIRA, CAMPOS-NETO, 1985; SASTRY et al., 1986). A preparação **JBE** apresenta também uma glicoproteína de 70 kDa, sob condições redutoras, fortemente corada por nitrato de prata e fracamente corada pelo ácido periódico de Schiff, sua posterior caracterização evidenciou uma atividade lectínica por sua afinidade à N-acetil-D-glicosamina. A evidencia da marcação de **JBE** em leveduras de *P. brasiliensis*, analisada por microscopia confocal, mostrou a marcação da gp190 na superfície do fungo de forma difusa e a marcação da gp70 foi evidenciada nas regiões de brotamento (GENNARI-CARDOSO, 2000).

No presente estudo, a fração **JBE** também foi isolada por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose®Jacalina utilizando sobrenadante do 16º dia de cultivo das leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis* em meio F-10 acrescido de 0,5 % de D-Glicose, “tempo ótimo” para a obtenção de maior quantidade do exoantígeno. A escolha pelo isolado BAT foi

devido ao seu elevado número de proteínas antigênicas, como caracterizado por Panunto-Castelo et al. (2003), variando de 22 a 172 kDa, cujos componentes de 43, 70 e 160 kDa são reconhecidos no soro de pacientes com PCM.

Nosso resultado para obtenção dessa preparação também apresentou, por SDS-PAGE, um componente de alto peso molecular caracterizado por uma banda de 190 kDa e um componente de 70 kDa, evidenciado sob condições redutoras pela adição de 2-mercaptoetanol, dados semelhantes ao descrito anteriormente pelo Laboratório da Prof. Dra Maria Cristina Roque Antunes Barreira (FMRP - USP). De forma semelhante ao estudo de Gennari-Cardoso (2000), porém com outra metodologia, através de marcação indireta de IgG ligada ao ouro coloidal e análise por microscopia eletrônica, um componente de **JBE** foi marcado principalmente na superfície das leveduras, através de IgG de coelho anti-gp190.

Alguns trabalhos mostram a localização de componentes antigênicos de leveduras de *P. brasiliensis* como, por exemplo, no estudo de Mattos-Grosso et al. (2003), no qual uma gp70 ligante a Concanavalina-A (PUCCIA et al., 1986), glicoproteína fortemente corada por ácido periódico de Schiff, foi localizada, utilizando microscopia confocal, predominantemente em compartimentos intracelulares do fungo, embora essa glicoproteína também fosse expressa na superfície das leveduras.

O estudo da gp43, considerada o principal componente antigênico deste fungo por ser reconhecido no soro de 100 % dos pacientes com PCM (TRAVASSOS et al., 1995), observou a capacidade de ligação dessa glicoproteína a laminina, que é um componente de matriz extracelular de tecido de mamíferos, aumentando a habilidade de invadir e destruir tecidos (VICENTINI et al., 1994). Por microscopia eletrônica, a gp43 foi localizada na condição subcelular sugerindo que essa glicoproteína recém sintetizada é estocada no citoplasma, no interior de grandes vacúolos densos, e que os grânulos contendo a gp43 migram para a borda externa da parede celular, onde é secretada na forma de gotas densas, randomicamente, sem

formar camada contínua na superfície das células fúngicas, alcançando o espaço extracelular (STRAUS et al., 1996).

No presente estudo, em que a preparação de exoantígenos do isolado BAT de *P. brasiliensis* foi realizado em outras condições de cultivo havendo a obtenção de **JBE** com as mesmas características previamente descritas, bem como sua imunolocalização na parede das leveduras, foi avaliado, então, o efeito de **JBE** no fenômeno da fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos peritoneais murinos.

Efeito de **JBE** na interação entre macrófagos peritoneais murinos e leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis*

Alguns exemplos de componentes antigênicos de fungos envolvidos no processo de adesão e invasão de células do hospedeiro podem ser verificados para *Candida albicans*, cujos receptores do tubo germinativo específico para laminina medeiam interações à membrana basal do hospedeiro contribuindo para o estabelecimento da candidíase (BOUCHARA et al., 1990); para *Aspergillus fumigatus*, cujas conídios interagem com fibrinogênio e laminina no hospedeiro via ácido siálico (BOUCHARA et al., 1997); e para *Rhizopus oryzae*, cuja aderência de seus esporos é mediada por laminina e colágeno tipo IV no tecido hospedeiro (BOUCHARA et al., 1996).

Em nosso estudo, para avaliação do fenômeno da fagocitose frente a **JBE**, foi utilizado macrófagos peritoneais de camundongos, uma vez que a natureza da interação entre *P. brasiliensis* e macrófagos pode ser crítica para o estabelecimento da infecção. Trabalhos mostram que a fagocitose de *P. brasiliensis* por macrófagos *in vivo* (BRUMMER et al., 1989) e *in vitro*, os fungos são internalizados e se multiplicam em monócitos e macrófagos humanos

não ativados (BRUMMER et al., 1988). Ao contrário, macrófagos ativados têm atividade fungicida para *P. brasiliensis* *in vitro* e *in vivo* (BRUMMER et al., 1988; MOSCARDI-BACCHI et al., 1994). Estudos sugerem que o mecanismo pelo qual o fungo modula o comportamento microbicida dos macrófagos depende da ativação de receptores específicos de macrófagos durante o englobamento do parasita (GORDON et al., 1988).

Nosso estudo mostrou que **JBE**, quando presente nos macrófagos, foi capaz de promover a inibição da fagocitose (40 %) de leveduras de *P. brasiliensis*. Tendo os componentes de **JBE** a possível presença de carboidratos na sua composição, sugerida pela ligação a jacalina, e a possível interação de seus componentes com outros carboidratos, como verificado para a afinidade da gp70 de **JBE** por N-acetil-D-glicosamina (GENNARI-CARDOSO, 2000), foram realizados ensaios de incubação de leveduras de *P. brasiliensis* com diferentes monossacarídeos previamente ao ensaio de fagocitose. A concentração dos monossacarídeos utilizados em nosso estudo (50 mM) foi previamente escolhida entre 1, 10, 50 e 100 mM como a melhor molaridade capaz de promover a inibição da fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos peritoneais murinos.

