

Viviane Cristina Fernandes dos Santos

**Clonagem, Expressão e Caracterização
Imunológica da Proteína Pb40r Presente na
Fração Protetora F0 de *Paracoccidioides
brasilensis***

**Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2007**

VIVIANE CRISTINA FERNANDES DOS SANTOS

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E
CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA
PROTEÍNA pb40r PRESENTE NA FRAÇÃO
PROTETORA F0 DE *Paracoccidioides
brasilensis***

Dissertação apresentada ao colegiado do curso de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia

ORIENTADOR: DR. ALFREDO MIRANDA DE GÓES

Belo Horizonte

Fevereiro - 2007

043

Santos , Viviane Cristina Fernandes dos.

Clonagem, expressão e caracterização imunológica da proteína Pb40r presente na fração protetora F0 de paracoccidídeos brasiliensis [manuscrito] / Viviane Cristina Fernandes dos Santos. – 2007.

114 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Alfredo Miranda de Góes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Paracoccidíomicose - Teses. 2. Paracoccidídeos brasiliensis - Teses. 3. Imunodiagnóstico - Teses. 4. Proteínas recombinantes - Teses. 5. Bioquímica - Teses. I. Góes, Alfredo Miranda de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências



Universidade Federal de Minas Gerais -
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VIVIANE CRISTINA FERNANDES. Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro de 2007 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Clonagem, expressão e caracterização imunológica da proteína Pb40r presente na fração protetora F0 de *Paracoccidioides brasiliensis*” requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Maria Aparecida de Resende da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho do Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Alfredo Miranda de Góes, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2007.


Dra. Maria Aparecida de Resende – UFMG


 Prof.ª Andréa Mara Macedo
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em
 Bioquímica e Imunologia
 Instituto de Ciências Biológicas - UFMG


Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho – COLTEC-UFMG


Dr. Alfredo Miranda de Góes – orientador- UFMG

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Dr. Alfredo Miranda de Góes.

Apoio Financeiro:

Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior – CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG

Daquilo que eu sei,
Nem tudo me foi permitido
Nem tudo me deu certeza;
Daquilo que eu sei,
Nem tudo me foi proibido
Nem tudo me foi possível
Nem tudo me foi concebido.

Não fechei os olhos,
Não tapei os ouvidos,
Chorei, toquei, provei.
Ah! Eu usei todos os
sentidos.

(...)

Ivan Lins e Victor Martins

Aos meus queridos e amados pais pelo aprendizado gerado ao longo de todos esses anos de convivência. A eles que me ensinaram a ser forte sem perder a doçura, a lutar pelos meus ideais e a não parar diante dos obstáculos.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de sonhar e pela saúde e força para buscar esses sonhos.

Aos meus pais João e Marlene, sem dúvida, meus maiores exemplos de vida, honestidade e perseverança, pelo amor, carinho e por não terem medido esforços para que eu chegasse até aqui, estando ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu irmão Thiago, pelo amor puro e sincero. Ele que é, sem a menor sombra de dúvida, minha maior fonte de aprendizado.

Ao meu querido noivo, Genésio, por ter estado sempre ao meu lado em momentos felizes e também em momentos difíceis e por ter tido paciência em me esperar quando não pude estar perto.

À minha família pelo apoio e carinho, especialmente ao meu primo Felipe que está sempre ao meu lado me dando força e carinho, apesar dos muitos quilômetros que nos separam.

Às amigas: Luiza, Adriana, Natália Breyner e Estefânia pela grandiosa ajuda na realização deste trabalho e por dividirem comigo expectativas e angustias em muitos momentos.

A Rafaela, peça chave no desenvolvimento desse trabalho, pela ajuda, disponibilidade, paciência, carinho e amizade.

Ao Bernardo pelo auxílio, orientação, carinho e amizade. Que me acolheu com muito carinho e disponibilidade. Minha eterna gratidão.

À Liliane, pela amizade e cumplicidade.

Ao meu amigo Jamil, pelo auxílio, carinho e disponibilidade.

A Bete, pelo carinho, paciência e disponibilidade.

A Peu, pelo auxílio com os camundongos.

A Íris, pela amizade e carinho e é claro pelo Santo Antônio.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular: Cris, Cris Torres, Carol, Ana Carolina, Jú, Guilherme, Tércio, Tiago, Marina, Inácio, Mário, Paula, Karine, Rogéria, Natália, Jankerle, Patrícia, Ana Paula, Suzana e Luara pelo convívio agradável e pela amizade que certamente me acompanhará por toda vida.

A Helô que deixou saudades e um grande exemplo de vida.

A professora Célia da UFG e a todos os seus alunos, em especial ao Luiz pela grande ajuda na purificação da proteína e por ter me recebido muito bem, como se eu fosse da família, mesmo sem nunca ter me visto.

Às minhas amigas Katiúcia e Michele pela amizade e “hospedagem” carinhosa, durante minha estadia em Goiânia.

À professora Maria de Fátima Leite e aos alunos de seu laboratório, pelo apoio e parceria.

E por fim um agradecimento especial ao meu querido orientador Alfredo, pelo carinho, amizade e também pelo conhecimento transmitido, o qual, certamente teve muita importância para meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada!!

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE GRÁFICOS	XVI
LISTA DE TABELAS	XVIII
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XXI
I- INTRODUÇÃO	1
1.1 - Histórico da PCM	2
1.2 - O agente etiológico	3
1.3 - Aspectos gerais da PCM	5
1.4 – Formas clínicas da PCM	9
A. PCM aguda ou subaguda (juvenil)	9
B. PCM crônica (do adulto)	10
1.5 – Tratamento	10
A. Sulfonamidas	10
B. Anfotericina B	11
C. Derivados do Imidazol	11
1.6 – Fatores de virulência de <i>P. brasiliensis</i>	13
1.7 – Resposta imunológica do hospedeiro	15
1.7.1 – Imunidade Inata	15
1.7.2 – Imunidade Específica	17
A)- Imunidade Humoral	17
B)- Imunidade Celular	18
1.7.3 – Reação Granulomatosa	20
1.8 – Antígenos de <i>P. brasiliensis</i>	22
1.9 – Justificativa	24
II- OBJETIVOS	29
2.1 – Objetivo Geral	30

2.2 – Objetivos Específicos	30
III – METODOLOGIA	31
3.1 – Microorganismo	32
3.2 – Amplificação da seqüência gênica da proteína de interesse	32
3.3 – Eletroforese em gel de agarose	33
3.4 – Construção do plasmídeo recombinante pGEX4T-3/pb40r	34
3.5 – Sequenciamento do fragmento inserido no pGEX4T-3	34
3.6 – Transformação de bactérias com o plasmídeo recombinante	36
3.7 – Mini-expressão das proteínas recombinantes GST e GST/pb40r	36
3.8 – Expressão da proteína recombinante GST	37
3.9 – Expressão da proteína recombinante GST/pb40r	38
3.10 – Purificação das proteínas GST/pb40r e GST	38
3.11 – Purificação da proteína clivada, pb40r	39
3.12 – Dosagem protéica pelo método de Bradford	40
3.13 – Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE	40
3.14 – Obtenção dos soros	41
3.14.1 – Soros de camundongos imunizados	41
3.14.2 – Soros de camundongos infectados	42
3.14.3 – Obtenção dos soros humanos	43
3.15 – Eletrotransferência de proteínas – “Western Blot”	45
3.16 – ELISA	46
3.16.1 – ELISA com soros de camundongos	46
3.16.2 – ELISA com soros humano	47
3.17 – Análises estatísticas dos dados	48
IV – RESULTADOS	49
4.1 – Amplificação da sequência gênica da pb40r	50
4.2 – Transformação das bactérias E. coli BL-21 com o plasmídeo recombinante	51
4.3 – Expressão da proteína recombinante GST/pb40r	55
4.4 – Purificação da proteína recombinante GST/pb40r	58
4.5 – Purificação da proteína recombinante clivada, pb40r	60

4.6 – Reatividade de anticorpos	62
4.6.1 – Reatividade dos anticorpos presentes nos soros de camundongos.....	62
4.6.2 – Reatividade dos anticorpos presentes nos soros de pacientes	70
V – DISCUSSÃO	74
VI – CONCLUSÃO	85
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
VIII – ANEXOS	109
ANEXO I: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMG (CETEA)	110
ANEXO II: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP)	112

Lista de Abreviaturas

ASTs – Etiquetas de seqüências antigênicas

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina sérica bovina

BLAST – Do inglês : “Basic Local Alignment Tool”

CD – “cluster of differentiation”

cDNA – DNA complementar

CETEA – Comitê de ética em pesquisa animal

CFUs – Unidades formadoras de colônia

COEP – Comitê de ética em pesquisa

CTR-DIP - Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias
do Hospital das Clínicas da UFMG

DAB – 3, 3'diaminobenzidine

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

D.O – Densidade ótica

DTH – Reação de hipersensibilidade tardia (do inglês: delayed-type
hipersensitivity)

DTT – Dithiothreitol

ECM – Matriz extracelular

ELISA - Ensaio de absorção imunoenzimático (do inglês: “Enzyme-Linked
Immunosorbent Assay”)

F0 - Fração 0 de PbAg

F1 – Fração 1 de PbAg

FIII - Fração 3 de PbAg

gp 43 – Glicoproteína de 43 kDa de *P. brasiliensis*

GST – Glutathione-S-transferase

GST/pb40r – Proteína fusionada GST + proteína de 40 kDa de *P. brasiliensis*

IFN- γ - Interferon gama

Ig – Imunoglobulinas

IL- Interleucina

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactosidase

L – Forma leveduriforme de *P. brasiliensis*

LB – Meio Luria Bertani

M – Forma micelial de *P. brasiliensis*

MEXO – Antígenos de membrana e secretados

MHCII – Complexo principal de histocompatibilidade do tipo II

NCBI – “National Center for Biotechnology Information”

NK – Célula matadoras naturais (do inglês: natural killer cells)

NO – Óxido nítrico (do inglês: nitric oxide)

OPD – Ortofenilenodiamino

Pb – *Paracoccidioides brasiliensis*

Pb 18 – Cepa de *P. brasiliensis* isolado virulento humano

pb40r – Proteína de 40 kDa de *P. brasiliensis*

PbAg – Antígeno somático de leveduras de *P. brasiliensis*

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico (do inglês: peripheral Blood mononuclear cells)

PBS – Tampão salina fosfato (do inglês: “Phosphate buffer solution”)

PCM – Paracoccidioidomicose

PCM-C – Pacientes com PCM cerebral

PCM-R – Pacientes com PCM recidiva

PCM-T – Pacientes com PCM tratados

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês: Polymerase chain reaction)

SDS – Sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil

SNP – Polimorfismo de nucleotídeos únicos (do inglês: single nucleotide polymorphism)

T4 DNA ligase – DNA ligase do bacteriófago T4

Taq DNA polimerase – DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*

TEMED – N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamino

TGF- β – “Transforming growth factor beta”

TH – Células T-auxiliares (do inglês: T helper)

Th1 – Células T auxiliares do tipo 1 (do inglês: T helper cells type 1)

Th2 - Células T auxiliares do tipo 2 (do inglês: T helper cells type 2)

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

VPP – Valor de predição positiva

VPN – Valor de predição negativa

Lista de figuras

Título	Página
Figura 1: Mapa da distribuição global da PCM	6
Figura 2: Plasmídeo pGEX4T-3.....	35
Figura 3: Gel de agarose 1%, mostrando a amplificação da seqüência de 1134 pb correspondente ao gene da proteína pb40r de <i>P. brasiliensis</i>	50
Figura 4: Gel de agarose 1%, com os perfis obtidos da amplificação por PCR da seqüência de aproximadamente 1500pb das amostras de bactérias <i>E.coli</i> BL-21 transformadas com o plasmídeo recombinante pGEX4-T3.....	52
Figura 5: Seqüência nucleotídica e de aminoácidos do inserto da pb40r.....	54
Figura 6: Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína pb40r de <i>P. brasiliensis</i> com as seqüências correspondentes à EF-HAND domain protein de <i>Neosartorya fischeri</i> (número de acesso: XP_001257850) e de <i>Aspergillus clavatus</i> (número de acesso: XP_001267883) através do ClustalW (1.82) Sequence Alignment.....	55

Título	Página
Figura 7: Gel de SDS-PAGE 10% corado por azul de Comassie, do perfil de expressão da GST/pb40r e da GST.....	56
Figura 8: Gel de SDS-PAGE 10% corado por azul de Comassie, do perfil do sedimento e do sobrenadante da expressão da GST/pb40r...	58
Figura 9: Gel de SDS-PAGE 10% corado por azul de Comassie, com os perfis resultantes de várias purificações da proteína recombinante GST/pb40r.....	59
Figura 10: Gel de SDS-PAGE 10% corado por Azul de Comassie, com o perfil resultante da purificação da proteína recombinante GST.....	60
Figura 11: Gel de SDS-PAGE 10% corado por azul de Comassie, com os perfis resultantes da clivagem da proteína recombinante GST/pb40r.....	61
Figura 12: Ensaio de Western Blot confirmando a presença da proteína pb40r.....	62

Lista de gráficos

Título	Página
Gráfico 1: Representação gráfica da reatividade dos soros de camundongos BALB/c frente a proteína GST/pb40r pura.....	63
Gráfico 2: Representação gráfica da reatividade dos soros de camundongos BALB/c frente à proteína GST pura.....	64
Gráfico 3: Representação gráfica das respostas de IgG total contra pb40r.....	65
Gráfico 4: Representação gráfica da reatividade dos soros de camundongos BALB/c infectados com <i>P. brasiliensis</i> frente à proteína pb40r pura.....	67
Gráfico 5: Representação gráfica das respostas de IgG1 e IgG2a contra pb40r em camundongos imunizados.....	68
Gráfico 6: Representação gráfica das respostas de IgG1 e IgG2a contra pb40r em camundongos infectados.....	69

Título	Página
Gráfico 7 – Representação gráfica da reatividade dos soros de pacientes infectados com <i>P. brasiliensis</i> e de indivíduos controle frente à pb40r em ensaios de ELISA.....	71
Gráfico 8 – Representação gráfica da reatividade à pb40r por soros de pacientes com infecções diversas.....	73

Lista de tabelas

Título	Página
Tabela 1. Classificação dos grupos de indivíduos doadores quanto à infecção diagnosticada.....	45
Tabela 2. VPP e VPN do ensaio de ELISA com soro de pacientes com PCM com ou sem tratamento, com recidiva ou PCM cerebral.....	72

Resumo

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma das mais importantes micoses endêmicas da América Latina; ela é usualmente diagnosticada pela observação e/ou isolamento do seu agente etiológico *Paracoccidioides brasiliensis*, assim como por uma grande variedade de métodos imunológicos. Embora esses últimos sejam efetivos, dois grandes problemas, reação cruzada com outros agentes micóticos e complexidade dos antígenos utilizados, impedem a padronização desses procedimentos. Para superar essa falta de reprodutibilidade, ferramentas de biologia molecular foram utilizadas para produzir um antígeno recombinante, de aproximadamente 40kDa de peso molecular, desse fungo. Esse antígeno foi identificado por Góes e colaboradores (2005), através da estratégia da produção de ASTs, tendo sido caracterizado como uma proteína que apresentou homologia com a calcineurina B de *Neurospora crassa*. Essa proteína foi clonada em vetor pGEX4T-3 e expressa em sistema procarioto, apresentando-se como uma proteína de 378 aminoácidos e aproximadamente 40kDa, sendo denominada pb40r. Essa proteína possui dois motivos mão-EF de ligação ao cálcio e apresenta homologia com a “EF-HAND domain protein” de *Neosartorya fischeri* e de *Aspergillus clavatus*. Testes de ELISA utilizando soros de camundongos imunizados com a proteína recombinante demonstraram que a mesma é imunogênica, sendo capaz de induzir significativa produção de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a. Além disso, camundongos infectados com *P. brasiliensis* também responderam a testes de ELISA, demonstrando a produção de IgG, IgG1 e IgG2a anti-pb40r. Uma bateria de 149 amostras de soro humano, consistindo de 72 de

pacientes com PCM de diversas formas clínicas, 61 de pacientes com infecções diversas e 16 de indivíduos aparentemente saudáveis, foram testados por ELISA com a proteína recombinante, pb40r, purificada. A sensibilidade e a especificidade da proteína em distinguir indivíduos sem infecção aparente de indivíduos com PCM de diversas formas clínicas foram de 90,3% e 81,25%, respectivamente. Já a especificidade desse antígeno frente a soros de indivíduos com outras infecções foi de 81,96%. Taxa significativa de reatividade cruzada foi observada com soros de pacientes com leishmaniose. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a proteína recombinante pb40r é um antígeno promissor, como alvo para imunodiagnóstico da PCM.

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is one of the most important endemic mycoses in Latin America; it's usually diagnosed by observation and/or isolation of the etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*, as well as by a variety of immunological methods. Although the latter are effective, two circumstances, cross-reactions with other mycotic agents and antigen preparation marked by extreme variability among batches, prevents a proper standardization of the procedures. To overcome this lack of reproducibility, molecular biology tools were used to produce a recombinant 40-kDa-molecular-mass antigen from this fungus. This antigen was identified by Goes et al. (2005), through the AST strategy, as a homolog of *Neurospora Crassa* calcineurin B. This cDNA was cloned in pGEX4T-3 vector and was expressed in a prokaryotic system as a protein with 378 amino acids and approximately 40 kDa of molecular weight, denominated pb40r. This protein has two EF-hand binding calcium domains and the comparisons of the transcribed sequence to sequences in different gene banks reveal a homology to the EF-HAND domain protein of *Neosartorya fischeri* and *Aspergillus clavatus*. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using mice immune serum samples against the recombinant protein, showed that pb40r is an immunogenic protein able to induce the production of a great quantity of IgG, IgG1 and IgG2a antibodies. Moreover, mice infected with *P. brasiliensis* are also able to recognize pb40r. They showed production of IgG, IgG1 and IgG2a against pb40r. A battery of 149 human serum samples, consisting of 72 sera samples from patients with several clinical forms of PCM, 61 sera sample from patients with diverse infections

and 16 from healthy subjects, were all tested by ELISA using the purified pb40r. The sensitivity was 90.3%, when compared to the healthy subjects and the specificity for PCM patients was 81.25% while for patients with other diseases, it was 81.96%. A significant high cross-reaction was detected when sera from patients with leishmaniases was evaluated. These results indicate that the recombinant protein pb40r is a promising antigen to be used in immunodiagnosis of PCM.

I - INTRODUÇÃO

1.1- *Histórico da PCM*

A Paracoccidioidomicose foi descrita inicialmente em 1908, na cidade de São Paulo (Estado de São Paulo, Brasil) por Adolf Lutz (1855-1940), um dos maiores vultos da medicina brasileira. Iniciou-se uma fase na qual iriam predominar os registros de casos e a tentativa de isolamento do agente infectante, para o estudo de suas principais características (Lacaz, 1982). Ainda em São Paulo, Alfonso Splendore (1871-1953) começou também a estudar a doença, cultivando seu agente etiológico, enquadrando-o em um gênero já conhecido em Micologia – *Zymonema*, *Zymonema brasiliense* (Lacaz, 1982).

Novos estudos do agente etiológico da paracoccidioidomicose foram feitos em 1927 pelo médico Floriano Paulo de Almeida (1898-1977). Em 1930, após estudos bem sistematizados, Almeida criou um novo gênero dentro do reino Fungi – *Paracoccidioides*, revalidando o nome da espécie, criada por Splendore, de tal modo que, a partir daquela data estava “batizado”, de acordo com as regras estabelecidas por Linneu, o agente etiológico desta nova micose (Almeida, 1930).

A denominação paracoccidioidomicose foi consagrada em 1971, em Medellin (Colômbia), após reunião de micólogos das Américas. Até então diversos outros termos foram utilizados para descrever esta doença, tais como: blastomicose sul-americana, doença de Lutz-Splendore-Almeida, granulomatose paracoccidióidica, granuloma paracoccidióidico, granulomatose blastomicóide tropical e granuloma ganglionar maligno de origem blastomicótica (Lacaz, 1991).

1.2- O Agente etiológico

Paracoccidioides brasiliensis (Pb) agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), é um fungo termo-dimórfico que cresce sob a forma micelial (M) a 17-28°C e leveduriforme (L) a 35-37°C (Patifio et al., 1984). A forma M caracteriza-se microscopicamente por hifas delgadas e septadas, apresentando clamidoconídias intercaladas ou terminais. Arthroconídias, aleurioconídias e arthroaleurioconídias foram demonstradas também nesta forma (Edwards et al., 1991; Samsonoff et al., 1991). Em animais experimentais, essas conídias são infectantes através da via respiratória (McEwen et al., 1987). A forma L caracteriza-se por células esféricas ou ovais de 2-30 µm de diâmetro, apresentando paredes espessas e birrefringentes, aparentemente duplas, e citoplasma contendo vacúolos de lipídeos. O diagnóstico histológico baseia-se no achado de estruturas fúngicas com formato de “roda de leme” que refletem células-mães em brotamento multipolar envolvidas por células-filhas periféricas (Restrepo, 1978).

Acredita-se que a temperatura seja o principal fator a interferir na conversão micélio-levedura, embora o mecanismo através do qual isso ocorra seja desconhecido (San-Blas et al., 1992). Kanetsuna et al. (1969) demonstraram que α -1,3-glucanas compõem predominantemente a parede celular da forma L enquanto as β -1,3-glucanas compõem a da forma M. À medida que a temperatura se eleva de 22 a 37°C, a síntese de β -1,3-glucanas é interrompida e a de α -1,3-glucanas iniciada, evidenciando que o fator temperatura condiciona a transição molecular da parede celular e é fundamental para a conversão morfológica. A

presença de β -1,3-glucanas nas leveduras, α -1,3, e 1,6-glucanas no micélio, e quitina em ambas as formas foi confirmada (San-Blas et al. 1987). A quitina e as glucanas podem ter um grande potencial como alvo de drogas, uma vez que o hospedeiro mamífero não possui essas substâncias.

O habitat da forma micelial de *P. brasiliensis* é ainda desconhecido, devido à dificuldade de se isolar o fungo na natureza. Acredita-se que, em sua forma micelial, ele tenha vida saprofitica, habitando solos e detritos vegetais onde produz esporos infectantes (Neves, 1983; Souto et al., 2000). Novas oportunidades para o estudo e interpretação da ecologia do fungo têm emergido com o uso integrado de dados e informações de tatus infectados naturalmente, além das técnicas moleculares que permitem a detecção do fungo no solo, da estatística espacial e do geoprocessamento (Bagagli & Simões, 2005). Estudos ecoepidemiológicos do *P. brasiliensis* revelaram uma correlação entre área de solos argilosos cultivados anualmente e precipitação média anual de 1400 mm e concluíram que o fungo parece preferir áreas que mantêm condições de umidade a maior parte do tempo (Bagagli & Simões, 2005).

Esse fungo foi isolado de tecidos de fígado, baço e pulmão de tatus *Dasypus novemcinctus* capturados numa região de densa floresta tropical úmida no estado do Pará (Naiff et al., 1986). Estes isolados apresentaram virulência em modelo experimental de PCM (hamster) e produziram um quadro clínico similar aos obtidos com isolados de humanos (Peraçoli et al., 1999). Bagagli et al. (1998) relataram elevada incidência de PCM em tatus da espécie citada anteriormente capturados na área endêmica de Botucatu, São Paulo. O fungo também foi demonstrado em pulmões de *D. novemcinctus* em Ibiá, Minas Gerais, e em amostras de solo desta região (Vergara & Martinez, 1999). Estes dados

evidenciam que tatus desta espécie são reservatórios naturais e hospedeiros silvestres do *P. brasiliensis*.

Borelli (1963) criou o termo *reservárea* para indicar o local exato onde o *P. brasiliensis* vive e no qual o paciente adquire a infecção, pois devido ao longo período de latência da PCM, o local onde esta doença é diagnosticada não corresponde, necessariamente, à região onde a infecção foi adquirida. Quatorze reserváreas foram determinadas no Brasil, baseando-se no histórico residencial e ocupacional de pacientes (Restrepo et al., 2001). Estas reserváreas localizam-se nos estados do Pará, Rondônia, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná. Estas são caracterizadas por um clima tropical ou subtropical e apresentam verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos.

O *P. brasiliensis* infecta pessoas de todas as idades e ambos os sexos, porém nota-se na doença uma taxa de infecção de 78 homens:1 mulher, mostrando a existência de uma via preferencial de infecção pelo fungo ligada ao sexo (Restrepo et al., 1997). Essa baixa incidência da doença nas mulheres pode ser explicada pela presença do hormônio estrógeno, o qual inibe a transformação do fungo da forma micelial para a forma leveduriforme através de alterações na síntese protéica (Aristizabal et al., 1998).

1.3- Aspectos gerais da PCM

Uma das características mais marcantes da PCM é a sua distribuição geográfica, restrita à América Latina, do México [23° N] à Argentina [34° S], onde se distribui de forma heterogênea, não havendo relatos de ocorrência na Belize, Nicarágua, Guiana, Guiana Francesa, Suriname e Chile. Estima-se que, aproximadamente, 10 de 90 milhões de habitantes da área endêmica foram infectados pelo *P. brasiliensis* (Restrepo et al., 2001). Atualmente, o Brasil é o país

de maior endemicidade e responde por 80% dos casos relatados, configurando-se a oitava endemia mais frequente neste país. No Brasil, essa doença ocorre nas regiões centro-oeste, sudeste, sul e, recentemente, foi relatada nos estados de Pará e de Rondônia (Fig. 1) (Restrepo-Moreno, 1993; Bialek et al., 2000; Da Silva et al., 2000). Dentre os estados brasileiros, Minas Gerais destaca-se como área endêmica de elevada incidência, precedida por São Paulo e Rio de Janeiro (Fava & Fava, 1998).



Figura 1: Mapa da distribuição global da PCM

(Fonte: http://www.pfdb.net/photo/makimura_k/box0/photolist.php)

As áreas endêmicas situam-se em regiões de florestas tropicais ou subtropicais com temperaturas médias entre 14 e 20°C, precipitações

pluviométricas entre 800 e 2.000 mm e umidade relativamente alta (Hamdan & Rocha, 1987).

A PCM é adquirida pela inalação de esporos e não é transmitida de pessoa a pessoa, pois à temperatura corporal o fungo está na forma leveduriforme (Restrepo-Moreno, 1993; Da Silva et al., 2000; Souto et al., 2000). No hospedeiro, os esporos transformam-se em leveduras e passam a multiplicar-se por brotamento múltiplo. O fungo na sua forma de levedura pode ser eliminado por células do sistema imune ou disseminar-se para os tecidos por vias linfáticas e, principalmente, hematogênicas, ocasionando a doença que pode progredir até a morte. O sítio de infecção primária da PCM, o qual às vezes não é aparente, é o pulmão. Depois de instalado, o *P. brasiliensis* causa uma benigna e transiente infecção pulmonar ou oral em indivíduos normais. A infecção primária é quase sempre subclínica em indivíduos com o sistema imune normal. Se o hospedeiro torna-se imune depressivo, uma reativação tardia subsequente resulta em infecção crônica dos pulmões ou outros órgãos, especialmente o tecido mucoso e cutâneo, os linfonodos, as adrenais e o sistema nervoso central (Almeida, 2005).

A presença de febre é irregular e em geral pouco intensa. Seu surgimento pode ser decorrente de co-infecções bacterianas, tais como *Mycobacterium tuberculosis* ou outros microrganismos comuns. No pulmão o *P. brasiliensis* dá origem a manifestações clínicas de maneira muito insidiosa, compreendendo tosse seca, posteriormente produtiva, e dispnéia aos esforços. As lesões da mucosa oral resultam de disseminação hematogênica a partir de um foco primário pulmonar. Na boca, nota-se uma estomatite moriforme, geralmente acompanhada por um conjunto de sinais e sintomas que incluem sialorréia, sangramento, abaulamento

dentário e dor. Lesões de palato mole e faringe causam odinofagia que levam ao emagrecimento e à piora do estado geral do paciente. O acometimento da laringe e das cordas vocais ocasiona diversos graus de disfonia, ou mesmo afonia (Telles, 2005).

O diagnóstico da PCM pode ser obtido por processos laboratoriais através da visualização do fungo em material biológico, por meio de exame direto, cultura ou exame anátomopatológico de peça cirúrgica e por testes imunológicos do soro, como imunodifusão dupla ou ELISA com antígenos específicos. O desenvolvimento de técnicas micológicas para o diagnóstico da PCM tem progredido paralelamente com métodos de detecção de antígenos e anticorpos. Porém, o diagnóstico sorológico através da pesquisa de anticorpos específicos anti-Pb ainda tem valor limitado, e é usado principalmente no seguimento da resposta ao tratamento. A detecção da hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) também é usada no diagnóstico (Gomes et al., 2000). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada para detecção do DNA de *P. brasiliensis* em espécimes clínicas, usando oligonucleotídeos baseados na sequência do gene da glicoproteína de 43,000-Da (gp 43) (Gomes et al., 2000).

A PCM é uma micose de importante impacto sócio-econômico porque afeta homens durante a sua fase produtiva (Del Negro et al., 2000). Indivíduos que exercem atividades agrícolas constituem a maioria dos pacientes com a micose ativa, mas a infecção que era praticamente rural vem atingindo zonas urbanas, atacando todas as profissões, mesmo em indivíduos que nunca saíram dos grandes centros (Lacaz, 1991).

1.4- Formas clínicas da PCM

A PCM apresenta-se sob duas formas clínicas diferentes, a infecção e a doença. A PCM infecção é assintomática e ocorre frequentemente em indivíduos saudáveis que residem (ou residiram) em áreas endêmicas e que possuem reatividade ao teste de pele com paracoccidina (Restrepo-Moreno, 1993). Também são incluídos nesta forma clínica os indivíduos com lesões residuais inativas que contém *P. brasiliensis*.

A PCM doença é sintomática e, dependendo do seu curso, se divide em dois grupos: aguda ou crônica:

A. PCM aguda ou subaguda (juvenil)

A forma aguda ou subaguda (juvenil) representa cerca de 3 a 5% dos casos e se caracteriza por pequenos períodos de incubação do fungo (semanas a meses), é mais severa, com rápida disseminação para órgãos do sistema retículo-endotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea) apresentando múltiplas lesões (multifocal). Ocorre em crianças e adultos jovens de ambos os sexos. Os pacientes em geral apresentam depressão da resposta imune celular e aumento na produção de anticorpos específicos. Os achados histopatológicos demonstram a presença de processo inflamatório inespecífico, com granulomas pouco organizados contendo numerosos fungos (Franco et al., 1987; Restrepo-Moreno, 1993).

B. PCM crônica (do adulto)

A forma crônica (do adulto), com cerca de 90% dos casos, apresenta um curso lento (meses a anos) e ocorre com maior frequência em pacientes do sexo masculino com idade superior a 30 anos. Afeta, primeiramente, os pulmões (unifocal), levando a significativa morbidade. Posteriormente, a doença pode disseminar para outros órgãos e tecidos (multifocal), formando lesões secundárias nas membranas mucosas, pele, linfonodos e glândulas adrenais (Franco et al., 1987).

1.5- Tratamento

O tratamento da PCM é geralmente prolongado, com muitos pacientes recebendo terapia entre 1 e 2 anos, com efeitos colaterais indesejáveis e custos elevados (Visbal et al., 2005). Vários tipos de terapias podem ser usados com sucesso relativo. Muitos agentes anti-fúngicos utilizados no tratamento da PCM são fungistáticos e não fungicidas, conseqüentemente, para uma resposta efetiva ocorrer, o sistema imune do paciente deve cooperar (Restrepo-Moreno, 1993). Ocasionalmente linhagens resistentes do fungo têm sido reportadas. Assim, a busca por drogas antifúngicas mais seletivas e eficientes para o tratamento continua (Visbal et al., 2005). Existem várias categorias de drogas que podem ser usadas para o tratamento da PCM, como descrito a seguir:

A. Sulfonamidas

A PCM é a única micose tratada por sulfonamidas. Essas drogas foram introduzidas no tratamento à micose em 1940 (Ribeiro,1940) e ainda são utilizadas

devido à algumas de suas vantagens, tais como: facilidade para administração oral, baixo custo e baixos níveis de toxicidade, porém o período requerido de tratamento é longo (acima de 3 anos) e a taxa de recidiva é significativa (25%). Às vezes a recidiva é acompanhada por resistência induzida do fungo (Restrepo-Moreno, 1993). As sulfonamidas podem ser usadas em pacientes de ambulatórios com doença média à moderada. Podem ser também empregadas como terapia de manutenção (Restrepo-Moreno, 1993).

B. Anfotericina B

Introduzida em 1958, a anfotericina B é mais eficiente do que as sulfonamidas no tratamento da PCM e, desde então, tornou-se a principal ferramenta para o tratamento de pacientes com a doença severa disseminada. Infelizmente, seus efeitos colaterais, administração intravenosa (tratamento hospitalar) e alto custo dificultam a sua utilização. A duração do tratamento depende do “*status*” do paciente, severidade do processo micótico e tolerância. Não tem sido reportada resistência adquirida do *P. brasiliensis* à anfotericina B, porém casos de recidiva são comuns, em torno de 15% (Restrepo-Moreno, 1993).

C. Derivados do Imidazol

Novas drogas de administração oral efetivas no tratamento da PCM foram implantadas a partir de 1978. O cetoconazol foi o primeiro azol a ser empregado, onde mais de 90% dos pacientes responderam a sua administração por 12 meses ou menos. Lesões mais externas são curadas dentro de 3 a 6 meses e lesões do pulmão desaparecem lentamente, mas o desenvolvimento de fibroses permanece.

Aproximadamente 5% dos pacientes não respondem ao medicamento e a taxa de recidiva é menor (9-11%) do que a das outras terapias. Poucos efeitos colaterais são observados ocorrendo distúrbios gastrointestinal e endócrino. O único requerimento para a terapia de cetoconazol é um pH gástrico ácido. O itraconazol e fluconazol também são usados no tratamento da PCM (Restrepo-Moreno, 1993).

Esses dados indicam que existe um número considerável de opções de terapia que são utilizadas para o tratamento da PCM. Por outro lado, triagens controladas devem ser realizadas. Na primeira fase do tratamento (tratamento inicial), os pacientes devem ser submetidos mensalmente a uma avaliação radiológica, sorológica, bioquímica, hematológica e clínica. Esta fase termina quando a cura clínica e a taxa de sedimentação normal de eritrócitos são observadas. Na segunda fase (tratamento suplementar), os pacientes devem ser clínica, sorológica e radiologicamente avaliados a cada três meses. Porém, não existe ainda um consenso sobre a linha de tratamento e critérios usados para determiná-lo (Mendes, 2005).

Além da terapêutica antifúngica específica, o paciente com PCM necessita de medidas gerais que melhorem o estado de desnutrição protéico-calórica e a imunodepressão celular, geralmente associadas à infecção pelo *P. brasiliensis*. Estes achados são frequentemente agravados pela concomitância do tabagismo, etilismo, insuficiência adrenal e outras infecções associadas, sendo que essas características são comumente observadas entre os pacientes. Deste modo, o repouso, a dieta hiperprotéica e hipercalórica, associada à suplementação vitamínica são fatores importantes para a obtenção dos critérios de cura, assim

como a restrição do álcool, do tabaco e de infecções associadas como enteroparasitoses e co-infecções bacterianas respiratórias (Telles, 2005).

*1.6- Fatores de virulência de *P. brasiliensis**

Candidatos a fatores de virulência do *P. brasiliensis* incluem efeitos hormonais, componentes da parede celular, ligação à laminina e oxigênio.

O mecanismo para entender a grande incidência da PCM em homens parece envolver a regulação hormonal (Restrepo et al., 1997), uma vez que o tratamento de *P. brasiliensis* com hormônios femininos como o estrógeno bloqueia a transformação de micélio para levedura, provavelmente via proteínas citosólicas que se ligam a esteróides (Restrepo et al., 1984; Hogan et al., 1996).

O papel dos constituintes da parede celular α -1,3-glucana e β -1,3-glucana na regulação da transição dimórfica em *P. brasiliensis* tem sido estudado por muitos anos (Hogan et al., 1996). As células de levedura contêm quase que exclusivamente α -1,3-glucana e a forma micelial apresenta um conteúdo maior de β -1,3-glucana (San-blas et al., 1987; Silva et al., 1994; Hogan et al., 1996). O componente de parede β -1,3-glucana mostrou-se alvo de respostas inflamatórias das células dos pulmões e relaciona-se com linhagens avirulentas de *P. brasiliensis* que produzem uma resposta inflamatória maior do que linhagens virulentas. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos realizados com *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis*, nos quais correlacionou-se menor quantidade de α -1,3-glucanas na parede celular à menor virulência (Hogan,

1994). Uma interessante questão é se o *P. brasiliensis* usa a mudança para α -1,3-glucana para evitar a estimulação da resposta inflamatória

A gp43, uma glicoproteína de superfície celular, é uma forte candidata a fator de virulência. A aderência de *P. brasiliensis* às células epiteliais do hospedeiro é reduzida na presença de soro anti-gp43, indicando que essa glicoproteína age como uma adesina. Tem sido mostrado que a gp43 liga-se à laminina da membrana basal da matriz extracelular (ECM) de tecidos de mamíferos e, quando a levedura está coberta pela laminina ela aumenta a habilidade de invadir e destruir o tecido infectado. Assim, a gp43 na superfície de células de leveduras age como um receptor para laminina (Vicentini, et al., 1994). Além disso, o *P. brasiliensis* produz uma serino-tiol protease extracelular que pode clivar a lamina e outros componentes da ECM; porém a gp43 é resistente a clivagem por esta protease (Puccia et al., 1998). Em adição, outros componentes da ECM, como as fibronectinas e colágenos, têm mostrado agir como alvos para adesão do *P. brasiliensis* (Mendes-Giannini et al., 2000).

A capacidade de sobreviver e replicar-se a 37° C parece ser uma propriedade comum entre os fungos patogênicos. Este fenômeno conhecido como termo-tolerância está correlacionado com a síntese de proteínas “heat-shock”, já descritas em *P. brasiliensis*. A produção destas proteínas parece exercer um importante papel não só na termo-adaptação, mas também na transição de micélio para levedura (Goldani et al., 1994).

As fases de levedura e micélio requerem uma quantidade significativa oxigênio para crescimento. Por outro lado, as células jovens de leveduras podem se adaptar gradualmente à redução de oxigênio e entrar em estágio de repouso.

Células em repouso podem reativar-se metabolicamente quando colocadas em condições adequadas de oxigenação. Esta capacidade pode explicar a latência prolongada dessa micose (Restrepo et al., 1981).

1.7- Resposta Imunológica do hospedeiro

Na PCM, a imunidade inata e específica são mecanismos utilizados pelo hospedeiro no combate ao *P. brasiliensis*, sendo que a imunidade celular é a principal defesa contra o fungo (Cano et al., 1998; Souto et al., 2000; Diniz et al., 2004; Bozzi et al., 2004; Bozzi et al., 2006).

1.7.1- Imunidade Inata

Na imunidade inata, os fagócitos têm importante papel na defesa dos hospedeiros, uma vez que *P. brasiliensis* é um microorganismo intracelular facultativo (Restrepo-Moreno, 1993; Calvi et al., 2003). Tem sido demonstrado que esse fungo é fagocitado por macrófagos que apresentam efeitos fungicidas para o mesmo sendo necessários para sua eliminação (Popi et al., 2002). Em células humanas, macrófagos tratados com IFN- γ recombinante ou com citocinas de sobrenadante de células mononucleares estimuladas com concanavalina A restringiram a replicação do fungo, mas perderam a atividade fungicida (Calvi et al., 2003). Para uma eliminação efetiva do fungo por monócitos, é necessário um sinal de ativação inicial induzido pelo IFN- γ para estimular as células a produzirem TNF- α que poderá estar envolvido, através de uma via autócrina, na fase final do processo de ativação (Calvi et al., 2003). Além disso, o IFN- γ ativa os macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO), o qual inibe a transformação de *P. brasiliensis* de

conídia para levedura (Gonzalez et al., 2000). Popi e colaboradores (2002) demonstraram que a gp43 inibe a fagocitose do microrganismo por macrófagos peritoneais de camundongos não ativados e inibe a ativação e habilidade dos macrófagos em matarem o fungo.

Os neutrófilos são encontrados em grande quantidade nos granulomas de *P. brasiliensis* e por isso o papel dessas células no desenvolvimento da infecção tem sido avaliado. A ingestão de células de leveduras pelos neutrófilos através de um processo típico de fagocitose com formação de pseudópodos foi mostrada por microscopia eletrônica. Os pseudópodos rompem a conexão estabelecida entre as células mãe e filha. Os neutrófilos também se associam uns aos outros formando um tipo de vacúolo onde muitas células de leveduras são encapsuladas. Essas células contribuem para a morte do fungo ingerido ou extracelular através da liberação de produtos derivados de oxigênio e da degranulação após a ligação do *P. brasiliensis* em sua superfície (Dias et al., 2005).

Kurita e colaboradores (2005) avaliaram a atividade antifúngica dos leucócitos humanos sobre as células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Os leucócitos mataram efetivamente as células leveduriformes nas primeiras 4h. A adição de IFN- γ , fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago, IL-1 β ou IL-4 aumentou a atividade antifúngica dos leucócitos por 48h. Em contraste, a adição de IL-8 diminuiu a atividade dos leucócitos e as citocinas TNF- α ou IL-10 não tiveram efeito na morte do fungo pelos leucócitos. Essa foi a primeira demonstração de que os leucócitos humanos também contribuem para a morte de células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

A ativação do complemento pelo *P. brasiliensis* foi confirmada por vários estudos (Calich et al., 1979; Munk et al., 1992; De Messias & Mohren, 1994; Crott et al., 1997). Ambas as vias, clássica e alternativa são ativadas em pacientes como resposta ao fungo (Speth et al., 2004).

As células natural killer (NK) também participam inibindo o crescimento da levedura (Jimenez & Murphy, 1984; Restrepo-Moreno, 1993). Entretanto, a atividade citotóxica dessas células é mais baixa em pacientes com PCM do que em indivíduos normais (Peraçoli et al., 2003). Conseqüentemente, sua participação na resistência deve ser inadequada e a diminuição de sua atividade citotóxica pode representar um mecanismo de escape do fungo.

1.7.2- Imunidade Específica

A)- Imunidade Humoral

Apesar da resposta imune humoral aparentemente não ter um papel central na defesa da PCM, tanto pacientes com PCM quanto animais infectados com *P. brasiliensis* produzem grandes quantidades de anticorpos. Os anticorpos são potentes opsonizadores e, em conjunto com o sistema do complemento, promovem a morte do fungo.

Todas as classes de imunoglobulinas são detectadas em pacientes com predomínio da classe IgG. A análise do soro de pacientes com PCM não tratada demonstrou que o nível de IgG é maior na doença disseminada, aguda e progressiva (Reis et al., 2005). Nas formas crônicas localizadas o nível de IgG não é significativamente elevado (Baida et al., 1999). Isto favorece o uso desses anticorpos no diagnóstico da PCM. Em contraste, o nível de IgM é normal em

todos os pacientes, mas o nível de IgA é elevado, principalmente na forma crônica, provavelmente como resultado do envolvimento do trato respiratório e membranas mucosas (Baida et al., 1999). Um aumento da produção de IgE foi detectado em casos ativos, estando relacionados com a severidade da doença (Restrepo-Moreno, 1993).

Após o tratamento, a melhora clínica geralmente esteve associada à diminuição do título de IgG reconhecendo antígenos fúngicos (Restrepo-Moreno, 1993; Reis et al., 2005). Entretanto, a conversão para reação de anticorpos negativa não necessariamente indica cura da doença e não deve ser interpretada como um sinal para interrupção do tratamento (Ferreira-da-Cruz et al., 1990). Os níveis de anticorpos voltam a aumentar em pacientes que tiveram recidiva, provavelmente devido ao aumento da liberação extracelular de antígenos fúngicos (Mendes-Giannini et al., 1994). Assim, os títulos de imunoglobulinas anti-Pb estão diretamente relacionados à severidade das manifestações clínicas da doença; quanto mais severa é a forma da doença, mais alto é o título de anticorpos (Camargo & Cano, 1994).

B)- Imunidade Celular

A principal defesa do hospedeiro contra *P. brasiliensis* é a mediada por células, sendo que os pacientes com PCM apresentam uma depressão da imunidade celular. A taxa de células T CD4⁺ e CD8⁺ na PCM têm sido avaliadas, e baixas taxas dessas células foram associadas com a diminuição da imunidade celular (Bozzi et al., 2004). A forma aguda da doença foi associada com uma taxa reduzida de células T CD4/CD8, enquanto que na forma crônica essa redução não

foi tão evidente (Bozzi et al., 2004). Estudos em camundongos infectados com *P. brasiliensis* mostraram que células T CD8⁺ são necessárias para o “clearance” eficiente de fungos nos tecidos (Cano et al., 2000).

A participação de citocinas na PCM é amplamente discutida. Indivíduos sensibilizados pelo fungo apresentaram níveis substanciais de IFN- γ , IL-2 e IL-10, frente à gp43 (principal antígeno extracelular do Pb), refletindo uma resposta imune bem balanceada. Porém, pacientes com PCM produziram baixos níveis de IL-2, IFN- γ e TNF- α , mas somas substanciais de IL-10. Além disso, os níveis de IFN- γ eram recuperados nos pacientes com PCM após o tratamento (Bava et al., 1991). Oliveira e colaboradores (2002) mostraram que as formas de alta e baixa resistência da PCM humana são compatíveis com citocinas Th1 e Th2, respectivamente. Bozzi e colaboradores (2004) demonstraram uma alta secreção de IL-4 por células de pacientes com PCM sem tratamento e uma alta secreção de IFN- γ por células de pacientes com PCM em tratamento a mais de um ano.

Variantes alélicas de genes de citocinas parecem estar envolvidos em mecanismos de resistência ou susceptibilidade a várias doenças. Bozzi e colaboradores em 2006 estudaram polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) para as citocinas IL-10 e TNF- α em pacientes com paracoccidiodomicose e apontaram para a possibilidade de futuramente ser possível prever um grupo de risco para PCM quando mais SNP forem estudados nas mesmas e em outras citocinas.

Diversos estudos demonstraram a participação do IFN- γ e TNF- α na resistência e sobrevivência de camundongos infectados com *P. brasiliensis* (Cano

et al., 1998; Calich & Kashino, 1998; Gonzalez et al., 2000; Souto et al., 2000; Diniz et al., 2001; Diniz et al., 2004). Linfócitos de camundongos susceptíveis a PCM secretaram baixos níveis de IFN- γ concomitante com níveis significativos de IL-5 e IL-10 logo no início da infecção. Na fase crônica da doença, os camundongos susceptíveis apresentaram uma secreção transitória de IL-2 e IL-4. Na infecção pulmonar, IL-4, IL-5 e IL-10 foram preferencialmente detectados nos lavados de células pulmonares de camundongos susceptíveis. A depleção *in vivo* de IFN- γ não só anula a resistência de camundongos resistentes como também diminui a resistência relativa de camundongos susceptíveis. A depleção *in vivo* de IL-4 não altera o desenvolvimento da doença (Calich & Kashino, 1998). Susceptibilidade ou resistência parece ser uma função de um complexo e sutil balanço de citocinas, onde ambos os grupos Th1 e Th2 são produzidos (Diniz et al., 2001).

1.7.3- Reação Granulomatosa

A reação granulomatosa na PCM é uma resposta imunológica específica à infecção por *P. brasiliensis*. Esta resposta é um processo dinâmico, no qual a população de células infiltradas no local varia com o decorrer da infecção. O estabelecimento de modelos experimentais *in vivo* possibilitou a identificação de linfócitos, macrófagos, células gigantes e epitelióides, células NK e neutrófilos como as principais células participantes da resposta granulomatosa (Brito & Franco, 1994).

Esse processo tem início quando antígenos do fungo são capturados e processados por células apresentadoras de antígenos que incluem células

dendríticas e macrófagos. Posteriormente, os antígenos associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) são apresentados a linfócitos T-auxiliares (TH) que ao reconhecê-los tornam-se ativados. A ativação leva à expansão clonal, secreção de citocinas e recrutamento de leucócitos adicionais (Brito & Franco, 1994). As células recrutadas acumulam-se em torno das células leveduriformes, dando origem ao granuloma propriamente dito, constituído por células epitelióides e gigantes. A destruição local de tecido é seguida por fibrose, um processo de cicatrização no qual fibroblastos deslocam-se por quimiotaxia para o local da lesão e produzem o colágeno que constituirá a cicatriz (Brito & Franco, 1994).

Linfócitos T e macrófagos ativados no foco inflamatório desempenham um papel importante no desenvolvimento do granuloma e na produção de mediadores inflamatórios que ativam mecanismos de defesa do hospedeiro contra o fungo. A reação granulomatosa é considerada um mecanismo necessário para conter a multiplicação e os efeitos tóxicos de componentes derivados de células leveduriformes sobre células vizinhas, delimitando assim a patologia da infecção (Brito & Franco, 1994).