Foi observado que a melhor inibição da fagocitose (64 %) ocorreu quando os macrófagos tratados com **JBE** foram incubados com leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com N-acetil-D-glicosamina. Sugerimos que essa acentuada inibição seja devido ao bloqueio da atividade lectínica da gp70 de **JBE** por sua afinidade a N-acetil-D-glicosamina, juntamente ao bloqueio dos sítios de interação nos macrófagos por **JBE**.

Frente aos resultados obtidos no presente estudo, sugerimos que os componentes de **JBE** possivelmente possuem carboidratos estruturais que se ligam a receptores de carboidratos na superfície de macrófagos e, assim, promovam o bloqueio da ligação de leveduras aos macrófagos e, conseqüentemente, a inibição da fagocitose. Foi observado por

Gennari-Cardoso (2000) que **JBE** interage com laminina e esta interação é inibida na presença de N-acetil-D-glicosamina.

Uma menor inibição da fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos peritoneais murinos foi promovida quando os macrófagos tratados com **JBE** foram incubados com leveduras pré-tratadas com os demais monossacarídeos (D-Glicose, D-Galactose e D-Manose). Esse fato pode inferir que tais monossacarídeos não sejam específicos para gp70, apesar de envolvidos neste evento.

Estudos mostram que carboidratos como D-Glicosamina, D-Galactosamina e α -D-Fucose são capazes de inibir a aderência de *Candida albicans* aos queratinócitos humanos (OLLERT et al., 1993), bem como os carboidratos Galactose, Lactose e N-acetil lactosamina inibem a aderência de *Candida glabrata* às células epiteliais humanas (CORMACK et al., 1999).

Considerando estudos com glicoproteínas anteriormente citadas, como a gp70 e gp43, a interação entre glicoproteínas de *P. brasiliensis* é evidenciada no envolvimento com macrófagos. No estudo de Mattos-Grosso et al. (2003) a gp70 com afinidade pela Concanavalina-A, possui a capacidade de inibir a fagocitose de partículas de zimosan de maneira dose-dependente, sugerindo que esse fenômeno é caracterizado pela composição de polissacarídeos dessa glicoproteína, que se ligam aos receptores de manose na superfície dos macrófagos e bloqueiam a ligação das partículas de zimosan e sua fagocitose. Além disso, a gp70 inibe a fagocitose de hemácias de carneiro opsonizadas, porém, não de maneira dose-dependente, mostrando que esta glicoproteína inibe a atividade fagocítica de macrófagos não apenas através do receptor de manose.

No caso da gp43, ocorre a regulação negativa da linfoproliferação e a função de macrófagos peritoneais, como a fagocitose, via receptores de manose, além de promover a inibição da liberação de radicais livres e a atividade microbicida de macrófagos (POPI et al.,

2002). Segundo Almeida et al. (1998), a inibição da fagocitose por carboidratos indica que receptores de macrófagos reconhecem melhor resíduos de carboidratos da gp43 que a seqüência de aminoácidos dessa glicoproteína. O soro específico anti-gp43 é capaz de promover a inibição da adesão de *P. brasiliensis* às células Vero *in vitro*, indicando que anticorpos circulantes podem bloquear muitas moléculas específicas de aderência neste fungo, sugerindo, que a gp43 é uma adesina, porém, não a única (HANNA et al., 2000). Dessa forma, outras moléculas do fungo estariam participando da interação entre o *P. brasiliensis* e o hospedeiro.

Sabendo que os macrófagos possuem receptores para carboidratos em sua superfície, como revisado por Linehan et al. (2000), na tentativa de reforçar a hipótese de inibição da fagocitose por **JBE**, macrófagos foram tratados com monossacarídeos e incubados com leveduras pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE**. Tal ensaio promoveu uma inibição significativa da fagocitose. Observamos assim, que a inibição da fagocitose ocorria não apenas pelo bloqueio dos sítios de ligação de carboidratos nos macrófagos, mas também pelo bloqueio de **JBE** promovido pelos fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE**, nas leveduras, reforçando a idéia que **JBE** é capaz de promover a fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos peritoneais murinos. A presença de receptores de carboidratos nos macrófagos podem explicar a inibição da fagocitose quando monossacarídeos ou até mesmo **JBE** (postulando que seus componentes também possuem carboidratos na sua composição) foram utilizados nesse estudo.

Segundo Taylor et al. 1990, a afinidade do receptor de manose para oligossacarídeos determinado pelos resíduos terminais é: L-Fucose > D-Mannose ≥ N-acetil-D-glicosamina >>>D-Galactose. Além do receptor de manose, outros receptores de carboidratos nos macrófagos, como revisado por Linehan et al. (2000), possivelmente envolvidos na inibição da fagocitose mostrada nesse estudo, poderiam ser o sítio lectínico CR3, por possuir afinidade

por N-acetil-D-glicosamina e manose, e também por β -glucanas; o receptor de galactose e/ou as Galectinas por possuírem afinidade por galactose.

No ensaio de inibição da fagocitose em que os macrófagos tratados com **JBE** foram incubados com leveduras pré-tratadas com fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE** foi observado inibição da fagocitose (61,5 %) semelhante ao obtido no experimento cujos macrófagos tratados com **JBE** foram incubados com leveduras pré-tratadas com N-acetil-D-glicosamina. Provavelmente tais experimentos mostram essa semelhança de inibição pela possível ocupação de sítios lectínicos, com afinidade por N-acetil-D-glicosamina, nas leveduras de *P. brasiliensis* pelos fragmentos F(ab) da IgG de camundongo anti-**JBE**. Foi possível observar pelo ensaio ELISA indireto de competição a diminuição da interação entre as IgGs de camundongo anti-**JBE** incubadas com N-acetil-D-glicosamina frente a **JBE**. Provavelmente, a competição esteja ocorrendo entre o monossacarídeo N-acetil-D-glicosamina e a IgG anti-**JBE** pelo sítio ligante de N-acetil-D-glicosamina da gp70 de **JBE**.

Postulamos também que a inibição da interação das IgGs de camundongo anti-**JBE**, incubadas com D-Galactose, e **JBE** no ensaio de ELISA indireto de competição, possa ser pela presença de epítomos conformacionais possivelmente glicosilados com resíduos de galactose provenientes de **JBE**, devido a interação com jacalina, e conseqüentemente levando a formação de anticorpos específicos contra a porção galactose.