Em pacientes que apresentam a forma menos severa da PCM, a resposta imune do hospedeiro induz granulomas compactos e densos que são associados com baixos números de células fúngicas. Por outro lado, pacientes com a doença severa frequentemente desenvolvem granulomas frouxos associados com altos números de células de leveduras viáveis. Além disso, Franco e colaboradores (1997) avaliando a formação de granulomas *in vitro* por PBMC de pacientes de diferentes formas clínicas observaram a ausência de reação granulomatosa nos

pacientes agudos não tratados. Em 2001, Diniz e colaboradores mostraram que componentes antigênicos de *P. brasiliensis* participam na formação de granulomas na PCM. A fração F0 do antígeno somático do fungo (PbAg) levou à uma diminuição da formação de granulomas, enquanto as frações FII e FIII aumentaram consideravelmente a reação granulomatosa. A maioria dos linfócitos presentes no granuloma são do tipo T- auxiliares (CD4⁺), com poucas células T citotóxicas (CD8⁺), sugerindo um maior envolvimento das primeiras na patogênese das lesões e no controle da doença (Moscardi-Bacchi et al., 1989).

1.8- Antígenos de P. brasiliensis

O *P. brasiliensis* sintetiza numerosos antígenos que interagem com o sistema imune (Yarzabal, 1982). Vários pesquisadores têm estudado preparações antigênicas do filtrado de cultura do fungo (exoantígenos) ou das células lisadas (preparações somáticas) (Burgos et al., 1985; Casotto et al., 1990; Diniz et al., 2001). Os antígenos extracelulares (exoantígenos) fazem o primeiro contato com as células do hospedeiro e, portanto, desempenham um papel fundamental no processo infeccioso da PCM. Os exoantígenos podem promover efeitos estimulatórios ou supressores, dependendo da interação com as células hospedeiras ou de como são processados pelas células apresentadoras de antígenos (Franco et al., 1993). Os antígenos somáticos têm sido estudados em busca de melhorar não só o conhecimento químico dessas moléculas, mas também caracterizar a reatividade imunológica induzida por eles em pacientes com PCM.

Com o objetivo de identificar componentes antigênicos relevantes na resposta imune do hospedeiro à infecção, Diniz *et al.* (1999) fracionaram o PbAg por cromatografia de troca aniônica e obtiveram sete frações multiprotéicas (frações 0, I, II, III, IV, V e VI). Estes autores demonstraram que camundongos imunizados com as frações F0, FII ou FIII apresentaram padrões específicos de resposta imune evidenciados pela reação de granuloma *in vitro* e *in vivo*, produção de óxido nítrico (NO) e de citocinas *in vitro*, e proteção contra a infecção desafio pela via intratraqueal com células fúngicas (Diniz *et al.*, 2001). Observou-se que células de baço de camundongos imunizados e, posteriormente, estimulados com a F0 produziram níveis elevados de INF- γ que, em consequência, induziram a síntese de NO e de imunoglobulinas das subclasses IgG2a e IgG3 (Diniz *et al.*, 2001). A produção de NO foi correlacionada à atividade fungicida de macrófagos murinos em PCM experimental (Bocca *et al.*, 1998) e a produção de imunoglobulinas dessas subclasses foi correlacionada à resistência de camundongos A/Sn infectados pela via intraperitoneal ou intratraqueal com *P. brasiliensis* (Cano *et al.*, 1995; Calich & Kashino, 1998). Análises histológicas de tecidos de camundongos desafiados com *P. brasiliensis* mostraram que a infecção foi confinada ao pulmão, no qual observou-se pequenas lesões bem delimitadas e granulomas epitelióides e densos contendo poucos fungos. Estes resultados indicam que a ativação inicial de mecanismos fungicidas de macrófagos com produção de níveis elevados de NO e imunoglobulinas IgG2a e IgG3, induzidos por INF- γ e IL-2, determinam uma resposta imune protetora em camundongos imunizados com a F0 (Diniz *et al.*, 2001). O contrário foi observado em

camundongos imunizados com a fração FIII, nos quais a infecção disseminou-se para outros órgãos. Apesar de terem produzido IFN- γ , inicialmente, a produção de níveis elevados de IL-10 e TGF- β , citocinas associadas à susceptibilidade do hospedeiro à infecção (Calich & Kashino, 1998), pode ter favorecido a disseminação da doença através da inibição da produção de NO. De fato, camundongos imunizados com a fração FIII apresentaram doença progressiva e disseminada com numerosas células fúngicas em lesões. O quadro anátomo-patológico observado nestes camundongos sugere que componentes antigênicos da fração FIII estejam envolvidas na progressão e disseminação do *P. brasiliensis* (Diniz et al., 2001).

Células de baço de camundongos imunizados e, posteriormente, estimulados com a fração FII também produziram imunoglobulinas IgG2a e IgG3. Além destas subclasses, imunoglobulinas IgG1 foram produzidas em níveis elevados (Diniz et al., 2001).

1.9- Justificativa

Pesquisas anteriores em nosso laboratório mostraram que clones isolados de uma biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis* eram codificadores de uma proteína que apresentou homologia com a calcineurina B de *Neurospora crassa*, com 35% de identidade e 55% de similaridade, apresentando dois motivos “mão-EF” que ligam cálcio, do inglês “EF-hand calcium-binding domain”, (Goes, et al, 2005), essa proteína é constituinte da fração F0, produzida em nosso laboratório, que demonstrou, em estudos anteriores, ser capaz de controlar a infecção do fungo

em PCM experimental, reduzindo significativamente o número de unidades formadoras de colônia (CFUs) no baço e no fígado, após 3 meses de infecção (Diniz et al, 2004).

O cálcio está entre os metais mais importantes para a vida: ele controla processos vitais, desde a mineralização óssea à sinalização celular, interagindo com um número muito grande de proteínas. Porém, a variedade de configurações de sítios de ligação ao cálcio é limitada, sendo que, dentre elas a mais comum é o motivo “mão-EF” (Lewit-Bentley & Réty, 2000).

O nome “EF-HAND” foi criado por Kretsinger e Nockolds a mais de 30 anos atrás como uma descrição gráfica do motivo de ligação ao cálcio observado na parvalbumina. (Kretsinger & Nockolds, 1973). Esse motivo é muito difundido, encontrando-se em um grande número de famílias de proteínas, sendo que mais de 66 famílias já são conhecidas. Na grande maioria das proteínas, que já foram suficientemente estudadas, o motivo liga-se ao cálcio ou, em alguns casos, ao magnésio (Lewit-Bentley & Réty, 2000).

O motivo “mão-EF” clássico consiste em uma alça de 12 resíduos, cujo padrão consenso é D-x-[DNS]-{ILVFYW}-[DENSTG]-[DNQGHRK]-{GP}-[LIVMC]-[DENQSTAGC]-X(2)-[DE]-[LIVMFYW], flanqueada em ambos os lados por uma alfa-hélice de 12 resíduos. Os resíduos da alça nas posições 1, 3, 5, 7, 9 e 12, denominados de X, Y, Z, -Y, -X e -Z respectivamente, fornecem ligantes para complexar o íon Ca^{+2} , sendo que os das posições 1, 3 e 12 são os mais conservados. A maioria das proteínas com o motivo mão-EF possui entre dois e oito estruturas hélice-alça-hélice organizados em domínios pares, pois este pareamento incrementa a afinidade pelo Ca^{+2} (Lewit-Bentley & Réty, 2000).

As funções das proteínas que contém esse motivo são muito diversas, tais como: tamponamento citosólico pelo cálcio, transdução de sinal entre compartimentos celulares e contração muscular (Lewit-Bentley & Réty, 2000).

A calcineurina é um heterodímero composto por uma subunidade A catalítica e por uma subunidade B regulatória responsável pela ligação ao cálcio, sendo a ligação destas duas subunidades essencial para a sua atividade (Watanabe et al., 1996; Kraus & Heitman 2003). Foi demonstrado que a calcineurina é requerida para a virulência de *Candida albicans* e que mutantes deficientes da calcineurina B são marcadamente mais sensíveis a anti fúngicos (Cruz et al., 2002; Sanglard et al., 2003).

A detecção de anticorpos contra componentes de *P. brasiliensis* para o diagnóstico da PCM tem sido utilizada desde 1916. Durante as décadas de 60-80 foram caracterizados constituintes antigênicos de preparações diversas para testes sorológicos, onde destacou-se a presença de uma banda específica para PCM, a gp 43 (Cisalpino et al., 1996). Esta proteína é reconhecida por 100 % dos soros de pacientes com PCM. Entretanto, os testes sorológicos realizados com a mesma têm demonstrado algumas limitações, entre elas uma alta taxa de reatividade cruzada (Ortiz et al., 1998).

Ao longo dos anos, antígenos de *P. brasiliensis* derivados de filtrados de cultura ou das células leveduriformes lisadas têm sido utilizados em diagnósticos, na busca de um antígeno ideal, que seja fácil de preparar, possua uma longa vida útil, seja específico, reproduzível, sensível e confiável. Esse antígeno, porém ainda não foi encontrado (Brummer et al., 1993).

Na busca por esse antígeno, McEwen e colaboradores (1996) descreveram uma sequência nucleotídica que codifica uma proteína antigênica de peso molecular de aproximadamente 27kDa. Em 1998, Ortiz e colaboradores utilizaram essa proteína recombinante em ensaios de ELISA para detecção de anticorpos reativos a ela em soros de pacientes com PCM. O antígeno foi capaz de identificar a presença de anticorpos em 73,4% dos soros analisados. Cunha e colaboradores (2002) descreveram a reatividade de soros de pacientes com PCM frente a uma proteína recombinante HSP60. Os ensaios de ELISA apresentaram sensibilidade de 97,3% e especificidade de 92,5%. Díez e colaboradores (2003) utilizaram a mistura de duas proteínas recombinantes (27kDa e 87kDa) e observaram, em ensaios de ELISA, sensibilidade de 92% e especificidade de 88%. Recentemente, Reis e colaboradores (2005) utilizaram o antígeno MEXO e uma proteína purificada a partir desse antígeno e observaram em ensaios de ELISA, sensibilidade de 100% nos pacientes não tratados. Porém, essa sensibilidade foi muito menor em pacientes com PCM que estavam em tratamento. No entanto, até o momento, nenhuma dessas proteínas é utilizada no diagnóstico da PCM.

Pouco se sabe sobre a função das proteínas que possuem o motivo “mão-EF” em *P. brasiliensis*. Por serem descritas como proteínas importantes para a sobrevivência de outros organismos, inclusive outros fungos, além de ser a proteína descrita componente da F0, que já demonstrou ter um importante papel protetor contra a infecção por *P. brasiliensis*, a caracterização imunológica desta proteína poderá fornecer importantes informações para o desenvolvimento de vacinas e fármacos, assim como para o desenvolvimento de métodos de

imunodiagnóstico para essa infecção, o que poderia tornar o diagnóstico menos dispendioso, mais sensível e confiável.

II - OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral:

Estudar parâmetros imunológicos da proteína pb40r e sua importância no imunodiagnóstico da PCM.

2.2- Objetivos específicos:

- Clonar a proteína de aproximadamente 40 kDa de *P. brasiliensis* (pb40r) em sistema procarioto utilizando o vetor pGEX4T-3;
- Expressar as proteínas GST/pb40r e GST em bactérias *E. coli* BL21;
- Purificar as proteínas recombinantes GST e GST/pb40r;
- Clivar a proteína fusionada GST/pb40r;
- Imunizar camundongos com a proteína recombinante GST/ pb40r e com a GST;
- Avaliar a atividade humoral da pb40r, através da determinação dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2A;
- Avaliar a dinâmica de produção de imunoglobulinas reativas à pb40r em PCM experimental;
- Pesquisar a reatividade de soros de pacientes com PCM frente à pb40r.

III -METODOLOGIA

3.1- Microorganismo

A cepa de *P. brasiliensis* isolado virulento humano, Pb 18, foi cultivada em meio YPD Agar, à temperatura de 35°C, com repiques semanais.

O meio de cultura foi preparado utilizando-se 5 g/l de extrato de levedura, 5 g/l de peptona de carne, 15g/l de D glucose e 15 g/l de agar.

3.2- Amplificação da Sequência Gênica da Proteína de interesse

A sequência codificadora da proteína de 40 kDa de *P. brasiliensis* foi obtida a partir de um clone de bactérias XL0LR transformadas com o fagemídio pbluescript e pertencente à uma biblioteca de cDNA da forma leveduriforme do fungo. Após indução da expressão, os insertos clonados foram selecionados por anticorpos de pacientes com paracoccidiodomicose utilizando o método de ELISA (Goes et al., 2005). Os clones positivos foram cultivados em meio LB - ampicilina (1mg/ml) durante 16 horas à 37°C e os plasmídios foram extraídos pelo método de lise alcalina utilizando o Kit Mini-prep QIA prep Spin Miniprep Kit - 150 (QIAGEN Inc. Valencia, C.A).

A amplificação do inserto foi realizada através de PCR. Foi preparada uma reação de 25 µL utilizando 20ng do plasmídeo pbluescript como DNA molde (0,25 pmol/ µl de cada iniciador, 0,4u de Taq DNA polimerase, 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 mmol/ µl de mistura dos 4 desoxinucleotídeos e 20 mM de Tris-HCl pH 8.4 e 50 mM de KCl) e submetida aos seguintes ciclos:

- 1- Ciclo inicial de desnaturação a 92°C durante 2 minutos;

2 - 6 ciclos de desnaturação a 92°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto;

3 – 25 ciclos de desnaturação a 92°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto;

4- Ciclo final de extensão a 72°C por 3 minutos

Os iniciadores utilizados para a amplificação foram:

Direto: 5´ CTT TCT AGA CCA ATT CGG CAC GAG CCA C 3´ e

Reverso: 5´ TAC CTC GAG ATG GAA AAT GCC TTT CTC GAT AA 3´

nos quais encontraram-se inseridos os sítios de restrição das enzimas Sal I, iniciador direto e NOT I iniciador reverso.

3.3 - Eletroforese em Gel de Agarose

Este método foi utilizado para isolar e visualizar fragmentos de DNA a partir da migração diferencial dos fragmentos de tamanhos diferentes no gel polimerizado que é submetido a uma voltagem elétrica específica. A visualização das bandas é possível devido à afinidade do brometo de etídio, que é fosforescente na radiação ultravioleta, pelo DNA.

O gel foi preparado diluindo-se a agarose na proporção de 1% em TAE 1X. A esta solução adicionou-se brometo de etídio (0,3 µg/ µl). Após a polimerização as amostras foram aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem constante de 60V. A visualização das bandas foi realizada utilizando-se radiação ultravioleta.

3.4 - Construção do Plasmídeo Recombinante pGEX4T-3/pb40r

O clone bacteriano contendo o vetor pGEX4T-3 foi cultivado a 37°C durante 16 horas em meio LB com ampicilina 100µg/ml. O precipitado bacteriano obtido, após 10 minutos de centrifugação a 4000 rpm, foi lisado com a utilização do Kit Mini-prep QIA prep Spin miniprep Kit-150 (QIAGEN Inc. Valencia, C.A). O plasmídeo obtido, pGEX4T-3 (figura 1), e o inserto da proteína de interesse amplificado foram digeridos a 37°C com as enzimas Sal I e Not I, durante 4 horas com agitação. O inserto de 1134 pb da proteína de interesse foi ligado ao plasmídeo pGEX4T-3. A reação de ligação foi realizada utilizando 10u da enzima DNA T4 ligase em 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP e 25 µg/ml de BSA durante 10 horas a 16°C.

3.5 - Sequenciamento do Fragmento Inserido no pGEX4T-3

Os sequenciamentos foram realizados pelo método didesoxiterminal (Sanger et al., 1977) no núcleo de Análise do Genoma e Expressão Gênica (NAGE/ICB/UFMG), com o auxílio do *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Aequencing Kit For MegaBACE DNA Analysis* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). Os dados da sequência do clone foram exportados e editados no programa *Chromas v2.13 Technesium Pty* (<http://www.technesium.com.au>). As sequências nucleotídica e protéica foram comparadas às sequências depositadas no banco de dados *Genbank* do NCBI utilizando-se os algoritmos BLASTn, BLASTx (Altschul et al., 1997) e CLUSTALW (Thompson et al., 1994), disponíveis na internet: <http://ncbi.nlm.nih.gov> e

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>. As pesquisas de homologia foram realizadas no 1º semestre de 2007.

A pesquisa de domínios estruturais ou funcionais foi realizada utilizando-se o banco de dados “Simple Modular Architecture Research Tool” (SMART) (Letunic et al., 2002), disponível na internet: <http://smart.embl-heidelberg.de>.

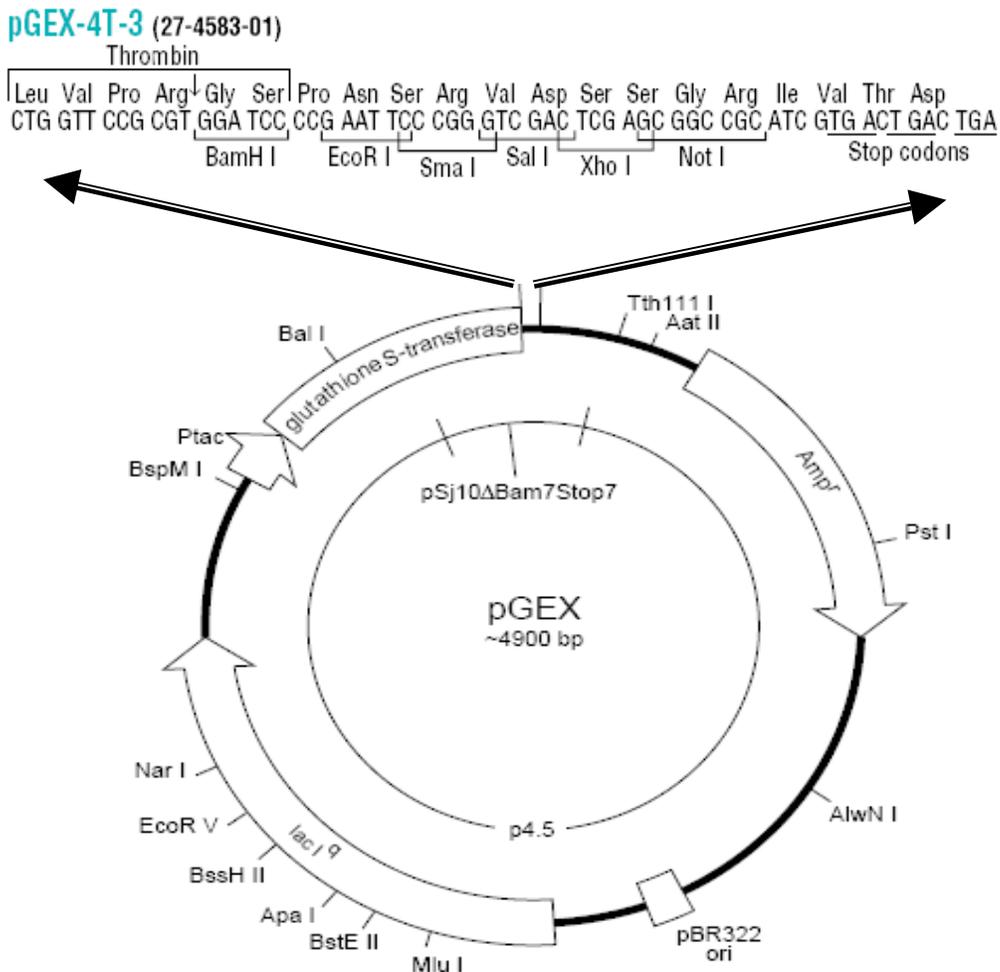


Figura 2: Plasmídio pGEX4T-3. Vetor utilizado para expressar a proteína de 40Kda (pb40r) da fração protetora F0 de *P. brasiliensis*.

3.6 - Transformação de Bactérias com o Plasmídeo Recombinante

Bactérias *E. coli* BL21 quimiocompetentes foram transformadas com o plasmídeo recombinante pelo método de choque térmico, no qual bactérias e plasmídeos recombinantes foram juntamente incubados 30 minutos no gelo, seguidos de 90 segundos a 42°C e novamente no gelo durante 30 minutos (Maniats et al., 1982). Posteriormente, a mistura foi plaqueada em meio seletivo LB/ágar com 100 µg/ml de ampicilina, durante 16 horas. Os clones obtidos foram analisados através do PCR de colônias utilizando-se os iniciadores do plasmídeo pGEX4T-3, seguido de ensaio eletroforético em gel de agarose para visualizar a presença do inserto. Os clones que continham o plasmídeo com o inserto foram selecionados e cultivados por 16 horas em meio LB/ampicilina líquido para a amplificação em pequena escala do mesmo. Novamente foi realizada a reação de PCR com os iniciadores da sequência de interesse. Foi feita a análise eletroforética desta reação para confirmar a presença do inserto.

3.7 – Mini-Expressão das Proteínas Recombinantes GST e GST/pb40r

Um clone de bactérias *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pGEX/pb40r ou o plasmídeo pGEX sem inserto foram selecionados e cultivados separadamente em 10ml de meio líquido LB/ ampicilina 100µg/ml, à 37° C sob agitação. Após 16 horas, a cultura foi diluída 1:100 em 20 ml de LB/ampicilina 100µg/ml sob agitação a 37°C. Ao atingir o D.O₆₀₀ = 0.5 foi adicionado 1 ml de IPTG 1mol/ml para induzir a expressão das proteínas recombinantes. Alíquotas de 1 ml foram coletadas

após 2 e 4 horas de indução, sendo posteriormente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes para a separação das proteínas e identificação das proteínas GST e GST/pb40r.

O restante da cultura contendo a expressão da GST/pb40r após 4 horas de indução foi centrifugado durante 10 minutos a 4.000 rpm, em centrífuga sorvall (Sorvall, super T21). O precipitado de bactérias foi lisado com 0,25% de lisozima em 1ml de PBS 0,15 M pH 8.4 e submetido a 4 ciclos de 20 segundos de sonicação (ultrasonic processor, Sigma). O extrato obtido foi centrifugado novamente em centrífuga sorvall (Sorvall, super T21) a 7000 rpm durante 20 minutos, sendo o sobrenadante e o sedimento obtidos submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes para verificar se a proteína de interesse, GST/pb40r, se encontrava no sedimento ou no sobrenadante.

3.8 - Expressão da Proteína Recombinante GST

Um clone de bactérias *E. coli* BL21, contendo o plasmídeo pGEX sem incerto foi selecionado e cultivado em 20mL de meio líquido LB/ampicilina 100µg/ml à 37° C sob agitação. Após 16 horas, a cultura foi diluída 1:100 em 1litro de LB/ampicilina 100µg/ml sob agitação a 37°C. Ao atingir o D.O₆₀₀ = 0.5 foi adicionado 1 ml de IPTG 1mol/ml para induzir a expressão da proteína recombinante. Após 4 horas o meio foi centrifugado durante 10 minutos a 4.000 rpm em centrífuga sorvall (Sorvall, super T21). O precipitado de bactérias foi lisado com 0,25% de lisozima em 100ml de PBS 0.15 M pH 8.4 e submetido a 4 ciclos de

20 segundos de sonicação (ultrasonic processor, Sigma). O extrato obtido foi novamente centrifugado em centrífuga sorvall (Sorvall, super T21) a 7000 rpm por 20 minutos. Sendo o sobrenadante obtido estocado para ser utilizado nos processos posteriores de purificação.

3.9 - Expressão da Proteína Recombinante GST/pb40r

Um clone de bactérias *E. coli* BL21 contendo o inserto da proteína de interesse foi selecionado e cultivado em 20ml de meio líquido LB/ampicilina 100µg/ml à 37° C sob agitação. Após 8 horas, a cultura foi diluída 1:100 em 1 litro de LB/ampicilina 100µg/ml sob agitação a 20°C. Ao atingir a D.O₆₀₀ = 0,9 foi adicionado 0,5 ml de IPTG 1mol/ml para induzir a expressão da proteína recombinante. Após 2 horas e 30 minutos o meio foi centrifugado durante 10 minutos a 4.000 rpm em centrífuga sorvall (Sorvall, super T21). O precipitado de bactérias foi lisado com 0,25% de lisozima em 100ml de PBS 0,15 M pH 8.4. As células induzidas com IPTG foram extensivamente sonicadas por 3 ciclos de 10 minutos a 4°C (Ultrasonic Cleaner, Unique), com idas ao vórtex nos intervalos, a partir daí o lisado celular foi centrifugado a 7.000 rpm por 10 minutos em centrífuga sorvall (Sorvall, super T21). O sobrenadante obtido foi estocado para ser utilizado nas etapas posteriores de purificação.

3.10 - Purificação das proteínas GST/pb40r e GST

Para a purificação os sobrenadantes obtidos nos itens 3.8 e 3.9 foram aplicados, individualmente, em uma coluna contendo 1ml de glutathiona-

sepharose (Glutathione Sepharose™ 4B, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) previamente lavada 3x com PBS 0,15M pH 7.2. A GST apresenta afinidade pela coluna de glutathiona-sepharose e liga-se a ela. Para que a GST fosse liberada da coluna foi utilizado o tampão de eluição Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 com glutathiona reduzida. A glutathiona compete com a GST pelo sítio de ligação na glutathiona-sepharose. As amostras recolhidas destas passagens foram submetidas ao ensaio eletroforético para a confirmação da presença de GST e de GST/pb40r.

3.11 - Purificação da proteína clivada, pb40r

Para a purificação da proteína clivada o sobrenadante obtido no item 3.9 foi aplicado em uma coluna contendo 1ml de glutathione-sepharose 4B previamente lavada 3x com PBS 0,15M pH 7.2. Após a passagem a coluna foi lavada 4x com PBS 0,15M pH 7.2 e incubada com 50 unidades de trombina humana (Human trombin, usb, Cleveland, Ohio, USA) por 16 horas. Após esse período a proteína foi coletada, a resina foi lavada por mais duas vezes com PBS 0,15M pH 7.2 e então a GST foi eluída utilizando-se o tampão de eluição Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 com glutathiona reduzida. As amostras recolhidas destas passagens foram submetidas ao ensaio eletroforético para a confirmação da presença de pb40r no material obtido nas lavagens e de GST no material obtido nas eluições.

3.12 - Dosagem Protéica pelo Método de Bradford

A dosagem das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Este método baseia-se na coloração diferencial de proteínas em concentrações variadas e leitura em espectrofotômetro. As amostras de 20µl em diferentes diluições foram distribuídas em duplicata em placas de 96 poços e 180µl de reagente de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250, 0,1% em solução aquosa contendo etanol 5% e ácido fosfórico 10%, filtrado em papel de filtro número 1) foram adicionados a elas. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Elx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) no modo Absorbância $_{595nm}$, e os valores obtidos comparados com uma curva padrão de BSA 0,25µg; 0,5µg; 1,0µg e 1,5µg; conforme a fórmula: [] proteína = Abs x Fc x Fd x Cv. No qual:

- Abs: média das leituras das amostras em duplicata
- Fc: fator de conversão = concentração de proteína para cada ponto da curva de BSA.
- Fd: fator de diluição
- Cv: fator de correção de volume para obter-se a concentração em µg/mL.

3.13 - Eletroforese em gel de Poliacrilamida - SDS/PAGE

A análise eletroforética de proteínas foi realizada em géis de poliacrilamida com SDS, como descrita por Laemmli (1970), no sistema da Bio Rad. As proteínas foram fervidas por 5 min em tampão da amostra (Tris-HCl 0,065 M, pH 6.8, SDS 2%, β-mercaptoetanol 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,002%), e

separadas em gel contendo poliacrilamida (10%), bis-acrilamida (0,26%) e SDS (0,1%), em Tris-HCl 0,375 M, pH 8.8. O gel de concentração foi constituído de poliacrilamida (3%), bis-acrilamida (3%) e SDS (0,1%), em Tris-HCl 0,125 M pH 6.8. Os géis de separação e concentração foram polimerizados na presença de persulfato de amônio (0,1%) e TEMED (1:2.000, v/v). A separação foi feita em tampão de corrida constituído de Tris (0,025 M), glicina (0,192 M) e SDS (0,1%), pH 8.3 em uma voltagem constante de 80 V. Após a eletroforese, os géis foram corados pelo azul de Coomassie, ou então transferidos para membrana de nitrocelulose.

Coloração do gel:

- Azul de Coomassie

O gel foi incubado por duas horas em solução 15% metanol, 7% ácido acético e 0,5% “Coomassie Brilliant Blue” R250. A seguir a solução 10% metanol 5% ácido acético foi utilizada para a remoção do excesso de corante. O gel foi então fotografado.

3.14 – Obtenção dos soros

3.14.1- Soros de camundongos imunizados

Grupos de camundongos BALB/c machos com idade de 6-8 semanas foram imunizados com diferentes antígenos (GST e GST/pb40r) de acordo com o protocolo a seguir. 50 µg de cada antígeno foi emulsificado com adjuvante composto de 1mg de Al(OH)₃, suspensão oral, e 200 µg de *Corynebacterium parvum* (Corymunum; Fundação Ataulpho de Paiva – RJ), e foi inoculado em cada

camundongo em um volume final de 100 µl. Os camundongos receberam três imunizações. As duas primeiras foram aplicadas na região subcutânea e a terceira na região peritoneal, em intervalos de 15 dias. As Amostras de sangue foram colhidas antes das imunizações e após cada imunização para análise dos índices de reatividade dos anticorpos presentes no soro. Os soros obtidos a partir do sangue coletado foram submetidos aos ensaios imunoenzimáticos de ELISA e Western Blot. Controles foram imunizados somente com adjuvante.

Os grupos foram divididos, conforme descrito a seguir:

- 1- grupo controle não imunizado e não infectado.
- 2- grupo inoculado com adjuvante (200µg de bactérias *Corynebacterium parvum* e 1mg de hidróxido de alumínio [Al(OH)₃]).
- 3- grupo imunizado com GST + adjuvante.
- 4- grupo imunizado com GST/pb40r + adjuvante.

3.14.2- Soros de camundongos infectados

Camundongos BALB/c, machos com idade de 6-8 semanas, foram inoculados pela via intratraqueal, com 1×10^5 leveduras viáveis por animal da cepa virulenta Pb18 de *P. brasiliensis*. Os animais foram anestesiados com uma solução composta de 20% de xilazina (Dopaser solução injetável, Laboratório Calier do Brasil LTDA, SP), 20% de quetamina (Dopalen injetável, Vetbrands, SP) e 60% de PBS. Os animais foram então submetidos a uma cirurgia simples, na qual era feita uma pequena incisão na pele da região ventral superior do animal a fim de expor a traquéia. A partir daí foi injetado um volume máximo de 50µl da

preparação do fungo, diretamente na traquéia do animal, com o auxílio de uma seringa de 1ml. Finalmente, o corte foi suturado.

Com a finalidade de acompanhar os níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a específicos produzidos pelos camundongos antes e após a infecção foram coletadas amostras de sangue de três camundongos de cada grupo 15, 30 e 60 dias após a infecção. Amostras de sangue de camundongos controle, não infectados, também foram coletadas nos mesmos intervalos. As amostras de soro obtidas a partir do sangue coletado foram submetidas ao ensaio imunoenzimático de ELISA.

Os experimentos realizados com camundongos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, protocolo número: 24/2006, e a folha de aprovação encontra-se em anexo. (Anexo1)

3.14.3- Obtenção dos soros humanos

Para a realização de ensaios de ELISA foram utilizados soros de pacientes infectados com *P. brasiliensis*, soros de indivíduos sem infecção aparente e soros de pacientes com infecções diversas: ancilostomose, amebíase, leishmaniose, malária, tricuriase, doença de chagas, ascaridíase, teníase e tuberculose. Todos os soros humanos utilizados no presente estudo já se encontravam disponíveis em nosso laboratório, provenientes de outros projetos de pesquisa aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), processo número: 25/03 (Anexo 2). Esses soros foram fornecidos pelo Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias (CTR-DIP) do Hospital das Clínicas da UFMG.

Os soros utilizados nos estudos de pesquisa foram separados nos seguintes grupos experimentais:

- Controle (indivíduos que não apresentavam nenhuma infecção aparente)
- PCM (pacientes com PCM sem tratamento)
- PCM -T (pacientes com PCM em tratamento)
- PCM – R (pacientes com recidiva da PCM)
- PCM - C (pacientes com PCM cerebral)
- Ancilostomose (pacientes com ancilostomose)
- Amebíase (pacientes com amebíase)
- Doença de Chagas (pacientes com doença de Chagas)
- Malária (pacientes com malária)
- Leishmaniose (pacientes com leishmaniose)
- Tuberculose (pacientes com tuberculose)
- Tricuríase (pacientes com tricuriase)
- Ascaridíase (pacientes com ascaridíase)
- Teníase (pacientes com teníase)

A tabela 1 determina o número de indivíduos dentro de cada grupo de estudo.

Tabela 1. Classificação dos grupos de indivíduos doadores quanto à infecção diagnosticada.

Grupos	Número de indivíduos
Controle	16
PCM	19
PCM – T	35
PCM – R	13
PCM – C	5
Ancilostomose	5
Amebíase	5
Doença de chagas	6
Malária	10
Leishmaniose	10
Tuberculose	12
Tricuríase	5
Ascaridíase	5
Teníase	3

3.15 - Eletrotransferência de proteínas – “ Western Blot ”

Segundo técnica adaptada a partir de Towbin e colaboradores (1979), após a corrida eletroforética das proteínas de interesse, o gel foi colocado sobre membrana de nitrocelulose (Bio Agency, São Paulo, S.P., Brasil), ambos embebidos em tampão Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol 20%, pH 8.3. O sistema foi colocado em cuba específica para eletrotransferência sendo submetido à voltagem constante de 100V durante 1 hora em banho de gelo. Após ser retirada do sistema, a membrana foi bloqueada por 1 hora em PBS 0,15 M contendo 1,6% de caseína. Após 3 lavagens com tampão PBS Tween 0,005M, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpos específicos (soro de camundongos), diluídos

em PBS 0,15 M contendo 0,25% de caseína. Após 1 hora de incubação com anticorpo anti-imunoglobina acoplado a peroxidase (conjugado) (Anti-mouse IgG – whole molecule – peroxidase conjugate, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) na diluição de 1:10.000, a membrana foi revelada em tampão contendo 3,3'aminobenzidina (DAB) 600µg/ml, cloreto de níquel 10µl/ml e H₂O₂ 1µl/ml, diluídos em 20 ml de PBS 0,15M. A reação foi interrompida com água deionizada. A membrana foi posteriormente fotografada.

3.16 – ELISA

3.16.1- ELISA com soro de camundongos

Conforme técnica descrita por Lunde e colaboradores (1979), placas de microtitulação MaxiSorp™ Surface (NUNC™ Brand Products, Rochester, NY, USA) contendo 96 poços foram sensibilizadas com 1µg/100µl de antígeno solúvel em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9.6 durante 16 horas à 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão PBS 0,05M/ Tween 0,5% e bloqueadas através da incubação durante 1 hora com 150µl de solução de PBS 0,15M/ caseína 1,6% . Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes, e posteriormente foram adicionados nos poços, 100µl das diluições dos soros obtidos de camundongos pré-ímmunes, imunizados com GST, com adjuvante ou com GST/pb40r. O período de incubação com os soros foi de 1 hora, e em seguida as placas foram lavadas por 10 vezes para posterior adição de 100µl do anticorpo secundário marcado com a enzima peroxidase na diluição 1:5.000, no caso do anti-IgG (Anti-mouse IgG – whole molecule – peroxidase conjugate,

Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) e de 1:4.000 no caso do anti-IgG1 (Goat anti-mouse IgG1 peroxidase conjugate, Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA) e do anti-IgG2a (Goat anti-mouse IgG2a peroxidase conjugate, Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA), cujo tempo de incubação também foi equivalente a 1 hora. Para a revelação, após a lavagem das placas foram adicionados 100 µl da solução reveladora contendo 4mg de ortofenilenodiamino (OPD) e 2µl de H₂O₂ 30v/v em 10ml de tampão citrato pH 5.0. As revelações foram interrompidas após 10 minutos com 20µl de H₂SO₄ diluído 20 vezes.

A leitura dos resultados foi realizada no aparelho leitor de ELISA (Elx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) utilizando o filtro de 490nm. Todos os ensaios realizados foram acompanhados de controles sem antígenos, sem soros e apenas com o conjugado.

3.16.2- ELISA com soro humano

Conforme técnica descrita por Lunde e colaboradores (1979), placas de microtitulação MaxiSorp™ Surface (NUNC™ Brand Products, Rochester, NY, USA) contendo 96 poços foram sensibilizadas com 0,250µg/100µl de antígeno solúvel em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9.6 durante 1 hora à 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes com água deionizada e bloqueadas através da incubação durante 1 hora com 150µl de solução de BSA 1%.

Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes, e posteriormente foram adicionados nos poços, 100µl das diluições dos soros de pacientes com PCM, indivíduos controle (sem infecção aparente) ou indivíduos

com outras doenças. O período de incubação com os soros foi de 1 hora, e em seguida as placas foram lavadas por 10 vezes para posterior adição de 100µl do anticorpo secundário marcado com a enzima peroxidase (Anti-human IgG – γ -chain specific– peroxidase conjugate, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) na diluição de 1:10.000, cujo tempo de incubação também foi equivalente a 1 hora. Para a revelação, após a lavagem das placas foram adicionados 100 µl da solução reveladora contendo 4mg de ortofenilenodiamino (OPD) e 2µl de H₂O₂ 30v/v em 10mL de tampão citrato pH 5.0. As revelações foram interrompidas após 10 minutos com 20µl de H₂SO₄ diluído 20 vezes.

A leitura dos resultados foi realizada no aparelho leitor de ELISA (Elx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) utilizando o filtro de 490nm. Todos os ensaios realizados foram acompanhados de controles sem antígenos, sem soros e apenas com o conjugado.

3.17 – Análises Estatísticas dos Dados

Os dados foram analisados usando o programa estatístico "one way ANOVA" (análise de variância) com o teste posterior de Bonferroni que compara todos os grupos, em pares, entre si. Quando foram comparados apenas dois grupos, em tempos diferentes, os dados foram analisados usando o programa estatístico "two way ANOVA", com o teste posterior de Bonferroni. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Prism 3.0 (Graph Pad, CA, USA). A diferença entre os dados foi considerada significativa quando $P < 0,05$.

IV - RESULTADOS

4.1- Amplificação da Sequência Gênica da pb40r

Um clone de *E.coli* XL0LR, portador do vetor pBluescript, foi selecionado por conter a sequência gênica da proteína de aproximadamente 40 kDa de *P. brasiliensis*, identificada como reativa a soro de pacientes com PCM por Goes e colaboradores (2005). A PCR, utilizando os iniciadores da sequência da pb40r, resultou na amplificação da sequência de 1134pb, como demonstrado no ensaio eletroforético (Fig.3).

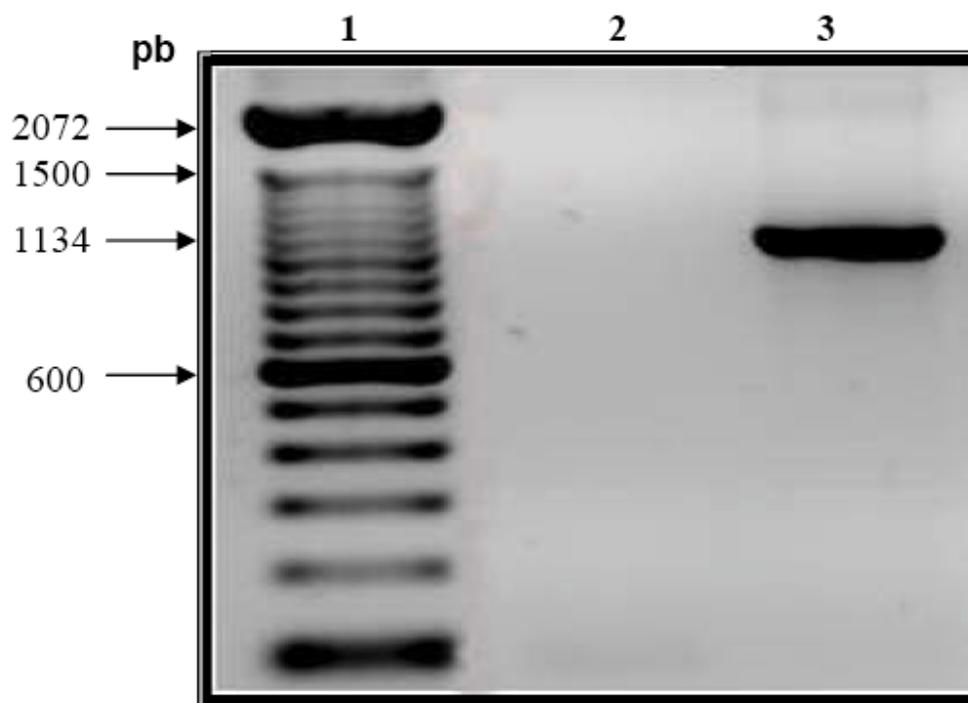


Figura 3: Gel de agarose 1%, mostrando a amplificação da sequência de 1134 pb correspondente ao gene da proteína pb40r de *P. brasiliensis*. Observa-se o padrão de 100 pares de base (1), controle negativo (2) e produto da PCR realizada com o plasmídeo pBlueScript (3).

4.2- Transformação das Bactérias E.coli BL-21 com o plasmídeo pGEX4T-3/pb40r

O plasmídeo pGEX4-T3 e a sequência amplificada da pb40r foram digeridos com as enzimas NOT I e Sal I, para posterior ligação.

Após a reação de ligação, bactérias *E.coli* BL-21 foram transformadas com o plasmídeo recombinante pGEX4T-3, por choque térmico, e plaqueadas em meio seletivo com ampicilina. Para certificar a presença da sequência gênica da pb40r de *P. brasiliensis* nos clones que se desenvolveram, foi realizado o ensaio de PCR das colônias, utilizando os iniciadores do pGEX4T-3, que amplificam um fragmento de sua sequência em conjunto com o gene de interesse, o que aumenta em alguns pares de bases o tamanho do inserto observado. A análise eletroforética (Fig. 4) demonstrou que 3 clones apresentavam o gene de interesse (canaletas 2,3 e 5.).

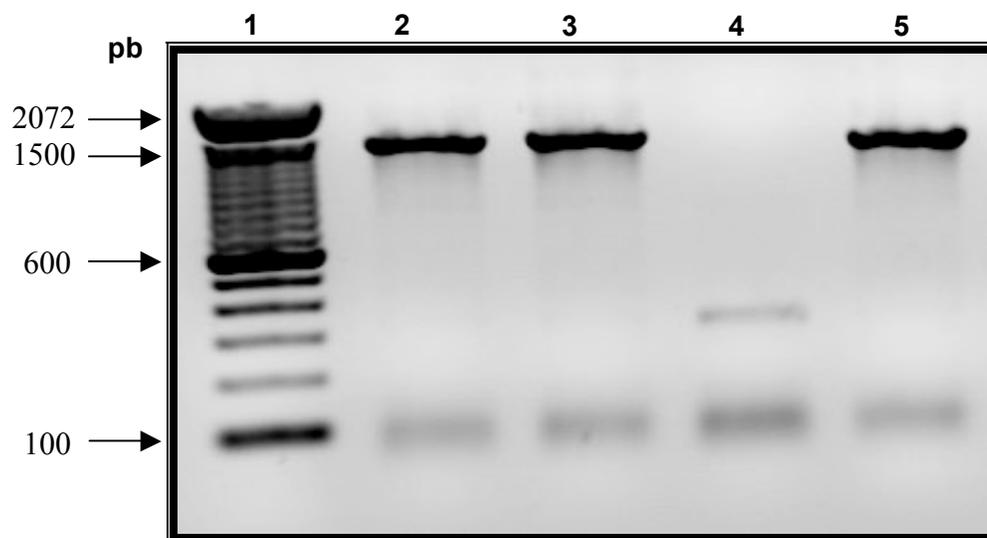


Figura 4: Gel de agarose 1%, com os perfis obtidos da amplificação por PCR da seqüência de aproximadamente 1500pb das amostras de bactérias *E.coli* BL-21 transformadas com o plasmídeo recombinante pGEX4-T3. Observamos o padrão de 100pb (1), a amplificação das seqüências de aproximadamente 1500pb referentes à pb40r e a um fragmento da seqüência do plasmídeo também amplificado com seus iniciadores (2,3 e 5), resultado negativo do PCR de colônia, onde não houve a amplificação da seqüência de interesse (4).

O sequenciamento do gene de interesse foi realizado para verificar a seqüência completa do inserto, assim como para averiguar se havia homologia entre essa seqüência e alguma outra depositada em bancos de dados. O sequenciamento foi realizado através do método de Sanger no NAGE (Núcleo da Análise Genômica) da UFMG, utilizando os iniciadores do pGEX4T-3 para a região onde foi inserida a seqüência de interesse. A seqüência obtida está representada na figura 5. A região sequenciada foi comparada às seqüências depositadas no “Nonredundant GenBank” do NCBI empregando-se o programa BLASTx e demonstrou homologia entre a proteína de interesse e outras depositadas nesse banco de dados. As seqüências que apresentaram maior homologia com a

sequência da pb40r foram selecionadas e alinhadas no programa CLUSTALW e a pesquisa de domínios estruturais e funcionais foi realizada utilizando-se o banco de dados SMART, que revelou dois motivos mão-EF, representados em destaque na figura 6. A análise no “GenBank” do NCBI utilizando-se o programa BLASTn não apresentou homologia significativa com nenhuma sequência depositada nesse banco de dados.

ATG	GAA	AAT	GCC	TTT	CTC	GAT	AAC	TTT	TTC	GCT	GTG	GAA	TTC	CGG	CCT	TCG	54
M	E	N	A	F	L	D	N	F	F	A	V	E	F	R	P	S	H
ACT	ATT	CGC	TTT	GAT	ACA	GGA	GAA	TGG	CAG	TAC	CTG	GCA	AAC	GAG	CTG	CTG	108
T	I	R	F	D	T	G	E	W	Q	Y	L	A	N	E	L	L	D
CGT	GGG	CTT	TCT	GAA	GCC	AAC	GTC	ACG	GCT	GCA	ATT	ACA	AGG	TTC	AAC	GAG	162
R	G	L	S	E	A	N	V	T	A	A	I	T	R	F	N	E	S
GAC	GAT	TTT	GGC	GAG	GAG	CTA	AGG	CGC	CGG	AGA	CGG	AAT	GGC	GAG	TCA	ATA	216
D	D	F	G	E	E	L	R	R	R	R	R	N	G	E	S	I	R
TTG	ACG	GGG	CCT	GGA	ACA	AGC	CTC	CTC	AAC	CCC	ACG	GAT	CCA	CCG	CCG	CCA	270
L	T	G	P	G	T	S	L	L	N	P	T	D	P	P	P	P	A
GTA	CCA	GCT	CCT	GAG	CAA	GCG	GAC	ACC	TTG	GAT	GAT	CAG	AGC	ATT	TTT	TCG	324
Y	P	A	P	E	Q	A	D	T	L	D	D	O	S	I	F	S	W
AGA	GAC	GGA	AAT	GAC	GAT	GGC	GCC	CCA	ACC	CGC	GAA	GGA	CAG	AAT	TTG	CTG	378
R	D	G	N	D	D	G	A	P	T	R	E	G	Q	N	L	L	N
TTG	CTC	TAT	CAT	ATT	GCT	GAG	GAC	CAA	GCA	CGG	CGA	GAC	GGC	TAT	ATT	CAT	432
L	L	Y	H	I	A	E	D	Q	A	R	R	D	G	Y	I	H	R
GGA	GTG	ACA	TGT	AAT	AGC	TGT	GGG	GCG	ATG	CCA	ATT	CAG	GGA	GTA	AGG	TAT	486
G	V	T	C	N	S	C	G	A	M	P	I	Q	G	V	R	Y	R
TGC	GCT	AAC	TGC	ATC	GAC	TAC	GAT	CTC	TGC	GAA	ACA	TGC	GAA	GCT	ATG	CAG	540
C	A	N	C	I	D	Y	D	L	C	E	T	C	E	A	M	Q	V
CAC	ATC	AAG	ACG	CAT	CTC	TTT	TAC	AAA	GTC	CGA	ATT	CCT	GCC	CCC	TTC	CTA	594
H	I	K	T	H	L	F	Y	K	V	R	I	P	A	P	F	L	G
AAC	CCA	CGA	CAA	CCC	CAG	CCC	GTT	TGG	TAT	CCA	GGG	AAG	CCA	GCT	ATG	CTC	648
N	P	R	Q	P	Q	P	V	W	Y	P	G	K	P	A	M	L	P
CGT	AGC	CTA	CCA	CGG	AAC	CTC	GCC	AAA	AGG	CTC	ATG	AAG	GAG	ACC	AAT	TTT	702
R	S	L	P	R	N	L	A	K	R	L	M	K	E	T	N	F	E
AAT	ACA	GAG	CTG	GAT	GCG	TTG	TGG	GAT	CAG	TTC	CGA	TGT	CTA	GCA	AAT	GTC	756
N	T	E	L	D	A	L	W	D	Q	F	R	C	L	A	N	V	E
TGG	GTT	AAT	GAT	CCC	AAT	AAG	CTA	AAT	ATG	GCA	ATC	GAC	CGC	AAG	ACA	TTT	810
W	V	N	D	P	N	K	L	N	M	A	I	D	R	K	T	F	D
CGA	TGC	TTT	GTA	CCA	AAT	ACC	TCA	ATC	CGG	CCT	CCA	CCC	CCG	AGT	CTT	ATA	864
R	C	F	V	P	N	T	S	I	R	P	P	P	P	S	L	I	Y
GAC	CGA	ATG	TTT	TCG	TTC	TAC	GAT	ACG	AAT	GGA	GAT	AAT	TTG	ATC	GGG	TTC	918
D	R	M	F	S	F	Y	D	T	N	G	D	N	L	I	G	F	E
GAG	TTT	TTA	AAA	GGG	TTA	GCA	AGT	TTC	AGT	AAT	AAA	AGT	GTT	CAT	GAG	AGA	972
E	F	L	K	G	L	A	S	F	S	N	K	S	V	H	E	R	L
AGG	CGT	ATA	TTT	GAG	GGT	TAC	GAT	ATT	GAT	AGA	GAT	GGT	TAC	GTG	GAA	AGG	1026
R	R	I	F	E	G	Y	D	I	D	R	D	G	Y	V	E	R	K
GAT	TTT	CTT	CGA	ATA	TTT	AGG	GCT	TAC	TAC	ACT	CTG	AGC	AGA	GAG	TTG	ACT	1080
D	F	L	R	I	F	R	A	Y	Y	T	L	S	R	E	L	T	R
GAT	ATG	GTA	GCT	GGG	ATG	GAA	GAT	GAT	TTC	TTG	GAG	GGT	GGC	TCG	TGC	CGA	1134
D	M	V	A	G	M	E	D	D	F	L	E	G	G	S	C	R	I

Figura 5: Seqüência nucleotídica e de aminoácidos do inserto da pb40r. Seqüência nucleotídica, em vermelho, e seqüência deduzida dos aminoácidos (representados por uma única letra), em verde, da pb40r. O número de bases encontra-se à direita.