Diante do fenômeno da fagocitose por macrófagos, a atividade microbicida de NO tem sido demonstrada em modelos murinos *in vivo*, onde a resistência a certos microrganismos como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major* é correlacionado com o nível de produção de NO (STENGER et al., 1994; VESPA et al., 1994). Contudo, NO também está envolvido na imunossupressão mediada por macrófagos. A produção deste radical livre foi demonstrada como crítica para macrófagos murinos na supressão da proliferação de células T estimuladas

por mitógenos ou antígenos (ALBINA et al., 1991; HOFFMAN et al., 1993) e é capaz de mediar a supressão imune de camundongos infectados, como exemplo, por *Aspergillus fumigatus*, pois a produção de NO pelos macrófagos contra esse fungo pode engatilhar a apoptose em culturas de esplenócitos (WU-HSIEH et al., 1998).

A liberação de NO ocorre em vários tipos de infecções incluindo a PCM e está envolvida no estabelecimento e manutenção da não-resposta de linfócitos em camundongos infectados por *P. brasiliensis* (BOCCA et al., 1998). Antígenos podem ser importantes na modulação da produção de NO, como exemplo, a gp43 e a gp70 inibem a liberação de NO por macrófagos (POPI et al., 2002; MATTOS-GROSSO et al. 2003), bem como a fração FIII isolada por cromatografia líquida de proteínas e reconhecida por soro de coelho anti-antígenos de *P. brasiliensis* é capaz de promover a diminuição da produção de NO (DINIZ et al., 2001).

Estudos de Pereira et al. (2004) revelam que níveis de NO detectados em células peritoneais murinas após dois dias de infecção dos camundongos com leveduras de *P. brasiliensis*, foram baixos, porém mensuráveis, mesmo havendo a presença de neutrófilos e macrófagos na cavidade peritoneal, sugerindo que a liberação de NO por antígenos de *P. brasiliensis* é baixa nas fases precoces da infecção. No estudo de Carmo et al. (2004) a morte de leveduras de *P. brasiliensis* de cepa virulenta por monócitos humanos ativados com TNF- α , ou com TNF- α juntamente com IFN- γ , mostrou que foi inibida na presença de catalase, porém o mesmo não ocorreu na presença de superóxido desmutase ou MG-monometil-L-arginina (inibidor de NO), sugerindo que H₂O₂ participa na atividade fungicida, enquanto o nível de NO parece não estar envolvido na morte de *P. brasiliensis* por monócitos humanos.

No presente estudo foi verificado a capacidade da indução da produção de NO por macrófagos frente ao tratamento com JBE. Quando macrófagos foram tratados com JBE e incubados com leveduras de *P. brasiliensis* pré-tratadas com N-acetil-D-glicosamina ocorreu

inibição na liberação de NO pelos macrófagos. Apesar de não ocorrido de maneira significativa, esse efeito biológico, em conjunto com a inibição da fagocitose observada nesse grupo, sugere uma inibição da atividade dos macrófagos. Apesar da utilização de um monossacarídeo, N-acetil-D-glicosamina, o estudo sugere um possível envolvimento do componente de 70 kDa de **JBE**, com caráter lectínico, nesse fenômeno.

6 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

JBE ("Jacalin Binding Exoantigen" - Exoantígeno Ligante de Jacalina) está presente no exoantígeno de cultura do isolado BAT de de *Paracoccidioides brasiliensis*, com 16 dias de cultivo em meio F-10 acrescido de 0,5 % de D-Glicose, e apresenta, por SDS-PAGE, banda de 190 kDa e, sob condições redutoras, uma banda mais proeminente de 70 kDa.

JBE está presente na superfície de leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis*, conforme observado por microscopia eletrônica pela marcação indireta da IgG de coelho anti-gp190.

JBE, exoantígeno de leveduras do isolado BAT de *P. brasiliensis*, participa da fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos peritoneais murinos e mostra-se capaz de promover a liberação de NO por esses fagócitos.

JBE, quando presente nos macrófagos, promove a inibição da fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis*, possivelmente por interagir com receptores na superfície dos macrófagos. Este estudo sugere que o monossacarídeo N-acetil-D-glicosamina, quando presente nas leveduras de *P. brasiliensis*, promove a inibição da fagocitose por macrófagos tratados com **JBE**, possivelmente pelo bloqueio da gp 70 pelo monossacarídeo.

JBE, quando presente nos macrófagos promovendo a inibição da fagocitose frente a leveduras pré-tratadas com N-acetil-D-glicosamina, reduz a liberação de Óxido Nítrico pelos macrófagos, sugerindo uma alteração na atividade biológica dessas células fagocíticas.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALBINA, J.E.; ABATE, J.A.; HENRY, W.L. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 147, n. 1, p. 144-148, July 1991.
- ALMEIDA, S.R.; LOPES, J.D. The low efficiency of dendritic cell and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 34, p. 529-537, Apr. 2001.
- ALMEIDA, S.R.; UNTERKIRCHER, C.S.; CAMARGO, Z.P. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. **Medical Mycology**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 405-411, Dec. 1998.
- ALMEIDA, I.C.; NEVILLE, D.C.; MEHLERT, A.; TREUMANN, A.; FERGUSON, M.A.; PREVIATO, J.O.; TRAVASSOS, L.R. Structure of the N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Glycobiology**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 507-515, July 1996.
- 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**, São Paulo, v. 5, p. 125-141, 1930.
- ANDRIEU, S.; BIGUET, Y.; DUJARDIN, L.; VAUCELLE T. 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 et mycologia applicata**, Hague, v. 39, n. 2, p. 97-108, nov. 1969.
- BAIDA, H.; BISELLI, P.L.; JUVENALE, M.; DEL-NEGRO, G.M.; MENDES-GIANNINI, M.J.; DUARTE, A.J.; BENARD, G. Differential antibody isotype expression to major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidoidomycosis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 1, n. 4, p. 273-278, Apr. 1999.
- BERNARD, G.; MENDES-GIANNINI, M.J.; JUVENALE, M.; MIRANDA E.T.; DUARTE, A.J. Immunossuppression in paracoccidoidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoprotein that elicit strong humoral immune response. **The Journal of Infection Disease**, Chicago, v. 175, n. 5, p. 1263-1267, May 1997.