Figura 6: Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína pb40r de *P. brasiliensis* com as sequências correspondentes à EF-HAND domain protein de *Neosartorya fischeri* (número de acesso: XP_001257850) e de *Aspergillus clavatus* (número de acesso: XP_001267883) através do ClustalW (1.82) Sequence Alignment. Em cinza destacam-se os dois motivos mão-EF, preditos no banco de dados SMART. “*”, resíduos idênticos, “:”, substituição conservativa; “.”, substituição semi-conservativa; “-” resíduo inexistente; “ ”, sem consenso.

4. 3 - Expressão da proteína recombinante GST/pb40r

Os clones de *E. coli* transformados com o plasmídeo pGEX4T-3 e os clones transformados com o pGEX4T-3/pb40r, cresceram em meio líquido até atingir a D.O₆₀₀ =0.5 e foram induzidos com IPTG para a expressão protéica.

A miniexpressão foi realizada com o objetivo de verificar se os clones transformados com o plasmídeo recombinante eram capazes de expressar a proteína de interesse. O perfil das proteínas bacterianas (Fig. 7) demonstrou que os clones não induzidos com IPTG mantiveram a produção basal de GST e foram incapazes de produzir a proteína GST/pb40r (canaletas 2,3 e 4) durante as 4 horas de indução. Após 2 horas de indução, os clones produziram GST (canaleta 5) e GST/pb40r (canaletas 6 e 7). A expressão protéica foi maior após 4 horas de indução para o clone capaz de expressar GST (canaleta 8) e os clones que expressam GST/pb40r (canaletas 9,10).

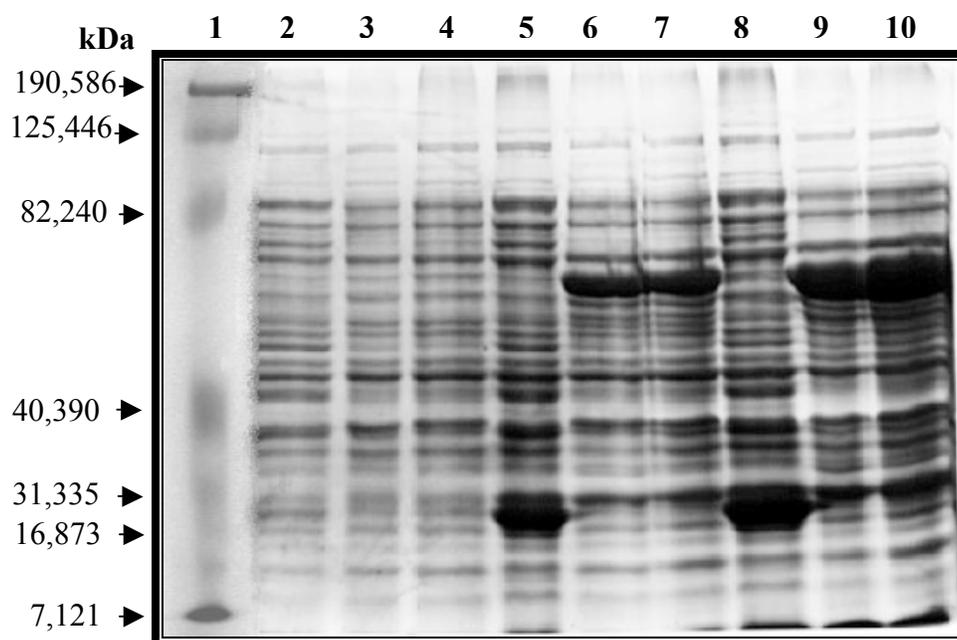


Figura 7: Gel de SDS-PAGE 10% corado por azul de Comassie, do perfil de expressão da GST/pb40r e da GST. Alíquotas de 25 μ l de cada preparação bacteriana foram separadas em gel de poliacrilamida 10%, sob condições redutoras e posteriormente foram coradas por azul de Comassie. Peso molecular (1); clones não induzidos com IPTG (2,3,4); extrato de *E.coli* transformadas com pGEX4T-3 após 2 (5) e 4 horas de expressão (8); extrato de *E.coli* transformadas com o pGEX4T-3 contendo o inserto da pb40r após 2 (6,7) e 4 horas de expressão (9,10).

Com o objetivo de verificar a solubilidade da proteína recombinante produzida, pb40r, os clones de *E. coli* positivos foram cultivados em meio líquido até atingir a $D.O_{600} = 0.5$ e induzidos com IPTG para a expressão protéica. Após 4 horas de expressão as bactérias foram lisadas e centrifugadas para verificar se a proteína de interesse encontrava-se no sedimento ou no sobrenadante. As amostras obtidas foram submetidas a um ensaio eletroforético em gel SDS-PAGE 10% (Fig. 8). O resultado obtido demonstrou que a proteína de interesse, pb40r, encontrava-se preferencialmente no sedimento, indicando um acúmulo da mesma em corpos de inclusão, o que demandaria um tratamento especial para sua purificação, uma vez que, para proceder à purificação em coluna de afinidade para GST é necessário que a proteína esteja solúvel. Um clone contendo o plasmídeo pGEX4T-3 sem indução foi submetido ao mesmo procedimento e foi utilizado como controle negativo.

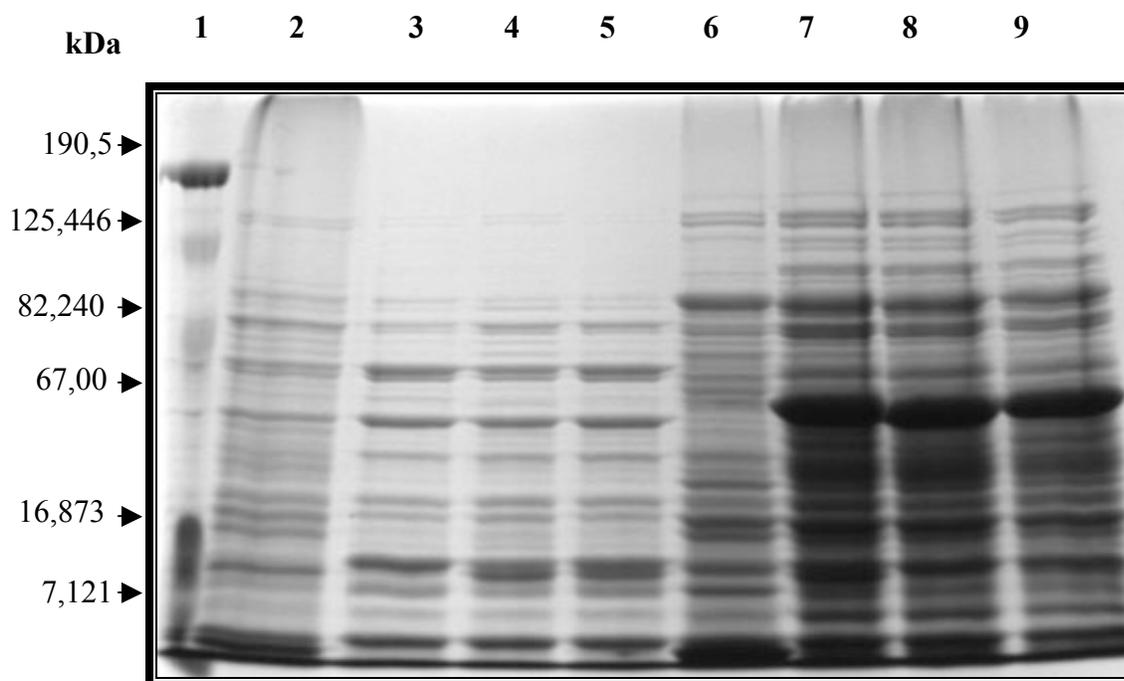


Figura 8: Gel de SDS-PAGE 10% corado por azul de Comassie, do perfil do sedimento e do sobrenadante da expressão da GST/pb40r. Aliquotas de 25 μ l de cada preparação bacteriana foram separadas em gel de poliacrilamida 10%, sob condições redutoras e posteriormente foram coradas por azul de Comassie. Peso molecular (1), sobrenadante da lise do pGEX4T-3 sem indução (2), sobrenadante da expressão de GST/pb40r (3, 4, 5), sedimento da lise do pGEX4T-3 sem indução (6) e sedimento da expressão de GST/pb40r (7, 8, 9).

4.4 - Purificação da Proteína Recombinante GST/pb40r

Uma vez detectada a proteína no sedimento da cultura, vários testes foram realizados em busca da melhor estratégia para solubilização da mesma. A proteína fusionada foi purificada utilizando-se glutathiona-sepharose. O produto eluído apresentou-se, em seu perfil eletroforético, como uma proteína com massa molecular aparente de 67kDa (Fig. 9).

Bactérias transformadas com o plasmídeo pGEX4T-3 sem inserto, produziram a proteína GST solúvel, que também foi purificada com a utilização da glutathiona-sepharose. O produto eluído apresentou em seu perfil eletroforético uma proteína de aproximadamente 27kDa de massa molecular (Fig. 10).

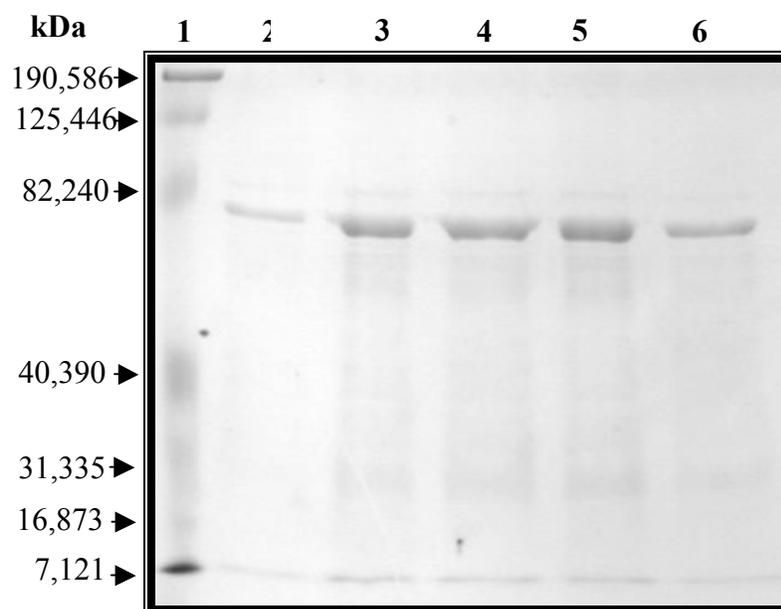


Figura 9: Gel de SDS-PAGE 10% corado por azul de Comassie, com os perfis resultantes de várias purificações da proteína recombinante GST/pb40r. Alíquotas de 20 μ l de cada preparação antigênica foram separadas em gel de poliacrilamida 10%, sob condições redutoras e posteriormente foram coradas por azul de Comassie. Peso molecular (1); Purificações (2-6).

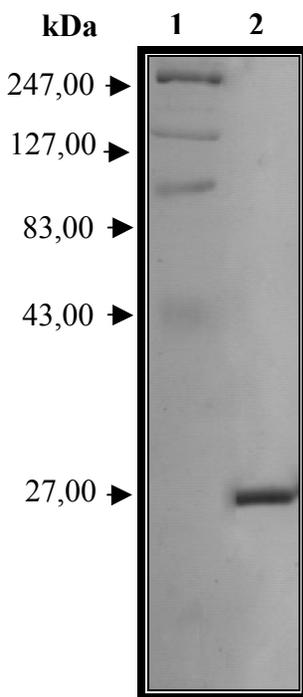


Figura 10: Gel de SDS-PAGE 10% corado por Azul de Comassie, com o perfil resultante da purificação da proteína recombinante GST. Uma alíquota de 1 μ g da preparação antigênica foi separada em gel de poliacrilamida 10%, sob condições redutoras e posteriormente foi corada por azul de Comassie. Peso molecular (1); GST purificada (2).

4.5 - Purificação da Proteína Recombinante clivada pb40r

A proteína recombinante GST/pb40r foi clivada com êxito pela trombina, sendo que o material coletado após a clivagem apresentou-se puro, porém, o rendimento foi muito baixo. Após várias purificações o material pós-clivagem foi liofilizado e dialisado, apresentando-se em seu perfil eletroforético como uma proteína de aproximadamente 40kDa (Fig. 11). Após a coleta da proteína recombinante clivada, a GST que permaneceu ligada à coluna foi eluída. Após várias purificações o material foi liofilizado e dialisado apresentando-se em seu perfil eletroforético como uma proteína de aproximadamente 27kDa (Fig. 11).

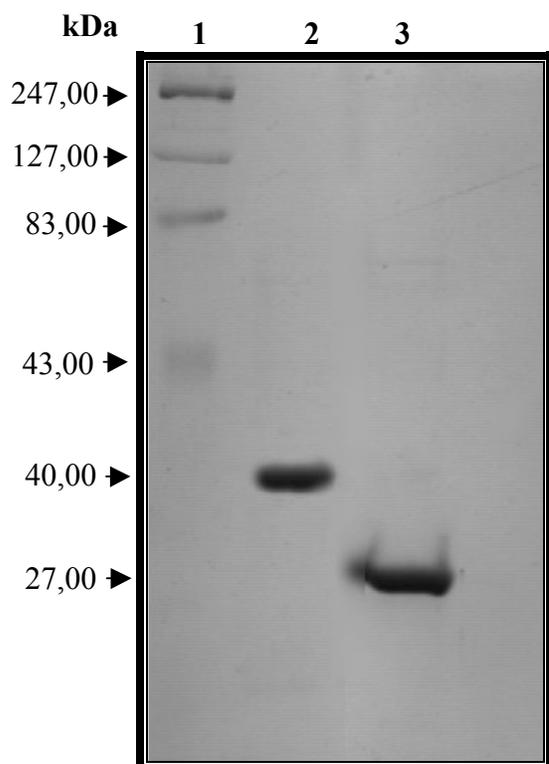


Figura 11: Gel de SDS-PAGE 10% corado por azul de Comassie, com os perfis resultantes da clivagem da proteína recombinante GST/pb40r. Aliquotas de 2 μ g de cada preparação antigênica foram separadas em gel de poliacrilamida 10%, sob condições redutoras e posteriormente foram coradas por azul de Comassie. Peso molecular (1); pb40r clivada (2), GST clivada (3).

Uma vez que a proteína pb40r apresenta um peso molecular muito semelhante ao da trombina, 40kDa e 37 kDa, respectivamente, foi realizada uma reação de Western Blot, com soro de camundongo imunizado com a proteína fusionada GST/pb40r e soro de camundongo não imunizado, que confirmou a presença da proteína pb40r (Fig. 12).

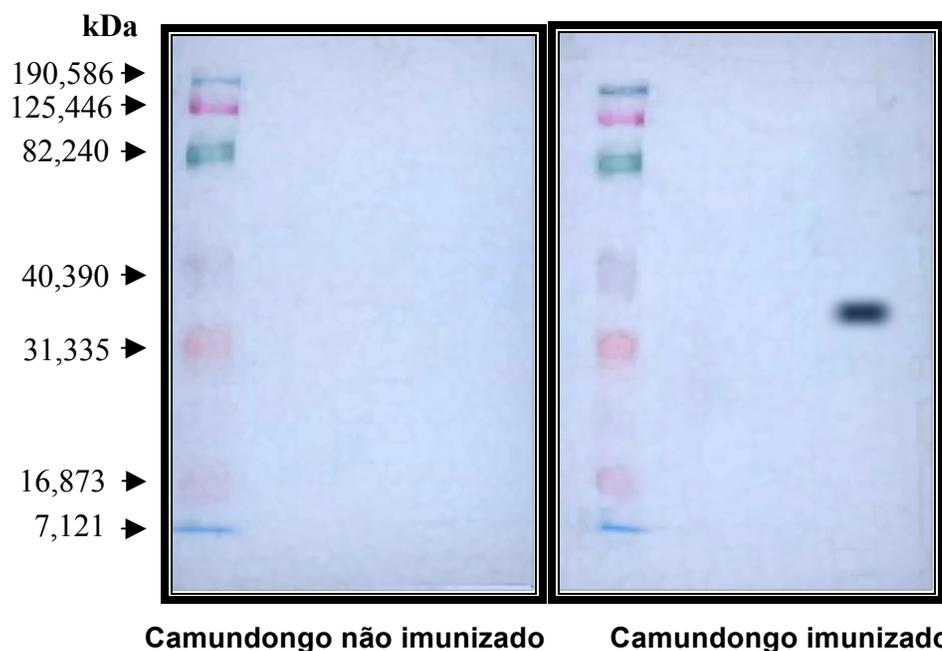


Figura 12: Ensaio de Western Blot confirmando a presença da proteína pb40r. Experimento realizado com soro de camundongo imunizado com a proteína fusionada GST/pb40r e de camundongo não imunizado na diluição de 1/400. O anticorpo Anti- γ chain de IgG de camundongo conjugado à peroxidase foi utilizado, na diluição de 1/10.000, como anticorpo secundário no experimento realizado. O resultado mostra a proteína pb40r evidenciada pelo soro do camundongo imunizado.

4.6 – Reatividade de Anticorpos

4.6.1 – Reatividade dos anticorpos presentes nos soros de camundongos

Com o objetivo de avaliar se houve produção de anticorpos do tipo IgG contra os antígenos utilizados nas imunizações e titular o nível dos mesmos, os soros dos camundongos pré-imune e após a 3^a imunização foram testados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em diluições que variaram de 1/50 a 1/1600. Os resultados foram expressos pelo cálculo da média de reação dos soros de três

camundongos por grupo. Os testes revelaram que os soros obtidos de camundongos imunizados com GST/pb40r + adjuvante foram capazes de reconhecer a proteína GST/pb40r pura, após a 3ª imunização, o mesmo não ocorrendo com o soro dos camundongos pré-imune do mesmo grupo. O grupo de camundongos imunizados com a GST também foi capaz de reconhecer a GST/pb40r pura, após a 3ª imunização, o que não aconteceu com o soro dos camundongos pré-imune do mesmo grupo. Os demais grupos (Adjuvante e Controle) não foram capazes de reconhecer a GST/pb40r pura. A reatividade dos soros dos camundongos imunizados com GST/pb40r e dos imunizados com GST foi significativa em relação ao controle ($P < 0.001$) (Gráfico 1).

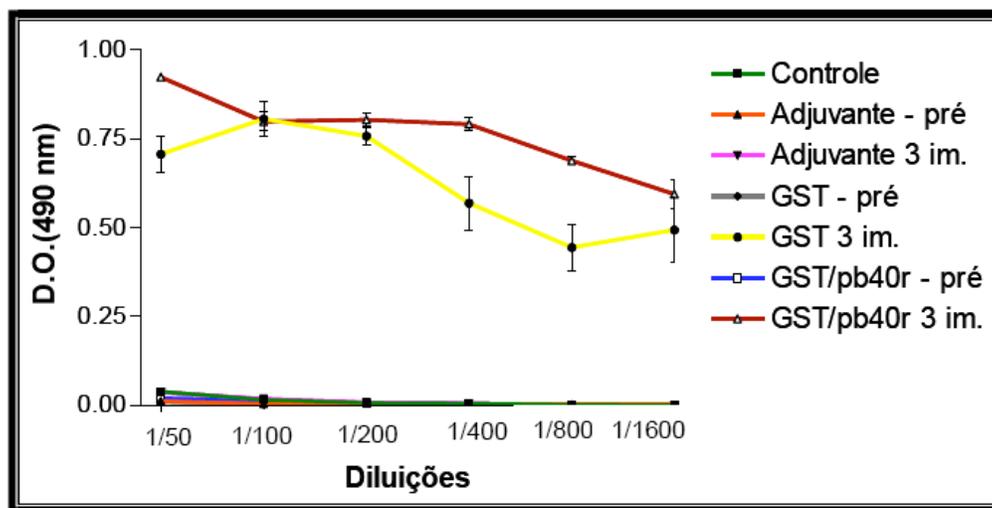


Gráfico 1: Representação gráfica da reatividade dos soros de camundongos BALB/c frente a proteína GST/pb40r pura. Os resultados foram expressos em densidade óptica a 490 nm, da concentração de IgG total. As siglas utilizadas correspondem às curvas de resposta imunológica dos grupos antes da imunização (pré) e após a 3ª imunização (3 im.). A curva de titulação realizada com soros pré-imune e após a 3ª imunização, demonstrou que os soros dos camundongos imunizados com GST/pb40r e com a GST reagem com GST/pb40r. Nas mesmas condições os soros pré-imunes, assim como os do grupo controle e adjuvante não reagiram. A reatividade após a 3ª imunização com GST/pb40r e com GST foi significativa em relação ao controle ($P < 0.001$).

Resultado semelhante foi obtido nas reações de ELISA realizadas com os mesmos soros, nas mesmas diluições, porém frente à GST pura (Gráfico 2).

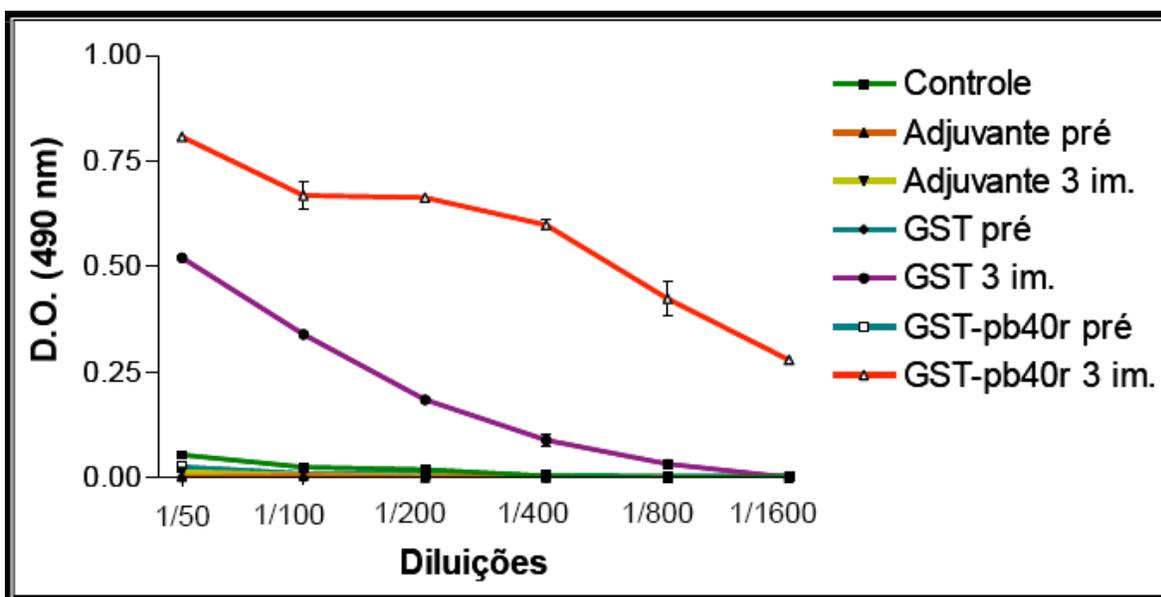


Gráfico 2: Representação gráfica da reatividade dos soros de camundongos BALB/c frente à proteína GST pura. Os resultados foram expressos em densidade óptica a 490 nm, da concentração de IgG total. As siglas utilizadas correspondem às curvas de resposta imunológica dos grupos antes da imunização (pré) e após a 3ª imunização (3 im.). A curva de titulação realizada com soros pré-imune e após a 3ª imunização, demonstrou que os soros dos camundongos imunizados com GST/pb40r e com a GST reagem com GST/pb40r. Nas mesmas condições os soros pré-ímmunes, assim como os do grupo controle e o adjuvante não reagiram. A reatividade após a 3ª imunização com GST/pb40r e com GST foi significativa em relação ao controle ($P < 0.001$).

Estes resultados demonstraram que houve a produção de anticorpos IgG específicos após as imunizações com as proteínas GST/pb40r e com a GST, demonstrando a imunogenicidade das mesmas.

Porém, os camundongos imunizados com GST/pb40r apresentaram uma alta reatividade frente à GST pura nas reações de ELISA acima representadas,

além disso o grupo imunizado com GST pura também apresentou uma alta taxa de anticorpos IgG contra a GST/pb40r. Devido a essa alta reatividade foi realizada outra reação de ELISA com a proteína pb40r, com o objetivo de validar a imunogenicidade da mesma, e demonstrar que também foram produzidos anticorpos específicos para essa proteína e não apenas para a GST (Gráfico 3).

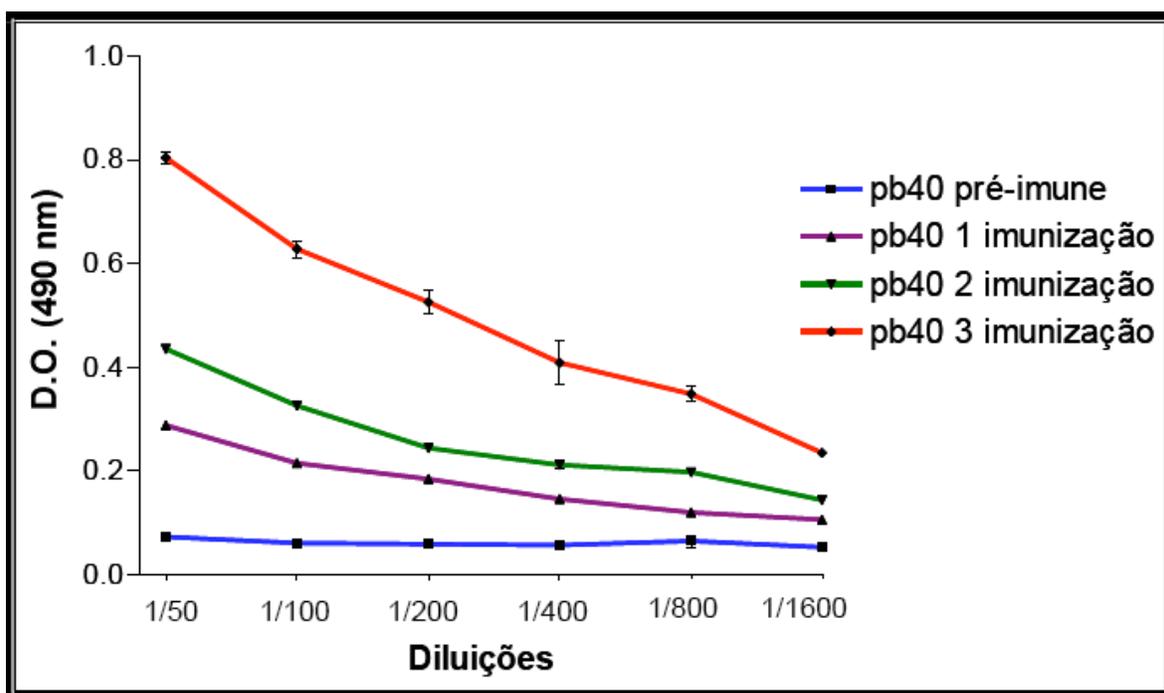


Gráfico 3: Representação gráfica das respostas de IgG total contra pb40r. Os resultados foram expressos em densidade óptica a 490 nm, da concentração de IgG total. As siglas utilizadas correspondem às curvas de resposta imunológica dos grupos antes da imunização (pré-imune), após a 1^a, 2^a e 3^a imunização (1, 2 e 3 imunização). A resposta observada após a 3^a imunização foi significativa em relação ao controle pré-imune ($P < 0.001$).

Estes resultados demonstraram que houve a produção de anticorpos IgG específicos pra pb40r após as imunizações com a proteína GST/pb40r, demonstrando a imunogenicidade da mesma. O aumento do título de anticorpos após a 2^a imunização indica que houve uma resposta imune secundária.

Baseando-se nos resultados obtidos nesse gráfico e nos anteriores e em dados da literatura, a diluição 1/400 foi escolhida para uso nos experimentos de ELISA futuros, que envolvem soros de camundongos.

Após esse resultado foi realizado um teste de ELISA para verificar se o soro de camundongos infectados com *P. brasiliensis* produz anticorpos IgG contra a proteína pb40r. Para esse fim, após a sensibilização da placa com a pb40r, a mesma foi incubada com soros de camundongos infectados com o fungo 15, 30 e 60 dias após a infecção e com soros de camundongos normais nos mesmos intervalos (Gráfico 4). Os resultados foram expressos pelo cálculo da média de reação dos soros de três camundongos por grupo, em cada ponto. O resultado observado no gráfico demonstra que o soro de camundongos infectados com o fungo produz anticorpos contra a pb40r, a partir de 30 dias após a infecção. A resposta observada 30 e 60 dias após a infecção foi significativa em relação ao controle ($P < 0.05$ e $P < 0.01$, respectivamente).

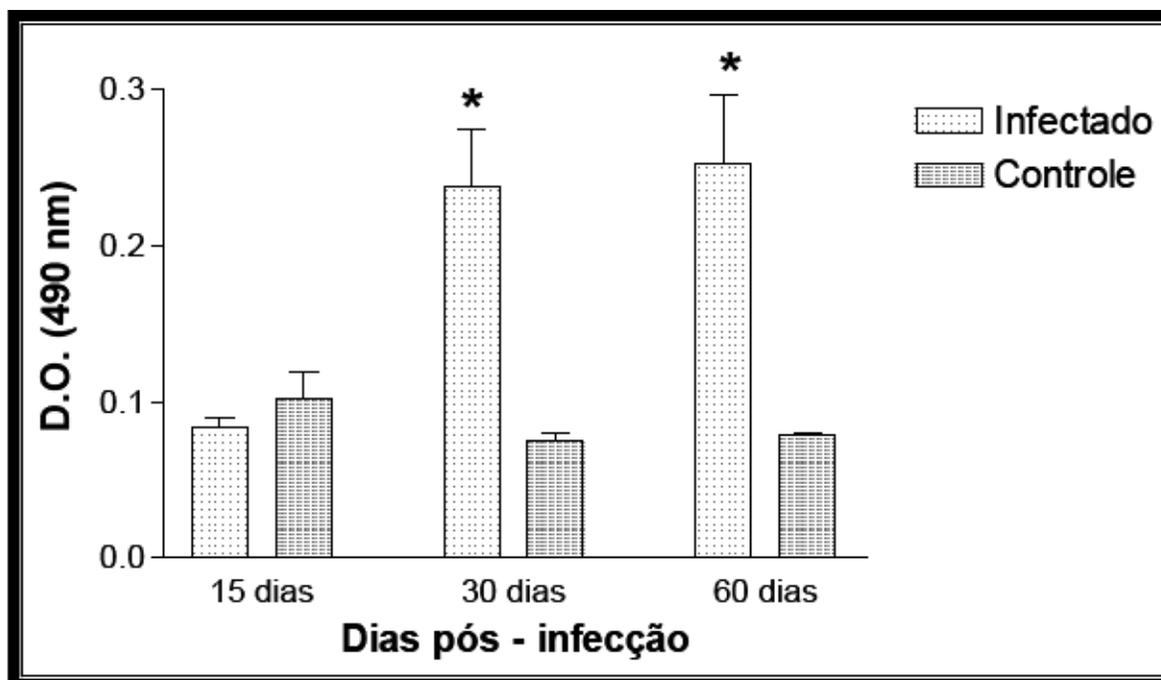


Gráfico 4: Representação gráfica da reatividade dos soros de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* frente à proteína pb40r pura. Os resultados foram expressos em densidade óptica a 490 nm, da concentração de IgG total. As respostas observadas 30 e 60 dias após a infecção foram significativas em relação ao controle não infectado ($P < 0.05$ e $P < 0.01$, respectivamente).

Sendo a proteína pb40r uma proteína imunogênica, capaz de estimular a produção de anticorpos IgG em camundongos imunizados com a mesma, além de ser uma proteína reconhecida pelo soro de animais infectados, foram realizados testes de ELISA para verificar se havia diferenças no perfil da produção de anticorpos dos isotipos de IgG (IgG1 e IgG2a) durante as imunizações e durante a infecção. Para a realização dessas reações de ELISA, placas sensibilizadas com a pb40r, foram incubadas com soro de camundongos BALB/c imunizados com GST/pb40r, antes da imunização e após a 1ª, 2ª e 3ª imunizações (Gráfico 5), ou então com soro de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*, e soro de camundongos não infectados (Gráfico 6). Os resultados foram expressos pelo

cálculo da média de reação dos soros de três camundongos por grupo, em cada ponto.

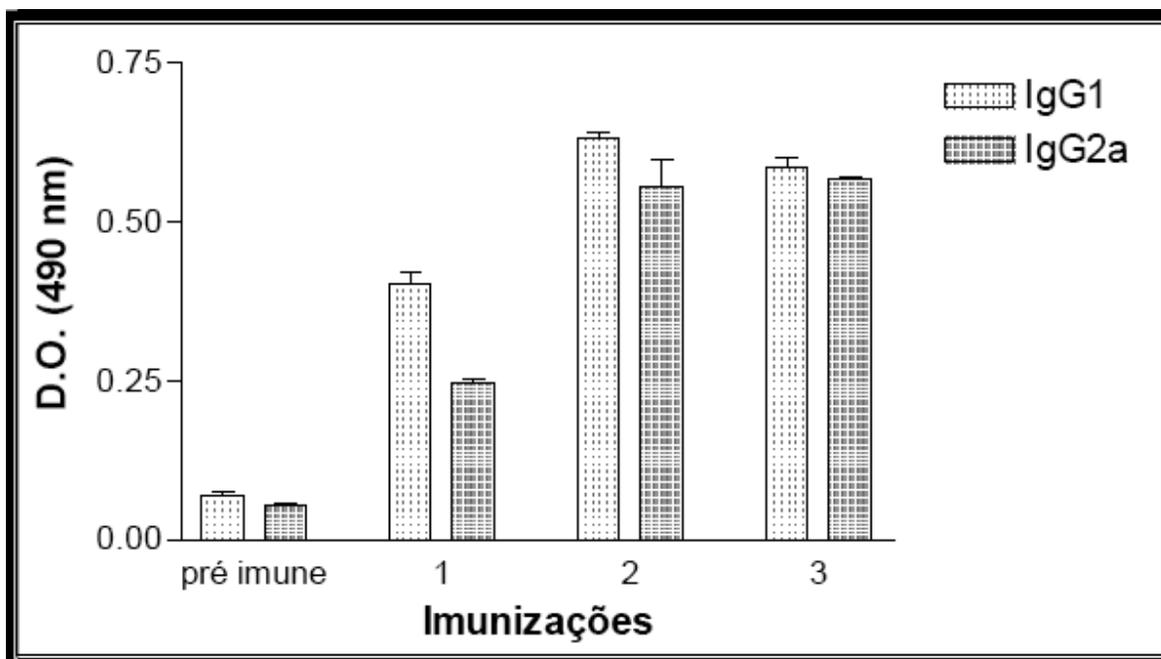


Gráfico 5: Representação gráfica das respostas de IgG1 e IgG2a contra pb40r em camundongos imunizados. Os resultados foram expressos em densidade óptica a 490 nm, da concentração de IgG1 e IgG2a. As siglas utilizadas correspondem à: soro após a 1ª, 2ª e 3ª imunizações (1, 2, 3). O resultado observado demonstra uma diferença no perfil da produção dos dois isotipos de IgG, onde a resposta para IgG1 é maior do que a resposta para IgG2a, após a 1ª imunização.

O resultado observado no gráfico 5, demonstra que há uma diferença no perfil da produção dos dois isotipos de IgG (IgG1 e IgG2a) onde a resposta para IgG1 é maior do que a resposta para IgG2a, após a 1ª imunização. Mas após a 2ª imunização as respostas se igualam, indicando que a produção de IgG1 ocorre com maior intensidade do que a de IgG2a no primeiro contato com o antígeno, ou seja, possui uma resposta mais precoce.

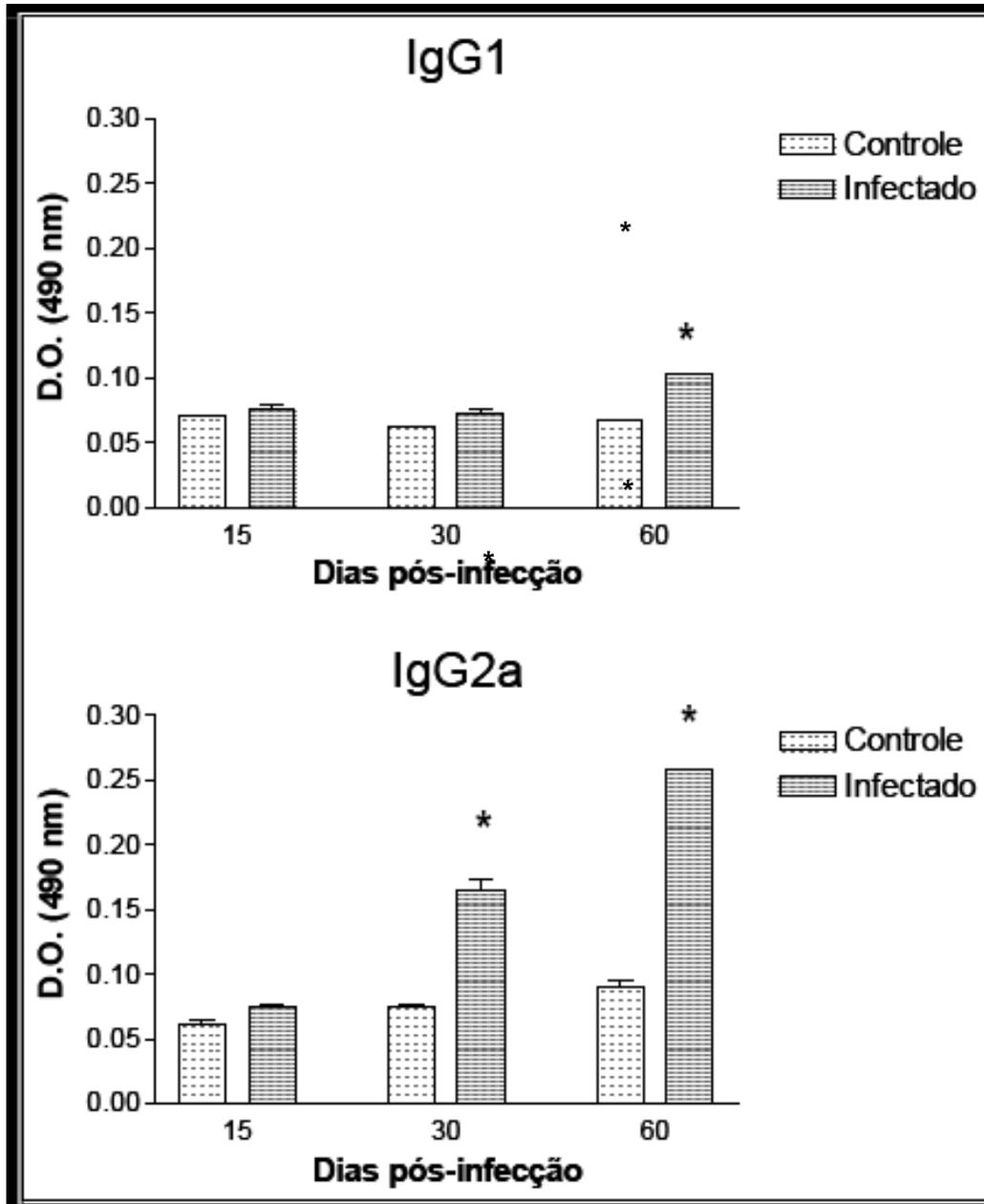


Gráfico 6: Representação gráfica das respostas de IgG1 e IgG2a contra pb40r em camundongos infectados. Os resultados foram expressos em densidade óptica a 490 nm, da concentração de IgG1 e IgG2a. O resultado observado demonstra uma diferença no perfil da produção dos dois isotipos de IgG, onde a resposta para IgG1 é significativa em relação ao controle não infectado apenas 60 dias após a infecção ($P < 0.01$), enquanto a resposta para IgG2a já é significativa em relação ao controle 30 dias após a infecção permanecendo significativa após 60 dias ($P < 0.001$).

O resultado apresentado no gráfico 6 mostra uma diferença significativa no perfil da produção de anticorpos dos dois isotipos, IgG1 e IgG2a sendo que o primeiro apresentou um perfil tardio de resposta, além dessa resposta ter sido significativamente menor do que a do 2º isotipo, que apresentou um perfil de resposta mais precoce e mais intenso. Comparando-se os gráficos 5 e 6, parece haver uma inversão do perfil predominante de isotipos de IgG, onde na imunização a resposta à IgG1 é mais precoce e intensa do que a resposta à IgG2a; ocorrendo o inverso na infecção.

4.6.2 – Reatividade dos anticorpos presentes nos soros de pacientes

A reatividade dos soros de pacientes com PCM frente à pb40r foi avaliada através de ensaios de ELISA utilizando soros de pacientes com PCM sem tratamento e soro de indivíduos controle (dado não mostrado). A padronização do ensaio foi obtida a partir da diluição que melhor discrimina os grupos testados. As demais reações de ELISA foram processadas utilizando a diluição dos soros de 1:400 como determinado no experimento citado anteriormente. A quantidade de proteína utilizada para sensibilizar a placa também foi testada em ensaios de ELISA, sendo que a quantidade escolhida para testes posteriores foi de 0,25 µg/poço. O bloqueio também foi testado e o escolhido foi BSA 1%, devido à menor incidência de reação cruzada (dados não mostrados).

Os soros doados pelos pacientes com PCM, por indivíduos sem infecção aparente e pelos pacientes com infecções diversas, positivamente testados em ensaios prévios, foram separados e classificados de acordo com a tabela 1.

O gráfico 7 representa a reatividade de 88 soros, sendo 16 de indivíduos sem infecção aparente (Controle), 19 de pacientes com PCM sem tratamento (PCM), 35 pacientes com PCM em tratamento (PCM-T), 05 de pacientes com PCM cerebral (PCM-C) e 13 de pacientes com PCM que tiveram recidiva da doença (PCM-R). A linha de corte (cut off) indica o valor de separação entre um

resultado negativo (abaixo da linha de corte) e um resultado positivo (acima da linha de corte).

No gráfico 7 é possível observar a reatividade apresentada por todos os soros de pacientes com PCM-C e PCM-R. Eles apresentaram reação à pb40r com valores de D.O. acima da linha de corte (5/5 e 13/13, respectivamente). Quase todos os indivíduos com PCM sem tratamento apresentaram reatividade acima da linha de corte (18/19). Os indivíduos com PCM tratados apresentaram média de reatividade acima da linha de corte, sendo que a maioria ficou em cima da mesma (29/35). A sensibilidade do ensaio no gráfico 7, levando-se em conta o diagnóstico clínico, é de 90,3% (65/72). Quase todos os indivíduos do grupo controle (13/16) apresentaram reatividade abaixo da linha de corte, o que confere ao ensaio uma especificidade de 81,25%. Os valores de predição positivos e os valores de predição negativos dos ensaios de ELISA com soros de pacientes com PCM, PCM-T, PCM-C e PCM-R estão representados na tabela 2.

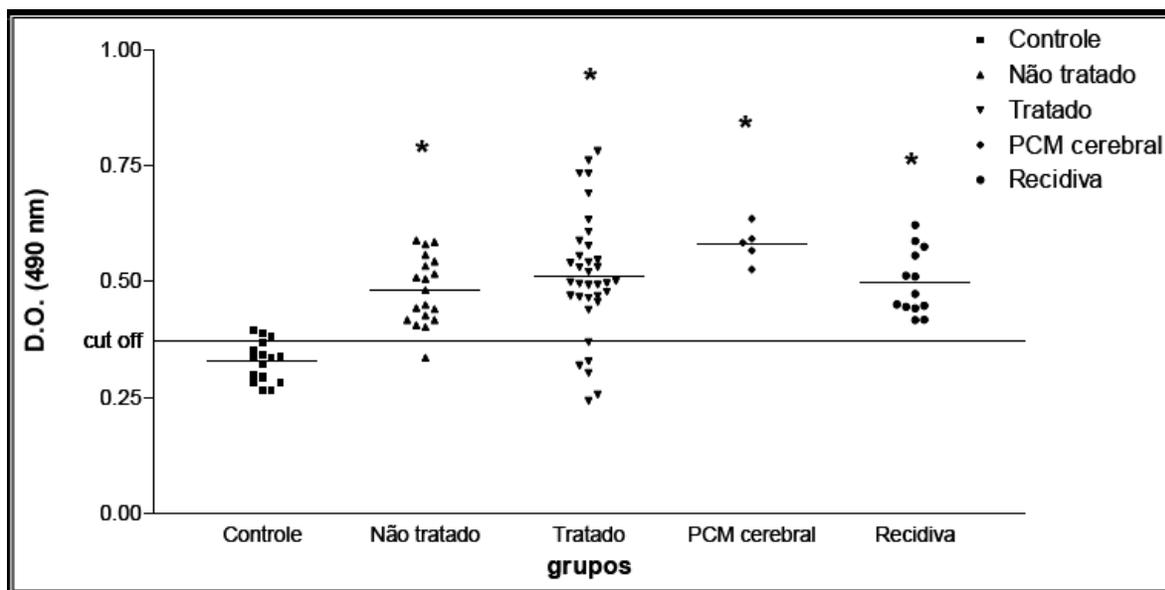


Gráfico 7 – Representação gráfica da reatividade dos soros de pacientes infectados com *P. brasiliensis* e de indivíduos controle frente à pb40r em ensaios de ELISA. Os resultados foram expressos em densidade óptica a 490 nm, da concentração de IgG total. O traço indica o valor médio da reação do grupo. A linha tracejada indica o ponto de corte do ensaio (média do grupo controle + 2 desvios padrões). * indica diferença estatisticamente significativa (P<0,001).

Tabela 2. VPP e VPN do ensaio de ELISA com soro de pacientes com PCM com ou sem tratamento, com recidiva ou PCM cerebral.

ELISA	Positivo	Negativo	Total
Clínico			
Positivo	65	7	72
Negativo	3	13	16
VPP (65/72) = 0,9027 (90,27%) VPN (13/16) = 0,8125 (81,25 %)			

O valor de predição positiva (VPP) e o valor de predição negativa (VPN) revelam o quanto um ensaio é sensível em detectar a infecção em pacientes realmente infectados com o microrganismo em questão e o quanto ele é específico, evitando, assim, reações cruzadas. Na tabela 2 estão representados os valores de predição positivos e os valores de predição negativos do ensaio de ELISA utilizando-se a pb40r, com soros de pacientes com PCM. O VPP e o VPN possuem valores altos, que atribuem ao ensaio uma boa sensibilidade (90,27%) e especificidade (81,25%).

Através do gráfico 7 também foi possível observar que o tratamento dos pacientes com PCM não promoveu uma diminuição dos níveis de IgG anti-pb40r no soro de 82,8% dos pacientes tratados.

Com o objetivo de avaliar a especificidade do ensaio de ELISA utilizando-se a pb40r, soros de pacientes com infecções diversas foram testados. Foram utilizados 71 soros, sendo 5 de indivíduos sem nenhuma infecção aparente, como controle negativo (G1), 5 de pacientes com PCM sem tratamento, como controle positivo (G2), 5 de pacientes com Tricuríase (G3), 5 de pacientes com Ancilostomose (G4), 5 de pacientes com Amebíase (G5), 6 de pacientes com Doença de Chagas (G6), 10 de pacientes com malária (G7), 5 de pacientes com Ascaridíase (G8), 3 de pacientes com Teníase (G9), 12 de pacientes com Tuberculose (G10) e 10 de pacientes com Leishmaniose (G11). Os resultados estão representados no gráfico 8.