- BIAGIONI, L.; SOUZA, M.J.; CHAMMMMA, L.G.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A., MOTA, N.G.S.; FRANCO, M. Serology of paracoccidioidomycosis. II Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 78, n. 5, p. 617, 1984.
- BLUM, H., BEIER, H., AND GROSS, J.H. Improved silver of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BOCCA, A.L.; SILVA, M.F.; SILVA, C.L.; CUNHA, F.Q.; FIQUEIREDO, F. Macrophages expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis* infected mice. **The American Journal of of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 61, n. 2, p. 280-287, Aug. 1999.
- BOCCA, A.L.; HAYASHI, E.E.; PINHEIRO, A.G.; FURLANETTO, A.B.; CAMPANELLI, A.P.; CUNHA, F.Q.; FIGUEIREDO, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis* infected mice with a nitric oxide inhibitor preventes the failure of cell mediated immune response. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 161, n. 6, p. 3056-3063, Sept. 1998.
- BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 80-87, Feb. 2002.
- BOUCHARA, J.P.; SANCHEZ, M.; CHEVAILLER, A.; MAROT-LEBLOND, A.; LISSITZKY, J.C.; TRONCHIN, G.; CHABASSE, D. Sialic acid-dependent recognition of lamin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 7, p. 2717-2724, July 1997.
- BOUCHARA, J.P.; OUMEZIANE, N.A.; LISSITZKY, J.C.; LARCHER, G.; TRONCHIN, G.; CHABASSE, D. Attachement of spores of the human patogenic fungus *Rhizopus oryzae* to extracellular matrix components. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 70, n.1, p. 76-83, May 1996.
- BOUCHARA, J.P.; TRONCHIN, G.; ANNAIX, V.; ROBERT, R.; SENET, J.M. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 58, n., p. 48-54, 1990.
- BOZZA, S.; GAZIANO, R.; SPRECA, A.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; FRANCESCO, P.; ROMANI, L. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* form the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 168, n. 3, p.1362-1371, Feb. 2002.

- BRUMMER, E.; MAQBOOL, A.; STEVENS, D.A. Protection of bronchoalveolar macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor against dexamethasone suppression of fungicidal activity for *Aspergillus fumigatus* conidia. **Medical Mycology**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 509-515, Dec. 2001.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an uptake. **Clinical Microbiology**, Washington, v. 6, n.2, p. 89-117, Apr. 1993.
- BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infection and Immunity**, Washington, v. 57, n. 8, p. 2289-2294, Aug. 1989.
- BRUMMER, E. ; HANSON, L.H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN- γ for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 140, n. 8, p. 2786-2789, Apr. 1988.
- BRUMMER, E.; SUGAR, A.M.; STEVENS, D. A. Immunological activation of murine polymorphonuclear neutrophils for fungal killing: studies with murine cells and *Blastomyces dermatitidis* *in vitro*. **Journal of Leukocytes Biology**, New York, v. 36, n. 4, p. 505-520, Oct. 1984.
- BURGOS, L.C.; CANO, L.E.; RESTREPO, A. Purificación de antígenos somáticos del *Paracoccidioides brasiliensis*, estudio preliminar. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 76-81, mar./abr. 1985.
- CALVI, S.A.; PERAÇOLI, M.T.; MENDES, R.P.; MARCONDES-MACHADO, J.; FECCHIO, D.; MARQUES, S.A.; SOARES, A.M. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 2, p. 107-113, Feb. 2003.
- CAMARGO, Z.P.; CANO, L.E.R. Humoral immunity. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, p. 1130, 1994.
- CAMARGO, Z.P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, C.P.; TRAVASSOS, L.R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for Immunodeficiency tests. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 10, p. 21-47, Oct. 1988.

- CAMPANELLI, A.P.; MARTINS, G.A.; SOUTO, J.T.; PEREIRA, M.S.; LIVONESI, M.C.; MARTINEZ, R.; SILVA, J.S. Faz-FasL ligante (CD 95 – CD 95 L) and cytotoxic T lymphocytes antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. **The Journal of Infection Disease**, Chicago, v. 187, n. 9, p. 1496-1505, May 2003.
- CARMO, J.P.M.; PERAÇOLI, M.T.S.; CALVI, S.A.; DIAS, L.A.; SOARES, A.M.V.C. Cytokine-activated human monocytes kill virulent strain of *Paracoccidioides brasiliensis* by mechanisms independent of nitric oxide release. In: NITRIC OXIDE, CYTOKINES AND INFLAMATION AN INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 2004, Rio de Janeiro-RJ-Brasil. **Resumos do Simpósio Internacional de Óxido Nítrico, Citocinas e Inflamação**, 2004. p.162.
- CARMONA, A. K.; PUCCIA, R.; OLIVEIRA, M.C.; RODRIGUES, E.G.; JULIANO, L.; TRAVASSOS, L.R. Characterization of an exocellular serine-thiol proteinase activity in *Paracoccidioides brasiliensis*. **The Biochemical Journal**, London, v. 309, p. 209-214, July 1995.
- CASOTTO, M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 6, p. 1188-1193, June 1990.
- CASTAÑEDA, E. **Immunological studies in murine paracoccidioidomycosis**. 1985. PhD thesis, University of California, San Francisco, 1985.
- 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**, Baltimore, v. 271, n. 8, p. 4553-4560, Feb. 1996.
- CORMACK, B.P.; GHORI, N.; FALKON, S. An adhesion of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. **Science**, Washington, v. 285, n. 5427, p. 578-582, June 1999.
- CORTI, M.; VILLAFANE, M.F.; NEGRONI, R.; PALMIERI, O. Disseminated paracoccidioidomycosis with peripleuritis in an AIDS patient. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 259-231, jan./fev. 2004.
- 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**, Hague, v. 84, n. 1, p. 55-63, Dec. 1983.

- DEL-NEGRO, G.; LACAZ, C.S.; ZAMITH, V.A.; SIQUEIRA, A.M. General clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in childhood. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL-NEGRO, G. (Ed.). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 225-232.
- DEL-NEGRO, G.M.B.; GARCIA, N.M.; RODRIGUES, E.G.; CANO, M.I.N.; AGUIAR, M.S.M.V.; LIRIO, V. S.; LACAZ, C.S. The sensitivity specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 277-280, jul./ago. 1991.
- DINIZ, S.N.; REIS, B.S.; GOES, T.S.; ZOUAIN, C.S.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine*, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 485-492, Jan. 2004.
- DINIZ, S.N.; CARVALHO, K.C.; CISALPINO, P.S.; SILVEIRA, J.F.; TRAVASSOS, L.R.; PUCCIA, R. Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological reactivity of the recombinant fusion proteins. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, Washington, v. 9, n. 6, p. 1200-1204, Nov. 2002.
- DINIZ, S.N.; CISALPINO, P.S.; FREIRE, A.T.F.; SILVA-TEIXEIRA, D.N.; CONTIGLI, C.; RODRIGUES, V.; GOES, A.M. *In vitro* granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Human Immunology*, New York, v. 62, n. 8, p. 799-808, Aug. 2001.
- DINIZ, S.N.; CISALPINO, P.S.; KOURY, M.C.; ANDRADE, G.M.; NOGUEIRA, M.G.; GOES, A.M. *In vitro* human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. *Microbes and Infection*, Paris, v. 1, n. 5, p. 353-360, Apr. 1999.
- FAVA-NETO, C. Imunologia da paracoccidioidomicose. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 18, p. 42, 1976.
- FAVA-NETO, C.; RHAPHAEL, A. A reação intradérmica com polissacarídeo do *Paracoccidioides brasiliensis*, na blastomicose sul-americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 3, p. 161, 1961.
- FERREIRA, K.S.; LOPES, J.D.; ALMEIDA, S.R. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology Letters*, Amsterdam, v. 94, n. 1-2, p. 107-104, June 2004.

- FIGUEROA, J.I.; HAMILTON, A.J.; ALLEN, M.H.; HAY, R.J. Isolation and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* 58 kDa extracellular glycoprotein which is recognized by human immune sera. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 89, n. 5, p. 566-572, Sept./Oct. 1995.
- FONSECA, C.A.; JESUINO, R.S.; FELIPE, M.S.; CUNHA, D.A.; BRITO, V.A.; SOARES, C.M. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, n. 7, p. 535-542, June 2001.
- FORNAZIM, M.C.; BALTHAZAR, A.; QUAGLIATO, R.Jr.; MAMONI, R.L.; GARCIA, C.; BLOTTA, M.H. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. **The European Respiratory Journal**, London, v. 22, n. 6, p. 895-899, Dec. 2003.
- FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p.129-132, abr./jun.1987.
- FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R. Anatomia patológica. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C.S.; FIORILLO, A.M. (Ed.). **Paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana)**. São Paulo: Savier-EDUSP, 1984. p. 97-117.
- FREITAS-DA-SILVA, G.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Antigenemia in Paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 2, p. 381-285, Feb. 1992.
- GENNARI-CARDOSO, ML. **Paracoccina: lectina de Paracoccidioides brasiliensis, ligante de N-acetil-glicosamina interage com componente de matriz extracelular**. 2000. Tese de Doutorado, Depto de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, 2000.
- GIANNINI, M.J.; BUENO, J.P.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; STOLF, A.M.; MASUDA, A.; AMATO-NETO, V.; FERREIRA, A.W. Antibody responses to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for evaluation of patients under treatment. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 43, n. 2, p. 200-206, Aug. 1990.
- GILDEA, L.A.; MORRIS, R.E.; NEWMAN, S.L. *Histoplasma capsulatum* yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 166, n. 2. p. 1049-1056, Jan. 2001.

- GIOULEKAS, E. GOUTZIOULIS, M.; FARMAKIS, C.; DROUSSOU, V.; KREMENOPOULOS, G.; TSIOURIS, J.; ROILIDES, E. Effects of macrophage colony-stimulating factor on antifungal activity of neonatal monocytes against *Candida albicans*. **Biology of the Neonate**, Basel, v. 80, n. 4, p. 251-256, 2001.
- GOLDANI, L.Z.; MAIA, A.L.; SUGAR, A.M. Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fragment from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 6, p. 1652-1654, June 1995.
- GOMEZ, B.L.; FIGUEROA, J.L.; HAMILTON, A.J.; DIEZ, S.; ROJAS, M.; TOBON, A.M.; HAY, R.J.; RESTREPO, A. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87 kDa determinant during and after antifungal therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 11, p. 3309-3316, Nov. 1998.
- GOMEZ, B.L.; FIGUEROA, J.L.; HAMILTON, A.J.; ORTIZ, B.; ROVLEDO, M.A.; HAY, R.J.; RESTREPO, A. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 12, p. 3278-3283, Dec. 1997.
- GONZALEZ, A.; GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Nitric Oxide participation in the fungicidal mechanism of Gamma Interferon-Activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2546-2552, May 2000.
- GONZALEZ, A.; SAHAZA, J.H.; ORTIZ, B.L.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Medical Mycology**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 391-399, Oct. 2003.
- GORDON, S.; PERRY, V.H.; RABINHOWITZ, S.; CHUNG, L.P.; ROSE, H. Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 9, p. 1-26, 1988.
- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUN, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 126, p. 131-138, 1982.
- HANNA, S.A.; MONTEIRO-DA-SILVA, J.L.; MENDES-GIANINI, M.J.S. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 8, p. 877-884, July 2000.