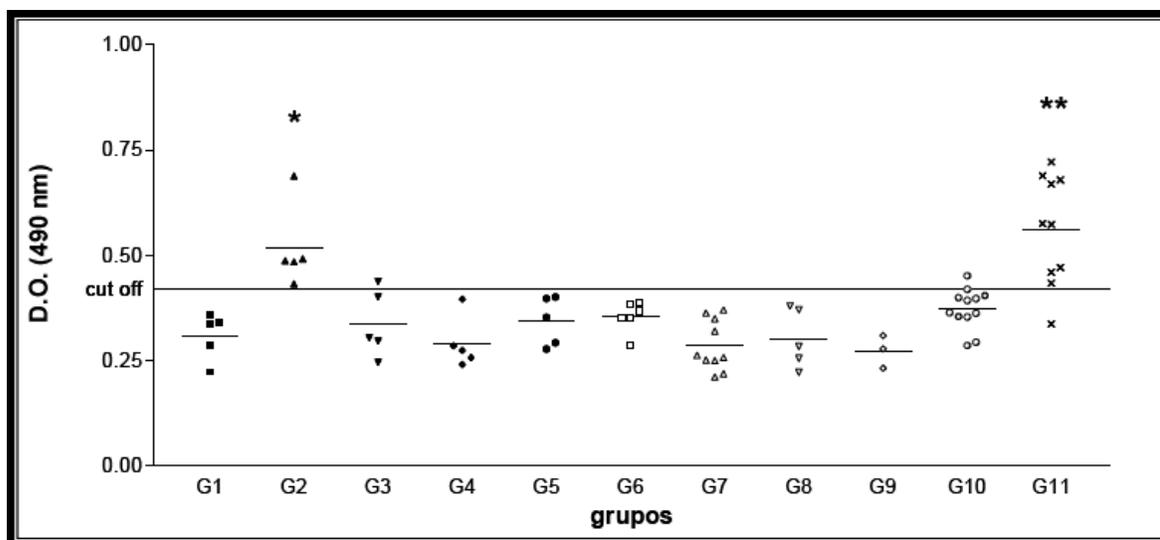


Gráfico 8 – Representação gráfica da reatividade à pb40r por soros de pacientes com infecções diversas. Os resultados foram expressos em densidade óptica a 490 nm, da concentração de IgG total. O traço indica o valor médio da reação do grupo. A linha tracejada indica o ponto de corte do ensaio (média do grupo controle + 2 desvios padrões). * e ** indicam valores estatisticamente significativos ($P < 0.01$ e $P < 0.001$, respectivamente)

G1 = Controle negativo; G2 = Controle positivo; G3 = Tricuríase; G4 = Ancilostomose; G5 = Amebíase; G6 = Doença de Chagas; G7 = Malária; G8 = Ascariíase; G9 = Teníase; G10 = Tuberculose; G11 = Leishmaniose.

O resultado representado no gráfico 8 demonstra que soros de pacientes com Leishmaniose [G11] apresentaram reatividade a componentes presentes na pb40r com valores de D.O. acima da linha de corte. Os soros dos demais pacientes com outras doenças apresentam reatividade com valores de D.O. abaixo da linha de corte, com exceção de 1 paciente com Tricuríase [G3] e 1 paciente com Tuberculose [G10] que apresentaram valores de D.O. acima da linha de corte.

O ensaio de ELISA utilizando a pb40r apresentou uma especificidade de 81,96% (50/61) frente aos soros de pacientes com infecções variadas.

V - DISCUSSÃO

O conhecimento sobre o envolvimento de antígenos em respostas imunes e em distúrbios imunorregulatórios na PCM é incipiente (Taborda *et al.*, 1998).

Os fundamentos moleculares tanto da imunidade experimental quanto da imunidade humana ao *P. brasiliensis* são complexos, sendo imprescindível, portanto identificar e caracterizar antígenos relevantes na efetivação de respostas imunes protetoras no hospedeiro. Com este intuito, Diniz e colaboradores (2004) demonstraram que o sistema imune dos hospedeiros murinos imunizados com a F0, FII ou FIII comportava-se de modo específico diante de uma infecção desafio com células leveduriformes, onde camundongos imunizados com a F0 ou a FII estabeleceram respostas protetoras enquanto o oposto foi observado em camundongos imunizados com a FIII. Estes apresentaram infecção disseminada e progressiva.

Em seguimento a esse trabalho, Goes e colaboradores (2005) identificaram componentes da F0, FII e FIII através da estratégia da produção de etiquetas de sequências antigênicas (ASTs), que são segmentos de DNA resultantes do sequenciamento parcial das extremidades de cDNAs que codificam proteínas imunogênicas previamente selecionadas de uma biblioteca de expressão com anticorpos policlonais, estes, nesse trabalho, provenientes de coelhos imunizados com as frações antigênicas em questão ou de pacientes com diferentes formas clínicas de PCM. Sendo que 12 clones encontrados apresentaram homologia com genes previamente caracterizados em outros fungos, correspondendo a 10 genes diferentes. Dentre esses clones estava um que expressa uma proteína que apresentou 35% de identidade e 55% de similaridade com a calcineurina B de *Neurospora crassa*, a pb40r.

A calcineurina é uma proteína ubíqua da família serina/treonina fosfatase cálcio-dependente, cuja atividade é regulada por cálcio (Ca^{+2}) e calmodulina (Klee et al., 1979). Em concentrações inferiores a 10^{-7} M Ca^{+2} , a calcineurina é um heterodímero inativo constituído por duas subunidades conservadas: a catalítica de 58-64 kDa e a regulatória de 19 kDa, estruturalmente similar à calmodulina (Klee et al., 1988). Concomitantemente à elevação da concentração intracelular de Ca^{+2} , a calmodulina liga-se à região C-terminal da subunidade catalítica da calcineurina ocasionando uma mudança conformacional reversível que disponibiliza o domínio catalítico. Recentemente, estudos apresentaram evidências experimentais de que ao ligar-se à subunidade regulatória da calcineurina o Ca^{+2} desempenharia uma função estrutural ao invés de uma função regulatória (Stemmer & Klee, 1994). Além da ligação da calmodulina, a ativação da atividade fosfatásica da subunidade catalítica é dependente da interação com a subunidade regulatória, uma vez que o impedimento da associação destas duas subunidades por mutações elimina essa atividade (Milan et al., 1994).

A subunidade regulatória da calcineurina é constituída por quatro motivos mão-EF organizados em dois domínios ligados através de uma hélice central flexível. Geralmente, proteínas com este motivo são reconhecidas através da homologia entre as alças que ligam Ca^{+2} (Aitken et al., 1984; Lewit-Bentley et al., 2000). Sendo que, de fato a pb40r apresentou dois motivos mão-EF.

A importância da subunidade regulatória da calcineurina em processos fisiológicos de fungos, principalmente os patogênicos, tem sido objeto de diversos trabalhos. Em *S. cerevisiae*, a subunidade regulatória da calcineurina está envolvida na homeostase de cátions, na síntese da parede celular e no ciclo

reprodutivo. Esta proteína atua em vias de transdução de sinais que regulam a diferenciação e o desenvolvimento de hifas vegetativas de *N. crassa* (Kothe & Free, 1998). Já em *C. neoformans*, a subunidade regulatória da calcineurina é essencial para o crescimento em temperaturas fisiológicas, o que implica na patogenicidade deste fungo (Fox et al., 2001). A subunidade catalítica da calcineurina é codificada por apenas um gene em *S. pombe* e, em consequência da deleção deste gene, observa-se anormalidades morfológicas, desorganização do processo de citocinese e esterilidade (Yoshida et al., 1994). Como a atividade da calcineurina depende da subunidade regulatória em estado funcional, o comprometimento desta subunidade resultaria, provavelmente, nesses efeitos. Recentemente, Cruz e colaboradores (2002) demonstraram que a calcineurina atua em uma via de resposta ao estresse da membrana citoplasmática, promovendo a sobrevivência de *C. albicans*.

Outras proteínas que também apresentam motivos mão-EF já se mostraram essenciais para *P. brasiliensis*. Um exemplo é a calmodulina, que parece participar dos mecanismos envolvidos na conversão do fungo de micélio à levedura, uma vez que algumas drogas inibitórias da via de sinalização Ca^{2+} /calmodulina inibem essa transição (Carvalho et al., 2003).

Devido à grande importância das proteínas que apresentam motivos mão-EF em diversos organismos e inclusive em *P. brasiliensis*, além da pb40r ter sido encontrada como um componente da F0, essa proteína é uma forte candidata a estudos imunológicos. Nesse intuito foi proposto o presente trabalho que tem por objetivo caracterizar essa proteína, mostrando seu potencial como alvo para imunodiagnóstico da PCM, uma vez que a mesma parece ser um importante

componente do fungo, além de ser reconhecida por soros de pacientes. O diagnóstico de certeza da PCM é dispendioso e trabalhoso, uma vez que ainda é realizado através da visualização direta do fungo em materiais biológicos, daí a importância do desenvolvimento de métodos de imunodiagnóstico mais eficientes, pois a utilização dos mesmos em PCM ainda tem valor limitado.

Para a obtenção da proteína foi utilizada a técnica de recombinação gênica. Os avanços da engenharia genética permitem a produção em larga escala de fragmentos protéicos de organismos complexos em bactérias a partir da inserção de plasmídeos recombinantes. Esta técnica oferece a vantagem de gerar antígenos purificados, reduzindo o risco de reações cruzadas (Warren, 1986).

A sequência gênica da proteína de 40kDa de *P. brasiliensis* foi amplificada a partir de uma biblioteca de cDNA e clonada. O plasmídeo escolhido para a clonagem foi o pGEX4-T3 que permite a obtenção da proteína de interesse fusionada à GST de 27kDa de *S. japonicum*, o que facilita os processos posteriores de purificação.

A análise de homologia da sequência de aminoácidos do fragmento inserido no plasmídeo, não apresentou homologia significativa com nenhuma proteína bem caracterizada, apresentando 74% de identidade e 83% de similaridade com a proteína “EF hand domain protein” dos fungos *Neosartorya fischeri* e *Aspergillus clavatus*, que assim como a calcineurina e a calmodulina, apresenta motivos mão-EF de ligação ao cálcio.

A imunogenicidade de antígenos de *P. brasiliensis* tem sido demonstrada por diversos pesquisadores (da Silva et al., 1991; Vaz et al., 1992). A reatividade dos soros dos camundongos imunizados com a proteína recombinante GST/pb40r

foi analisada através de ensaios imunoenzimáticos utilizando o conjugado para IgG total. Houve significativa reatividade dos soros dos camundongos imunizados em relação aos pré-ímmes demonstrando que a proteína é imunogênica. A reatividade aumentou após a 2^a e a 3^a imunizações evidenciando a ocorrência da resposta imune secundária que é mais rápida e maior. Sendo qualitativamente e quantitativamente diferente da 1^a.

Apesar da resposta imune humoral aparentemente não ter um papel central na defesa da PCM, tanto pacientes com PCM quanto animais infectados por *P. brasiliensis* produzem grandes quantidades de anticorpos. Os anticorpos são potentes opsonizadores e, em conjunto com o sistema do complemento, promovem a morte do fungo (Restrepo-Moreno, 1993). O papel de anticorpos em PCM ainda não foi determinado. Estudos em animais têm demonstrado que eles podem constituir um importante mecanismo de defesa. Pois, quando camundongos com alta e baixa produção de anticorpos foram infectados com *P. brasiliensis*, a maior taxa de mortalidade e a maior disseminação foram encontradas nos camundongos com baixa produção de anticorpos (Carvalho et al., 1986).

Para padronizar os ensaios de imunoreatividade e diminuir as variáveis envolvidas nos resultados fizemos a titulação dos soros e determinamos que a diluição utilizada seria 1/400. Os soros dos camundongos infectados 15, 30 e 60 dias pós-infecção foram analisados, e o resultado demonstrou que o soro dos camundongos reconhece a proteína pb40r 30 dias após a infecção sendo que esse reconhecimento é ainda maior após 60 dias. Este dado sugere que a

produção de anticorpos anti-pb40r aumentou em paralelo ao progresso da infecção.

O estudo da reatividade de IgG1 demonstrou que houve produção significativa desta subclasse após a 1ª imunização com GST/pb40r em relação ao controle pré-imune. Sendo que houve um aumento dessa produção após a 2ª imunização e o nível se manteve estável após a 3ª imunização. Em camundongos a troca para a subclasse IgG1 é induzida por IL-4, que é uma citocina típica das respostas linfocitárias Th2. A resposta para IgG2a foi menor do que a para IgG1 após a primeira imunização, igualando-se a ela após a 2ª. O que demonstra que a resposta induzida para IgG1 é mais precoce do que a induzida para IgG2a, mas após a 2ª imunização as duas respostas se igualam.

A reatividade de IgG2a também foi significativa em relação ao soro pré-imune, após a 1ª imunização, aumentando após a 2ª e se mantendo estável após a 3ª. Em camundongos a troca para a subclasse IgG2a é induzida por IFN- γ que é uma citocina típica das respostas linfocitárias Th1. Citocinas Th1 como TNF e INF- γ induzem nos macrófagos a via de produção do óxido nítrico, que tem demonstrado ser essencial para eliminação do fungo (Gonzalez et. al., 2000). Diniz e colaboradores (2001) demonstraram que as frações provenientes de seu trabalho estimularam células de pacientes a produzir níveis mais altos de óxido nítrico quando comparadas com células de indivíduos saudáveis. Além disso, INF- γ é relacionado à resistência à PCM em camundongos (Souto, et al., 2000; Kashino et al, 2000).

Quando avaliados, os níveis de IgG1 e IgG2a de camundongos infectados com *P. brasiliensis* 15, 30 e 60 dias após a infecção, o resultado demonstrou uma

inversão do apresentado durante a imunização, sendo que na infecção o aparecimento de anticorpos IgG2a anti-pb40r ocorreu antes e com maior intensidade do que o de anticorpos IgG1 anti-pb40r. Os anticorpos IgG2a apareceram após 30 dias de infecção, aumentando a concentração após 60 dias, enquanto os anticorpos IgG1 só apareceram após 60 dias de infecção e em menor intensidade. Este resultado contradiz o de vários pesquisadores que já demonstraram que a infecção por *P. brasiliensis* promove uma inibição da resposta imune celular, com uma mudança, preferencial, para um perfil imunológico do tipo Th2, com predomínio de anticorpos IgG1, tanto em humanos como em camundongos (Brito & Franco, 1994; Benard, 2001).

As citocinas possuem um importante papel na regulação da resposta imune humoral e da mudança de isotipo das imunoglobulinas (Snapper et al., 1997). Estudos prévios demonstraram a prevalência de isotipos regulados por Th2 (IgG2b, IgG1 e IgA) nas formas mais severas de PCM em modelo murino, sendo observada uma produção preferencial de isotipos controlados por Th1 (IgG2a) na infecção benigna (Calich et al., 1998; Cano et al., 1998; Kashino et al., 2000).

A pesquisa e a produção de antígenos bem-caracterizados é um campo de extrema importância. No futuro eles, provavelmente, irão substituir as preparações utilizadas em diagnóstico atualmente, que apresentam grandes problemas, tais como: a reatividade cruzada, a não especificidade e a falta de reprodutibilidade. A detecção de anticorpos por métodos sorológicos tem um importante papel na PCM (Camargo et al., 1984; Cano et al., 1987; Hamilton, 1998). Trabalhos recentes utilizando métodos de purificação de proteínas e proteínas recombinantes têm identificado uma série de candidatos a antígenos para imunodiagnóstico (Figuroa

et al., 1995; Cisalpino et al., 1996; McEwen et al., 1996; Ortiz, et al., 1996; Cunha et al., 2002; Díez et al., 2002, Reis et al. 2005).

Neste trabalho, também foi analisado o perfil de resposta à pb40r apresentado por soros de pacientes com PCM de diferentes formas clínicas, indivíduos sem infecção aparente e indivíduos com outras infecções. O ensaio de ELISA padronizado utilizando-se a pb40r se mostrou eficiente em diferenciar pacientes com PCM com ou sem tratamento de indivíduos controle, sem infecção aparente, tendo sido utilizada uma quantidade mínima de antígeno 0,250 µg/poço. Apresentando 90,3% de sensibilidade e 81,25% de especificidade. Sendo que para pacientes com PCM cerebral e recidiva a sensibilidade sobe para 100% e para indivíduos sem tratamento ela é de 94,7%. Os pacientes com PCM tratados são os responsáveis pela queda na sensibilidade do teste, sendo que a mesma para esse grupo é de 82,8%. Essa queda nos níveis de anticorpos, após o tratamento, pode ser resultante da diminuição de células fúngicas no organismo. Isso provavelmente contribui para a diminuição do estímulo imunológico, ocasionando a baixa na manutenção de células imunológicas de longa duração. Essa queda já foi demonstrada de maneira até mesmo mais significativa em outros trabalhos. Reis e colaboradores (2005) demonstraram em seu trabalho que a sensibilidade do teste de ELISA frente ao antígeno MEXO de *P. brasiliensis*, sofreu uma redução significativa quando utilizaram soros de pacientes em tratamento, chegando até mesmo, dependendo do tempo de tratamento, a não conseguir distingui-los do controle.

Com a sensibilidade de 90,3% e especificidade de 81,25%, esse método de diagnóstico se mostrou eficiente em distinguir indivíduos controle, sem infecção

aparente, de indivíduos infectados, sendo a sensibilidade encontrada mais alta que a demonstrada por outros pesquisadores, como Ortiz et al. (1998), que encontrou em seu método uma sensibilidade de 73,4%. E levando-se em consideração todos os grupos, inclusive o tratado, a sensibilidade também foi maior que a apresentada por Reis e colaboradores em 2005.

A determinação da presença de reação cruzada com outras doenças demonstrou que anticorpos presentes em alguns soros de pacientes com outras infecções foram capazes de reconhecer a proteína pb40r. A especificidade do método a soros de pacientes com outras infecções foi de 81,96% (50/61). Sendo que 1 paciente com tricurfase e 1 paciente com tuberculose reconheceram a pb40r. A história clínica desses pacientes indicou que eles eram clinicamente negativos para PCM, mas eles vivem em uma área endêmica. Surpreendentemente 9 dos 10 pacientes com leishmaniose foram capazes de reconhecer a pb40r, de forma bastante intensa. Outros trabalhos já haviam demonstrado a reação cruzada apresentada por pacientes com leishmaniose frente à antígenos de *P. brasiliensis*. Reis e colaboradores, 2005 demonstraram que 4 pacientes com leishmaniose responderam ao antígeno MEXO.

Silveira e colaboradores (2006) abordaram em seu trabalho a alta reatividade apresentada por cães infectados com leishmaniose frente a antígenos de *P. brasiliensis*. Nesse trabalho os autores testaram a hipótese de que essa alta reatividade seria devido a uma reação cruzada com antígenos de *Leishmania* como descrito previamente por Suzuki e colaboradores em 1997. O resultado encontrado por eles, porém contradiz essa hipótese devido ao baixo coeficiente de correlação apresentado entre antígenos de *Leishmania* e de *P. brasiliensis*. Esses

autores, levando em consideração que a área de estudo correspondia a uma área endêmica para as duas doenças e que a resposta protetora para as mesmas é do tipo Th1, concluíram que os animais estariam co-infectados com *P. brasiliensis*.

Os soros de pacientes com leishmaniose utilizados no presente trabalho, assim como os demais soros utilizados já se encontravam disponíveis em nosso laboratório, provenientes de outros projetos de pesquisa. A história clínica desses pacientes indicou que eles eram clinicamente negativos para PCM, porém eles vivem em área endêmica, estando, portanto expostos ao fungo e a seus antígenos. Além disso, essa reatividade encontrada poderia ser devido a uma reatividade cruzada entre a proteína pb40r e algum outro antígeno de *Leishmania*. Embora, a análise de homologia da sequência da pb40r no banco de dados não tenha apresentado homologia com nenhuma proteína de *Leishmania*, essa proteína possui domínios mão-EF que são muito conservados podendo ser o motivo de tal reação cruzada.

Os resultados apresentados até aqui vêm somar esforços no combate a PCM, visto que um diagnóstico rápido e preciso é de extrema importância para o tratamento eficaz do paciente. Além disso, o diagnóstico eficiente da PCM poderá contribuir para inquéritos epidemiológicos através da identificação rápida e segura da infecção.

VI - CONCLUSÃO

Através do presente trabalho foi possível concluir que a técnica de recombinação gênica empregada para expressão e purificação da proteína recombinante, pb40r, foi eficiente, embora tenha apresentado uma baixa produtividade. A pb40r apresenta dois motivos mão-EF e é uma proteína imunogênica, capaz de induzir significativa produção de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a. Além disso, a proteína é eficiente em distinguir indivíduos sem infecção aparente de indivíduos com PCM de diversas formas clínicas. Apresentando uma boa especificidade frente a outras infecções, apesar da alta reatividade cruzada com a leishmaniose.