- HOFFMAN, R.A.; LANGREHR, J.M.; WREN, S.M.; DULL, K.E.; IDSTAD, S.T.; McCARTHY, S.A.; SIMMONS, R.L. Characterization of the immunosuppressive effects of nitric oxide in graft-versus-host-disease. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, n. 3, p. 1508-1518, Aug. 1993.
- HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 8, p. 3543-3546, Aug. 1994.
- HUNG, C.; AMPL, N.M.; CHRISTIAN, L.; SESHAN, K. R.; COLE, G.T. A major cell surface antigen of *Coccidioides immitis* which elicits both humoral and cellular immune responses. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 2, p. 584-593, Feb. 2000.
- JIMENEZ, B.E.; MURPHY, J.M. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. **Infection and Immunity**, Washington, v. 46, n. 2, p. 552-558, Nov. 1984.
- KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L.H.; VAZ, C.A.; BURGER, E.; SINGER, L.M.; CALICH, V.L. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, New York, v. 20, n. 1, p. 89-97, Jan. 2000.
- KATSIFA, H.; TSAPARIDOU, S.; DIZA, E.; GIL-LAMAIGNERE, C.; WALSH, T.J.; ROILIDES, E. Effects of interleukin-13 on antifungal activity of human monocytes against *Candida albicans*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 211-217, Oct. 2001.
- KAWAKAMI, K.; KOGUCHI, Y.; QURESHI, M.H.; YARA, S. KINJO, Y., UEZU, K.; SAITO, A. NK cells eliminate *Cryptococcus neoformans* by potentiating the fungicidal activity of macrophages rather than by directly killing them upon stimulation with IL-12 and IL-8. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 44, n. 12, p. 1043-1050, 2000.
- KERR, I.B.; ARARIPE, J.R.; OLIVEIRA, P.C.; LENZI, H.L. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 336-350, set./out. 1988.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SHRECKEMBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Color atlas and text book of diagnostic microbiology**. Philadelphia-New York: Lippincott. 1997.

- KURITA, N.; ORADA, M.; ITO, E.; MIYAJI, M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 261-267, Aug. 1999.
- KUROKAMA, C.S.; SUGISAKI, M.F.; PERAÇOLI, M.T. Virulence factors in fungi of systemic mycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 125-135, May/June 1998.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 259, p. 680-685, Aug. 1970.
- LEVERY, S.B.; TOLEDO, M.S.; SUZUKI, E.; SLYAN, M.E.; HAKOMORI, S.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K. Structural characterization of a new galactofuranose-containing glucolipid antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, San Diego, v. 222, n. 2, p. 639-645, May 1996.
- LINEHAN, S.A.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S. Macrophage lectins in host defense. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 3, p. 279-288, Mar. 2000.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 55, p. 35-67, 1986.
- LOPES, J.D.; MOURA-CAMPOS, M.C.; VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; SOUZA, W.; CAMARGO, Z.P. Characterization of glycoprotein gp 43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 27, n. 9, p. 2309-2313, Sept. 1994.
- LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hialostomycoses americanas. **Brasil-Médico**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 121-124/141-144, 1908.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, M.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MÁLAGA, S.; YOSHIDA, N. Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp 90 increases parasite infectivity. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 1, p. 353-359, Jan. 2001.

- MAMBULA, S.S.; SIMONS, E.R.; HASTEY, R.; SELSTED, M.E.; LEVITZ, S.M. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 11, p. 6257-6264, Nov. 2000.
- MAMONI, R.L.; NOUER, S.A.; OLIVEIRA, S.J.; MUSATTI, C.C.; ROSSI, C.L.; CAMARGO, Z.P.; BLOTTA, M.H.S.L. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, Oxford, v. 40, p.153-159, June 2002.
- MANSOUR, M.K.; LEVITZ, S.M. Interaction of fungi with phagocytes. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, n. 4, p. 359-365, Aug. 2002.
- MANSOUR, M.K.; SCHESINGER, L.S.; LEVITZ, S.M. Optimal T cell responses to *Cryptococcus neoformans* mannoprotein are dependent on recognition of conjugated carbohydrates by mannose receptors. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 168, n. 6, p. 2872-2879, Mar. 2002.
- MATTOS-GROSSO, D.; ALMEIDA, S.R.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Characterization of gp 70 and anti-gp 70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 11, p. 6534-6542, Nov. 2003.
- MATTAR-FILHO, R.; AZEVEDO, M.O.; PEREIRA, M.; JESUINO, R.S.; SALEM-IZACC, S.M.; BRITO, W.A.; GESZTESI, J.L.; SOARES, R.B.; FELIPE, M.S.; SOARES C. M. Expression of glycoprotein gp 43 in stage-specific forms and during dimorphic differentiation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 341-345, Sept./Oct. 1997.
- McEWEN, J.C.; ORTIZ, B.L.; GARCIA, A.M. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27 kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 20, n. 2, p. 125-131, June 1996.
- 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, n. 3, p. 603-608, May 1987.
- MENDES-GIANNINI, M.J.; TOSCANO, E.; DEL-NEGRO, G.B.; ASSIS, C.M.; GARCIA, N.M. Immunochemical study of a *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide-like antigen. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 379-383, Nov./Dec. 1995.

- MOREIRA, S.F.; BAILAO, A.M.; BARBOSA, M.S.; JESUINO, R.S.; FELIPE, M.S.; PEREIRA, M., ALMEIDA-SOARES, C.M. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast*, Chichester, v. 21, n.2, p. 173-82, Jan. 2004.
- MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D.A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *Journal of Medical Microbiology*, Washington, v. 40, n. 3, p. 159-164, Mar. 1994.
- MOSCARDI-BACCHI, M.; SOARES, A.; MENDES, R.; MARQUES, S.; FRANCO, M. *In situ* localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, Oxford, v. 27, n. 3, p. 149-158, 1989.
- MUNK, M.E.; KAJDACSZY-BALLA, A. DEL-NEGRO, G.; CUCE, L.C., SILVA, W.D. Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, Oxford, v. 30, n. 4, p. 317-321, 1992.
- NASCIMENTO, F.R.F.; CALICH, V.L.G.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 168, n. 9, p. 4593-4600, May 2002.
- NEGRONI, R. Nuevos estudios sobre antígenos para las pruebas sorológicas en la blastomicosis sudamericana. *Dermatologia Iberolatino-Americana*, Lisboa, v. 4, p. 409, 1968.
- NETEA, M.G.; VAN-DER-GRAAF, C.A.; VONK, A.G.; VERSCHUEREN, I.; VAN-DER-MEER, J.W.; KULLBERG, B.J. The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *The Journal of Infection Disease*, Chicago, v. 185, n. 10, p. 1483-1489, May 2002.
- NEWORAL, E.P.M.; ALTEMANI, A.; MAMONI, R.L.; NORONHA, I.L.; BLOTTA, M.H.S.L. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine*, San Diego, v. 21, n. 5, p. 234-241, Mar. 2003.
- OLLERT, M.W.; SOHNCHEN, R.; KORTING, C.; OLLERT, U.; BRAUTIGAM, S.; BRAUTIGAM, W. Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. *Infection and Immunity*, Washington, v. 61, n.11, p. 4560-4568, Nov. 1993.

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

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

OSTIANI, C.F.; DEL-SERO, G.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; SPRECA, A.; MENCACCI, A.; TICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; ROMANI, L. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*, Implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 191, n. 10, p. 1661-1674, May 2000.

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

PARISE-FORTES, M.R.; Da-SILVA, M.F.; SUGIZAKI, M.F.; DEFAVERI, J.; MONTENEGRO, M.R.; SOARES, A.M.; PERAÇOLI, M.T. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 51-60, Feb. 2000.

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

PERAÇOLI, M.T.S.; FORTES, M.R.; SILVA, M.F.; MONTENEGRO, M.R. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the syrian hamster. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 129-136, mar./abr. 1995.

PEREIRA, W.O.; ALVES, C.C.S.; FABRINO, D.L.; TEIXEIRA, H.C.; FERREIRA, A.P. Differential NADPH diaphorase activity and nitric oxide production by peritoneal cells in the early phase of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. In: NITRIC OXIDE, CYTOKINES AND INFLAMATION AN INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 2004, Rio de Janeiro-RJ-Brasil. **Resumos do Simpósio Internacional de Óxido Nítrico, Citocinas e Inflamação**, 2004. p.186.

PINA, A.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; MOLINARI-MADLUM, E.E.; VAZ, C.A.; KELLER, A.C.; CALICH, V.L. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 4, p. 2369-2378, Apr. 2004.

POPI, A.F.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. Gp 43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage function. An evasion mechanism of the fungus. **Cellular Immunology**, Orlando, v. 218, n. 1-2, p. 87-94, July/Aug. 2002.

PUCCIA, R.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; TRAVASSOS, L. R.; CARMONA, A. K. Detection of the basement membrane-degrading proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis* after SDS-PAGE using agarose overlays containing abzm-kaltlq-ednp. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 645-649, May 1999.

PUCCIA, R.; CARMONA, A.K.; GESZTESI, J.L.; JULIANO, L.; TRAVASSOS, L.R. Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. **Medical Mycology**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 345-348, Oct. 1998.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis or Jorge Lobo's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 8, p. 1610-1615, Aug. 1991a.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R. The 43-kilodalton glycoprotein from human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 289, n. 2, p. 298-302, Sept. 1991b.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P.A.J.; TRAVASSOS, L.R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, Washington, v. 53, n. 1, p. 199-206, July 1986.

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

RESTREPO, A.; MONCADA, L.H. Characterization of the precipitating bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. **Applied Microbiology**, Washington, v. 28, n. 1, p. 138-144, June 1974.

RESTREPO, A.; DROUHET, E. Etude des anticorps precipitants dans la blastomycose Sud Americane per L'analyse immunoelectrophoretique des antifens de *Paracoccidioides brasiliensis*. **Annales de l'Institut Pasteur**, Paris, v. 119, n. 3, p. 338-346, Sept. 1970.

RODRIGUES, E.G.; TRAVASSOS, L.R. Nature of the reactive epitopes in *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide antigen. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 77-81, 1994.

ROQUE-BARREIRA, M.C.; CAMPOS NETO, A. Jacalin: an IgA binding lectin. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 134, n. 3, p. 1740-1743, Mar. 1985.

RUAS, L.P.; CASABONA-FORTUNATO, A.S.; KOZY, E.H.; MARTINEZ, R.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Lectin and enzymatic activities of paracoccin derived from different *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSE, 2002. Pirenópolis. **Resumos do Annual Review of Biomedical Sciences**. Fundação Editora da UNESP, 2002. p. 66.

SALEM-IZACC, S.M.; JESUINO, R.S.A.; BRITO, W.A.; PEREIRA, M.; FELIPE, M.S.S.; SOARES, C.M.A. Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stages-specific forms and during cellular differentiation. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 205-211, May/June 1997.

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

SAN-BLAS, G.; MORENO, B.; CALCAGNO, A.M.; SAN-BLAS, F. Lysis of *Paracoccidioides brasiliensis* by *Zygosporium geminatum*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 75-79, Apr. 1998.

SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. Bioquímica y dimorfismo en *Paracoccidioides brasiliensis*. In: DEL-NEGRO, G.; LACAZ, C.S.; FIORILLO, A.M. (Ed.). **Paracoccidioidomycose Blastomycose Sul-Americana**. São Paulo: Savier-Edusp, 1982. p. 35-58.

SASTRY, M.V.; BANARJEE, P.; PATANJALI, S.R.; SWAMY, M.J.; SWARNALATHA, G.V.; SUROLIA, A. Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen β -D-Gal(1-3)D-GalNAc. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 261, n.10, p. 11726-11733, Oct. 1986.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as Cell Recognition molecules. **Science**, Washington, v. 246, n. 4927, p. 227-234, Oct. 1989.

SHARON, N. Lectins receptors as lymphocyte surface markers. **Advances in Immunology**, New York, v. 34, p. 213-298, 1983.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; PEREIRA, P.M.; YAMASHIRO-LANASHIRO, E.; DUARTE, M.I.S.; ASSIS, C.M.; GERALDES, E.A.; SALDIVA, P.H.N. Lung tissue mechanics in the early stages of induced paracoccidioidomycosis in rats. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, São Paulo, v. 30, n. 10, p. 1175-1179, Oct. 1997.

SHOHAM, S.; HUANG, C.; CHEN, J.M.; GOLENBOCK, D.T.; LEVITZ, S.M. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF- α release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 166, n. 7, p. 4620-4626, Apr. 2001.

SILVA, C.L.; FAZIOLI, R. A. *Paracoccidioides brasiliensis*, polysaccharide having granuloma-inducing toxic and macrophages-estimulating activity. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 131, p. 1497-501, June 1985.

SILVA-VERGARA, M.L.; TEIXEIRA, A.C.; CURI, V.G.; COSTA-JUNIOR, J.C.; VANUNCE, R.; CARMO, W.M.; SIVA, M.R. Paracoccidioidomycosis associated with human immunodeficiency virus infection. Report of 10 cases. **Medical Mycology**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 259-263, June 2003.

SOARES, R.B.A.; FELIPE, M.S.S.; ULHOA, C.J.; SOARES, C.M.A. *Purificação e caracterização de N-acetil-Beta-D-Glicosaminidase do fungo patogênico humano Paracoccidioides brasiliensis*. In: VII ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSE, 1999, Campos do Jordão- São Paulo- Brasil. **Resumos do VII Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomycose**, 1999. p.197.

SOARES, R.M.; ALVIANO, C.S.; ANGLUSTER, J.; TRAVASSOS, L.R. Identification of sialic acids on the cell surface of hyphae and yeast forms of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 31-34, Mar. 1993.

SOUTO, P.C.; BRITO, V.N.; GAMEIRO, J.; Da CRUZ-HOFLING, M.A.; VERINAUD, L. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 192, n. 4, p. 225-229, Nov. 2003.

- SPLENDORE, A. Un'affezione micotica con localizzazione nella mucosa della bocca, 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, Roma, 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*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, Oxford, v. 26, n. 6, p. 267-273, 1988.
- STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase in closely associated with resistance to *Leishmania major*. *The Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 180, n. 3, p. 783-793, May 1994.
- STOVER, E.P.; SHAR, G.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; FELDMAN, D. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast forms cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 51, n. 1, p. 199-204, Jan. 1986.
- STRAUS, A.H.; FREYMULLER, E.; TRAVASSOS, L.R.; TAKAHASHI, H.K. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* monoclonal antibodies. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, Oxford, v. 34, n. 3, p. 181-186, June/July 1996.
- 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.; FREIRE-MAIA, D.V. Correlation between antigenemia of *Paracoccidioides brasiliensis* and inhibiting effects of plasma in patients with paracoccidioidomycosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, Oxford, v. 37, n. 4, p. 277-284, Aug. 1999.
- SUZUKI, E.; TOLEDO, M.S.; TAKARAHSI, H.K.; STRAUS, A.H. A monoclonal antibody directed to terminal residue of beta-galactofuranose of a glycolipid antigen isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*: cross-reactivity with *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi*. *Glycobiology*, Oxford, v. 7, n. 4, p. 263-268, June 1997.
- TABORDA, C.P.; JULIANO, M.A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TAVASSOS, L.R. Mapping of the T-cell epitope in the major 43kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, Washington, v. 66, n. 2, p. 786-793, Feb. 1998.
- TABORDA, C.P.; CAMARGO, Z.P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 32, n. 2, p. 554-556, Feb. 1994.

TABORDA, C.P.; CAMARGO, Z.P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen-gp43. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 155-160, 1993.

TAKAHASHI, H.K.; LEVERY, S.B.; TOLEDO, M.S.; SUZUKI, E.; SALYAN, M.K.; HAKOMORI, S.; STRAUS, A.H. Isolation and possible composition of glucosylceramides from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 29, n. 11, p.1441-1444, Nov. 1996.

TANI, H.; NISHIJIMA, M.; USHIJIMA, H.; MIYAMURA, T.; MATSUDA, Y. Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. **Virology**, New York, v. 279, n. 1, p. 343-353, Jan. 2001.

TANNIDA, T.; TAO, F.; HAMADA, T.; UETA, E.; OSAKI, T. Lactoferrin peptides increases the survival of *Candida albicans*-inoculated mice by upregulation neutrophil and macrophages functions, especially in combination with amphotericin B and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n.3, p. 3883-3890, Jan. 2001.

THOMSSON, K.A.; PRAKBPOL, A.; LEFER, H.; REDDY, M.S.; LEVINE, M.J.; FISHER, S.J.; HANSSON, G.C. The salivary mucin MG1 (MUC5B) carries a repertoire of unique oligosaccharides that is large and diverse. **Glycobiology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 1-14, Jan. 2002.

TOLEDO, M.S.; SUZUKI, E.; STRAUS, A.H.; TALAHASH, H.K. Glycolipids from *Paracoccidioides brasiliensis*. Isolation of a galactofuranose-containing glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 247-251, July/Aug. 1995.

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

VARKI, A.; CUMMINGS, R.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. **Essentials of glycobiology**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. p. 85-114.

VAZ, C.A.; MACKENZIE, D.W.; HEARN, V.; CAMARGO, Z.P.; SINGER-VERMES, L.M.; BURGUER, E. Gelatinase activity of exoantigens from virulent and non-virulent isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 65-69, 1994.

VESPA, G.N.R.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi* induced micr parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 11, p. 5177-5182, Nov. 1994.

VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; FRANCO, M.F.; SOUZA, W.; MORARES, J.Z.; TRAVASSOS, L.R.; LOPEZ, J.D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp 43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 4, p. 1465-1469, Apr. 1994.

WU-HSIEH, B.A.; CHEN, W.; LEE, H.J. Nitric oxide synthase expression in macrophages of *Histoplasma capsulatum* infected mice is associated with splenocyte apoptosis and unresponsiveness. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n.11, p. 5520-5526, Nov. 1998.

YARZÁBAL, L. Composicion atigénica de *Paracoccidioides brasiliensis*. In: DEL-NEGRO, G.; LACAZ, C.S.; FIORILO, A.M. (Ed.). **Paracoccidioidomicose: Blastomicose sul-americana**. São Paulo, Brazil: Sarvier-EDUSP, 1982. p. 59-67.

YARZÁBAL, L.; ANDRIEU, S.; BOUT, D.; NAQUIRA, F. Isolation of a specific antigen with alkaline phosphatase activity from soluble extracts of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 14, n. 3, p. 275-280, Nov. 1976.

YARZÁBAL, L.; BIGUET, J.; VAUCELLE, T.; ANDRIEU, S.; TORRES, J.M.; Da-LUZ, S. Análisis immunoquímico de extractos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 11, n. 1, p. 80-88, Mar. 1973.