A proteína recombinante pb40r é um antígeno promissor, como alvo para imunodiagnóstico da PCM, devido a sua alta sensibilidade e especificidade. Estudos futuros podem testar a eficiência dessa proteína em conjunto com outras para formação de um coquetel de antígenos, o que levaria a um aumento na especificidade e na sensibilidade do teste empregado.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AITKEN, A., KLEE, C. B. & COHEN, P. The structure of the B subunit of calcineurin. **Eur. J. Biochem.**, v. 139, p. 663-671, 1984.
2. ALMEIDA, F. O. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos do Brasil-novo gênero para o parasita brasileiro. **An. Fac. Med.Univ de São Paulo**. v. 5, p. 125-134, 1930.
3. ALMEIDA, S.M. Central nervous paracoccidioidomycosis: na overview. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, p. 126-133, 2005.
4. ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
5. ARISTIZABAL, B. H. et al. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. **Infect. Immun.** v. 66, p. 5587-5591, 1998.
6. BAGAGLI, E., SANO, A., COELHO, K. I., ALQUATI, S., MIYAJI, M., DE CAMARGO, Z. P., GOMES, G. M., FRANCO, M. & MONTENEGRO M.R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 505-512, 1998.
7. BAGAGLI, E. & SIMÕES, L.B. New strategies and opportunities for the ecoepidemiological study of *Paracoccidioides brasiliensis*: sentinel animal,

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- molecular biology and geoprocessing. **Rev. Inst. Med. Trop. S.P.**, v. 47, suppl. 14, p.16, 2005.
8. BAIDA, H., BISELLI, P. J., JUVENALE, M., DEL NEGRO, G. M., MENDES-GIANINI, M. J., DUARTE, A. J. & BERNARD, G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form of paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v. 1, p. 273-278, 1999.
9. BAVA, A. J., MISTCHENKO, A. S., PALACIOS, M. F., ESTEVEZ, M. E., TIRABOSCHI, N. I., SEN, L., NEGRONI, R. & DIEZ, R. A. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycoses patients. **Microbiol. Immunol.**, v. 35, p. 167-174, 1991.
10. BENARD, G., ROMANO, C.C., CACERE, C.R., JUVENALE, M., MEMDES-GIANNINI, M.J. & DUARTE, A.J. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v.13, p. 248-252, 2001.
11. BIALEK, R., IBRICEVIC, A., FOTHERGIL, A. & BEGEROW, D. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, p. 3190-3193, 2000.
12. BOCCA, A. L., HAYASHI, E. E., PINHEIRO, A. G., FURLANETTO, A. B., CAMPANELLI, A. P., CUNHA, F. Q. AND FIGUEIREDO, F. Treatment of paracoccidioides brasiliensis-infected mice with a nitric oxide inhibitor

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3056-3063, 1998.
13. BORELLI, D. Concepto de reservárea. La reducida reservarea de la paracoccidioidomicosis. **Dermatol. Venez.** v. 4, p. 71, 1963.
14. BOZZI, A., REIS, B. S., PRADO, F. L. S., PEDROSO, E. P., LEITE, M. F. & GOES, A. M. Modulation of CD28 and CD86 expression in patients with paracoccidioidomycosis in different periods of treatment. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 60, p. 500-505, 2004.
15. BOZZI, A., PEREIRA, P. P. N., REIS, B. S., GOULART, M. I., PEREIRA, M. C. N., PEDROSO, E. P., LEITE, M. F. & GOES, A. M. Interleukin-10 and tumor necrosis factor- α single nucleotide gene polymorphism frequency in paracoccidioidomycosis. **Human Immunology**, v. 67, p. 931-939, 2006.
16. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.
17. BRITO, T. & FRANCO, M. F. Granulomatous inflammation. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 36, p. 185-192, 1994.
18. BRUMMER, E., CASTAÑEDA, E. & RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: Un update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 89-117, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

19. BURGOS, L. C., CANO, L. E. & RESTREPO, A. Purification of somatic antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. Preliminary study. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 27, p. 76-81, 1985.
20. CALICH, V. L., KIPNIS, T. L., MARIANO, M., NETO, C. F. & DA SILVA, W. D. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 12, p. 21-30, 1979.
21. CALICH, V. L., VAZ, C. A. AND BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res. Immunol.**, v. 149, p. 407-417, 1998.
22. CALICH, V. L. G. & KASHINHO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 615-623, 1998.
23. CALVI, S. A., PERAÇOLI, M. T. S., MENDES, R. P., MARCONDES-MACHADO, J., FECCHIO, D., MARQUES, S. A. & SOARES, A. M. V. C. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microb. Infect.**, v. 5, p. 107-113, 2003.
24. CAMARGO, Z. P., GUESDON, J. L., DROUHET, E. & IMPROVISI, L. Magnetic enzyme-linked immunosorbent assay (MELISA) for determination of specific IgG in paracoccidioidomycosis. **Sabouraudia.**, v. 22, p. 291-299, 1984.
25. CAMARGO, Z. P. & CANO L. E. R. Humoral immunity. In: **Paracoccidioidomycosis**. Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. CRC Press, Boca Raton, p. 1187-1201, 1994.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

26. CANO LE, BRUMMER E, STEVENS DA, RESTREPO A. An evaluation of the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for quantitation of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 24, p. 467-475, 1986. Erratum in: *J. Med. Vet. Mycol.*, v. 25, p.127, 1987.
27. CANO, L. E., SINGER-VERMES, L. M., VAZ, C. A., RUSSO, M. & CALICH, V. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1777-1783, 1995.
28. CANO, L. E., KASHINO, S. S., ARRUDA, C., ANDRÉ, D., XIDIEH, C. F., SINGER-VERMES, L. M., VAZ, C. A. C. & CALICH, V. L. G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infec. Immun.**, v. 66, p. 800-806, 1998.
29. CANO, L. E., SINGER-VERMES, L. M., COSTA, T. A., MENGEL, J. O., XIDIEH, C. F., ARRUDA, C., ANDRÉ, D. C., VAZ, C. A. C., BURGER, E. & CALICH, V. L. G. Depletion of CD8⁺ T cells *in vivo* impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 352-359, 2000.
30. CARVALHAES, M. S., DA SILVA, W. D., BIRMAN, E. G., SANT'ANNA, O. A., ABRAHAMSOHN, P. & KIPNIS TL. Experimental paracoccidioidomycosis in high and low antibody-producer mice. Evolution of the disease, its correlation with the humoral immune response and the patterns of tissue lesions. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.**, v. 137, p. 127-141, 1986.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

31. CARVALHO, M. J. A., ROSALIA, S. A. J., DAHER, B. S., SILVA-PEREIRA, I. S., FREITAS, S. M., SOARES, C. M. A. & FELIPE, M. S. S. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 39, p. 204-210, 2003.
32. CASOTTO, M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 1188-1193, 1990.
33. 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*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 4553-4560, 1996.
34. CROTT, L. S. P., LUCISANO-VALIM, Y. M., SILVA, C. L. & BARBOSA, J. E. Interactions of F1 fractions from different strains of *Paracoccidioides brasiliensis* with human complement and with human neutrophils. **Mycopathol.**, v. 140, p. 19-27, 1997.
35. CRUZ, M. C., GOLDSTEIN, A. L., BLANKENSHIP, J. R., DEL POETA, M., DAVIS, D., CARDENAS, M. E., PERFECT, J. R., MCCUSKER, J. H. & HEITMAN, J. Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. **Embo. J.**, v. 21, p. 546-559, 2002.
36. CUNHA, D.A., ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M., SUELI, M., FELIPE, S., SALEM-IZACC, S.M., DEEPE, G.S.Jr., SOARES, C.M. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, p. 374-377, 2002.
37. DA SILVA M. I., DE CARVALHO I. M., FRANCO T. N., CUNHA M. A., CHAMMA L. G., FOGACA J., FECCHIO D. & FRANCO M. The use of a mixture of somatic and culture filtrate antigens in the evaluation of the immune response to *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, p. 331-334, 1991.
38. DA SILVA, C. E. A., CORDEIRO, A., F., GOLLNER, A. M., CUPOLILO, S. M. N., QUESADO-FILGUEIRAS, M. & CURZIO, M. F. Paracoccidioidomycose do sistema nervoso central. **Arq. Neuropsiquiatria**, v. 58, p. 741-747, 2000.
39. DE MESSIAS, I. T. & MOHREN, D. Classical and alternative complement pathway activation in paracoccidioidomycosis. **J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.**, v. 4, p.91-95, 1994.
40. DEL NEGRO, G. M. B., PEREIRA, C. N., ANDRADE, H. F., PALACIOS, S. A., VIDAL, M. M. S., CHARBEL, C. E. & BENARD, G. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. **J. Med. Microbiol.** v. 49, p. 37-46, 2000.
41. DIAS, M. F., FILGUEIRA, A. L. & SOUZA, W. A morphological and cytochemical study of the interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and neutrophils. **Microsc. Microanal.**, v. 10, p. 215-223, 2005.
42. DÍEZ, S., GOMEZ, B. L., RESTREPO, A., HAY, R. J. & HAMILTON, A. J. *Paracoccidioides brasiliensis* 87-Kilodalton antigen, a heat shock protein

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- useful in diagnosis: characterization, purification and detection in biopsy material via immunohistochemistry. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 359-365, 2002.
43. DÍEZ, S., GOMEZ, B. L., McEWEN, J. G., RESTREPO, A., HAY, R. J. & HAMILTON, A. J. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for serodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1536-1542, 2003.
44. DINIZ, S. N., CISALPINO, P. S., KOURY, M. C., ANDRADE, G. M. Q., NOGUEIRA, M. G. S. & GOES, A. M. *In Vitro* Human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 353-360, 1999.
45. 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*. **Hum. Immunol.**, v. 62, p. 799-808, 2001.
46. 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**, v. 22, p. 485-492, 2004.
47. EDWARDS, M.R., SALAZAR, M.E., SAMSONOFF, W.A., CANO, L.E., OSTRANDER, G.A. & RESTREPO, A. Electron microscopy study of conidia

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- produced by the mycelium of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**. v. 114, p. 169-177, 1991.
48. FAVA, S. C. & FAVA NETTO, C. Epidemiology Surveys of Histoplasmin and Paracoccidioidin Sensitivity in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 40, p.155-164, 1998.
49. FERREIRA-DA-CRUZ, M. F., FRANCESCONI-DO-VALE, A. C., ESPINERA, M. C., WANKE, B. & GALVÃO-CASTRO, B. Study of antibodies in paracoccidioidomycosis: follow-up of patients during and after treatment. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 28, p. 151-157, 1990.
50. FIGUEROA, J.I., HAMILTON, A.J., ALLEN, M.H. & HAY, R.J. Isolation and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* 58kDa extracellular glycoprotein which is recognized by human immune sera. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, p. 566-572, 1995.
51. FRANCO, M. F., MONTENEGRO, M. R., MENDES, R. P., MARQUES, S. A., DILLON, N. L., MOTA, N. G. S. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 20, p. 129, 1987.
52. FRANCO, M., PERACOLI, M. T., SOARES, A., MONTENEGRO, R., MENDES, R. P. AND MEIRA, D. A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v. 5, p. 115-149, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

53. FRANCO, M. V. G., GOES, A. M. & KOURY, M. C. Model of in vitro granulomatous hypersensitivity in human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 137, p. 129-136, 1997.
54. FOX, D. S., CRUZ, M. C., SIA, R. A., KE, H., COX, G. M., CARDENAS, M. E. & HEITMAN, J. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 835-849, 2001.
55. GOES, T. S., GOES, V. S., KALAPOTHAKIS, E., LEITE, M. F. & GOES, A. M. Identification of immunogenic proteins from *Paracoccidioides brasiliensis* antigenic fractions F0, FII and FIII. **Immunology Letters**, v. 101, p. 24-31, 2005.
56. GOLDANI, L. Z., PICARD, M., SUGAR, A. M. Synthesis of heat-shock proteins in mycelia and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Méd. Microbiol.**, v. 40, p. 124-128, 1994.
57. GOMES, M. G., CISALPINO, P. S., TABORDA, C. P. & DE CAMARGO, Z. P. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 3478-3480, 2000.
58. GONZALEZ, A., DE GREGORI, W., VELEZ, D., RESTREPO, A. & CANO, L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 5, p. 2546-2552, 2000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

59. HAMDAN, J. S. & ROCHA, R. I. Epidemiologia da Paracoccidioidomicose. **An. Fac. Med. UFMG**, v. 36, p. 52-61, 1987.
60. HAMILTON, A. J. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii; current status and future trends. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 351-364, 1998.
61. 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. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3543-3546, 1994.
62. HOGAN, L. H., KLEIN, B. S. & LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 469-488, 1996.
63. JIMENEZ, B. E. & MURPHY, J. W. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. **Infect. Immun.**, v. 46, p. 552-558, 1984.
64. KANETSUNA, F., CARBONELL, L. M., MORENO, R. E. & RODRIGUEZ, J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol.** v. 97, p. 1036-41, 1969.
65. 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. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 20, p. 89-97, 2000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

66. KLEE, C. B., CROUCH, T. H. & KRINKS, M. H. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 76, p. 6270-6273, 1979.
67. KLEE, C. B., DRAETTA, G. F. & HUBBARD, M. J. Calcineurin. *Adv Enzymol Relat Areas Mol. Biol.*, v. 61, p. 149-200, 1988.
68. KOTHE, G. O. & FREE, S. J. Calcineurin subunit B is required for normal vegetative growth in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 23, p. 248-258, 1998.
69. KRAUS, P. R. & HEITMAN, J. Coping with stress: calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi. **Biochem. Biophys. Res Commun.**, v. 311, p. 1151-1157, 2003.
70. KRETSINGER, R. H. & NOCKOLDS, C. E. Carp muscle calcium-binding protein.II. Structure determination and general description. **J. Biol. Chem.**, v. 248, p. 3313-3326, 1973.
71. KURITA, N., OARADA, M. & BRUMMER, E. Fungicidal activity of human peripheral blood leukocytes against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Med. Mycol.**, v. 43, n. 5, p. 417-422, 2005.
72. LACAZ CS. *Paracoccidioidis brasiliensis*. Morfologia, ciclo evolutivo, manutenção em vida saprofítica, biologia, virulência, posição sistemática. *In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo A.M., Paracoccidioidomicose Blastomicose Sul Americana*. São Paulo, Sarvier, Cap 2, 11-21, 1982.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

73. LACAZ CS. Paracoccidioidomicose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. **Micologia Médica**, 8^a ed., São Paulo, Sarvier, Cap 13, 248-297, 1991.
74. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 224, p. 680-685, 1970.
75. LEWIT-BENTLEY, A. & RETY, S. EF-hand calcium-binding proteins. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 10, p. 637-643, 2000.
76. LETUNIC, I., GOODSTADT, L., DICKENS, N. J., DOERKS, T., SCHULTZ, J., MOTT, R., CICCARELLI, F., COPLEY, R. R., PONTING, C. P. & BORK, P. Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. 242-244.
77. LUNDE, M. M.; OTTESEN, E. A. & CHEEVER, A. W. Serological differences between acute and chronic schistosomiasis mansoni detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 28, p. 87-91, 1979.
78. MANIATIS & FRITSCH. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2 ed. Sambrook, 1987.
79. MCEWEN, J. G., BEDOYA, V., PATINO, M. M., SALAZAR, M. E. & RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 25, p. 165-75, 1987.
80. McEWEN, J.G., ORTIZ, B. L., GARCIA, A. M., FLOREZ, A. M., BOTERO, S. & RESTREPO, A. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 20, p. 125-131, 1996.
81. MENDES, R. P. Antifungal drugs and therapeutic schedules – Is a consensus possible? . **Rev. Inst. Med. Trop. S. P.**, v. 47, suppl. 14, p. 8, 2005.
82. MENDES-GIANNINI, M. J., RICCI, L. C., UEMURA, M. A., TOSCANO, E. AND ARNS, C. W. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 189-197, 1994.
83. MENDES-GIANNINI, M. J., TAYLOR, M. L., BOUCHARA, J. B., BURGER, E., CALICH, V. L., ESCALANTE, E. D., HANNA, S. A., LENZI, H. L., MACHADO, M. P., MIYAJI, M. et al. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med. Mycol.**, v. 38, Suppl 1, p. 113-123, 2000.
84. MILAN, D., GRIFFITH, J., SU, M., PRICE, E. R. & MCKEON, F. The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. **Cell**, v. 79, p. 437-447, 1994.
85. MOSCARDI-BACCHI, M., SOARES, A., MENDES, R., MARQUES, S., FRANCO, M. “In situ” localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 27, p. 149-158, 1989.
86. MUNK, M. E., KAJDACSZY-BALLA, A., DEL NEGRO, G., CUCE, L. C. & DA SILVA, W. D. Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 317-321, 1992.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

87. NAIFF, R. D., FERREIRA, L. C., BARRETT, T. V., NAIFF, M. F. & ARIAS, J. R. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v. 28, p. 19-27, 1986.
88. NEVES, J. Diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. In: Patrus, O. A., Costa, P. U., Neves, J. **Blastomicose Sul-americana (Paracoccidioidomicose)**. 2ª ed, cap. 68, p. 825-835, 1983.
89. OLIVEIRA, S. J., MAMONI, R. L., MUSATTI, C. C., PAPAORDANOU, P. M. O. & BLOTTA, M. H. S. L. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparisons with infected and non-infected controls. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 139-144, 2002.
90. ORTIZ, B. L., GARCIA, A. M., RESTREPO, A. & McEWEN, J. G. Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 3, p. 239-241, 1996.
91. ORTIZ, B.L., DÍEZ, S., RÁN, M.E., RIVAS, J.M., ROMERO, M., CAICEDO, V., RESTREPO, A. & McEWEN, J.G. Use of the 27-Kilodalton Recombinant Protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in Serodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Clin. Diagnostic Lab. Imunn.**, v. 5, p. 826-830, 1998.
92. **Paracoccidioides brasiliensis**: Endemic areas of paracoccidioidomycosis. set. 2002. Disponível em: <http://www.pfdb.net/photo/makimura_k/box0/photolist.php> Acesso em 15 jan. 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

93. PATIFIO, M.M., BURGOS, L.C. & RESTREPO, A. Effect of temperature on the mycelium to yeast transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia J. Med. Vet. Mycol.** v. 22, p. 509-511, 1984.
94. PERAÇOLI, M. T., SUGIZAKI, M. F., MENDES, R. P., NAIFF, R. & MONTENEGRO, M. R. *Paracoccidioides brasiliensis* isolated from armadillos is virulent to Syrian hamsters. **Mycopathologia.** v. 148, p. 123-130, 1999.
95. 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 Infect.**, v. 5, p. 413-418, 2003.
96. POPI, A. F., LOPES, J. D. & MARIANO, M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. Na evasion mechanism of the fungus. **Cell. Immunol.**, v. 218, p. 87-94, 2002.
97. 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. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 345-348, 1998.
98. REIS, B. S., BOZZI, A., PRADO, F. L. S., PEREIRA, M. C. N., FERREIRA, F. E., GODOY, P., MORO, L., PEDROSO, E. P., LEITE, M. F. & GOES, A. M. Membrane and extracellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (Mexo): Identification of a 28-kDa protein suitable for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Immunolog. Method.**, v. 307, p. 118-126, 2005.
99. RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis. **Acta Med. Colomb.** v. 3, p. 33-36, 1978.
100. RESTREPO, A., JIMENEZ, B., DE BEDOUT, C. Survival of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells under microaerophilic conditions. **Sabouraudia**, v. 19, p. 301-305, 1981.
101. RESTREPO, A., SALAZAR, M.E., CANO, L.E., STOVER, E.P., FELDMAN, D. & STEVENS, D.A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 46, p. 346-353, 1984.
102. RESTREPO, A. et al. Hormonal influences in the host-interplay with *Paracoccidioides brasiliensis*. In: **Fungal interactions** (Stevens, D.A. et al.) p. 125-133, National Foundation of Infectious Diseases, 1997.
103. RESTREPO, A., MCEWEN, J. G. & CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis* : how far from solving the riddle ? **Med. Mycol.** v. 39, p. 232-241, 2001.
104. RESTREPO-MORENO, A. **Infections agents and pathogenesis – fungal infections and immune responses**. Edited by Juneann W. Murphy, Herman Friedman & Mauro Bendinelli. New York, cap. 10, p. 251-276, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

105. RIBEIRO, O.D. Nova terapêutica para blastomicose. **Publ. Méd.**, v. 12, p. 36-54, 1940.
106. SAMSONOFF, W.A., SALAZAR, M.E., MCKEE, M.L., RESTREPO, A. & CANO, L.E. Scanning electron microscopy of the conidia produced by the mycelium of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**. v. 114, p. 9-15, 1991.
107. SAN-BLAS, G., SAN-BLAS, F., RODRIGUES, L.E. & CASTRO, C.J. A model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. **Acta Cient. Venez.** v. 38, p. 202-211, 1987.
108. SAN-BLAS, G., RESTREPO, A., CLEMONS, K., STEVENS, D. A., SAN-BLAS, F., PUCCIA, R., TRAVASSOS, L. R., FIGUEROA, J. I., HAMILTON, A. J., BARTHOLOMEW, M. A. et al. Paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 30, Suppl 1, p. 59-71, 1992.
109. SANGER, F., NICKLEN, S. AND COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
110. SANGLARD, D., ISCHER, F., MARCHETTI, O., ENTENZA, J. & BILLE, J. Calcineurin A of *Candida albicans* : involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 1377-1387, 2003.
111. SILVA, C. L., ALVES, L. M. & FIGUEIREDO, F. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused

- by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiology**, v. 140, p. 1189-1194, 1994.
112. SILVEIRA, L.H., DOMINGOS, I. H., KOUCHI, K., ITANO, E. N., SILVA, E. A., LANDGRAF, V. O., WERNECK, S. M., CAMARGO, Z. P. & ONO, M. A. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. **Mycopathologia**, v. 162, p. 325-329, 2006.
113. SNAPPER, C. M., MARCU, K. B. & ZELAZOWSKI, P. The immunoglobulin class switch: beyond "accessibility". **Immunity**., v. 6, p. 217-223, 1997.
114. SOUTO, J. T., FIGUEIREDO, F., FURLANETTO, A., PFEFFER, K., ROSSI, M. A. & SILVA, J. S. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.** v. 156, p. 1811-1820, 2000.
115. SPETH, C., RAMBACH, G., LASS-FLÖRI, C. DIERICH, M. P. & WURZNER, R. The role of complement in invasive fungal infections. **Mycoses**, v. 47, p. 93-103, 2004.
116. STEMMER, P. M. & KLEE, C. B. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. **Biochemistry**, v. 33, p. 6859-6866, 1994.
117. SUZUKI, E., TOLEDO, M. S., TAKAHASHI, H. K. et al. 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 cruzii*. **Glycobiology**, v. 7, p. 463-468, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

118. TABORDA, C. P., JULIANO, M. A., PUCCIA, R., FRANCO, M. & TRAVASSOS, L. R. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 786-793, 1998.
119. TELLES, F. Blastomicose sul-americana: paracoccidioidomicose. **Boletim epidemiológico – Secretaria de Estado de Saúde**. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/.../pcm_sesa.htm>. 2005.
120. THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. Clustalw: improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p.4673-4680, 1994.
121. TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
122. VAZ, C.A.C., MACKENZIE, D.W.R., HEARN, V.M., CAMARGO, Z.P., SINGER-VERMES, L.M., BURGER, E. & CALICH, V.L.G. Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the curse of experimental paracoccidioidomycosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 88, p. 119-123, 1992.
123. VERGARA, M.L. & MARTINEZ, M. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**. v. 144, p. 131-133, 1999.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

124. VICENTINI, A. P. et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 4-7, 1994.
125. VISBAL, G., SAN-BLAS, G., MURGICH, J & FRANCO, H. Paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. **Curr. Drug. Targets. Infect. Disord.**, v. 5, p. 211-226, 2005.
126. WARREN, K. S. New scientific opportunities and old obstacles in vaccine development. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 83, p. 9275-9277, 1986.
127. WATANABE, Y., PERRINO, B. A. & SODERLING, T. R. Activation of calcineurin A subunit phosphatase activity by its calcium-binding B subunit. **Biochemistry**, v. 35, p. 562-566, 1996.
128. YARZÁBAL, L. Composición antigénica de *Paracoccidioides brasiliensis*, p. 59-67. *In*: Del Negro, G.Lacaz, C. S. & Fiorillo, A. M. **Paracoccidioidomicose. Blastomicose sul-americana.** Sarvier-EDUSP, São Paulo, 1989.
129. YOSHIDA, T., TODA, T. & YANAGIDA, M. A calcineurin-like gene *ppb1+* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. **J. Cell Sci. Jul.**, v.107, p.1725-1735, 1994.

VIII - ANEXOS

**ANEXO I: Aprovação do Comitê de Ética
em Pesquisa Animal da UFMG (CETEA)**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 24/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Clonagem e caracterização imunológica de proteínas presentes na fração protetora F0 de Paracoccidioides brasiliensis**", que tem como responsável **Alfredo Miranda de Góes**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **14/ 06/2006**.

Este certificado expira-se em **14/ 06 / 2011**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 24/2006**, related to the project entitled "**Molecular cloning, purification and immunological characterization of proteins from the protective fraction F0 of Paracoccidioides brasiliensis**", under the supervision of **Alfredo Miranda de Góes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 14, 2006**.

This certificate expires in **June 14, 2011**.

Belo Horizonte, 14 de Junho de 2006.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Prédio da Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 7 Andar, Sala 7018
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027
www.ufmg.br/prpq/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

**ANEXO II: Aprovação do Comitê de Ética
em Pesquisa da UFMG (COEP)**



Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

PARECER

Nº PROCESSO	Etic 25/03
TÍTULO	Imunofenotipagem de pacientes com paracoccidiodomicose
PESQUISADORES	Prof. Alfredo Miranda de Goes (orientador) Maria de Fátima Leite (pesquisadora) Patrícia L. Falcão Valença (colaboradora) Énio Roberto Pietra (colaborador) Adriana Bozzi (doutoranda)
INSTITUIÇÃO	Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina da UFMG
HISTÓRICO	Projeto recebido pelo relator em 12 de fevereiro de 2003, com correspondência encaminhando para parecer do COEP datada de 20 de março de 2002, contendo parecer favorável da Câmara do Departamento de Bioquímica e Imunologia, datado de 13 de março de 2002. Segundo o parecer do relator à Câmara, o projeto é relevante, bem fundamentado, e atende às exigências da Resolução 196/96 do CNS. O projeto também foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas. O protocolo está completo e contém toda a documentação necessária para avaliação.
MÉRITO	
<ul style="list-style-type: none"> • TÍTULO • PESQUISADORES • LOCAL DE ORIGEM • LOCAL DE REALIZAÇÃO • INTRODUÇÃO • OBJETIVOS • MATERIAL E MÉTODOS • SELEÇÃO EQUITATIVA DOS SUJEITOS • RELAÇÃO RISCO BENEFÍCIO • MINIMIZAÇÃO DE RISCOS • PRIVACIDADE E CONFIDENCIALIDADE 	<p>O título é adequado e informativo em relação à pesquisa.</p> <p>O grupo de pesquisadores envolvidos nos projeto é altamente qualificado, e inclui uma aluna de doutorado.</p> <p>Pesquisa aprovada pela Unidade de origem.</p> <p>A pesquisa será realizada Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz. Não há, contudo, documento que indique a aprovação da realização do projeto neste Centro.</p> <p>O objetivo do trabalho é caracterizar o perfil imunológico de pacientes com paracoccidiodomicose frente aos antígenos extracelulares (exoantígenos) e somáticos (PbAg) do <i>P. brasiliensis</i>.</p> <p>Serão utilizadas amostras de sangue de indivíduos saudáveis e de pacientes infectados com <i>P. brasiliensis</i>. Os pacientes serão classificados como agudos ou crônicos e, baseando-se em parâmetros clínicos, serão divididos em dois grupos: tratados e não-tratados. Serão considerados tratados aqueles que se submeteram a tratamento pelo mínimo de dezoito meses, e cujos sintomas foram eliminados.</p> <p>O sujeitos serão 40 indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 20-50 anos, pacientes do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz</p> <p>A pesquisa não utiliza procedimentos que possam acarretar riscos aos participantes, a não ser aqueles envolvidos em uma coleta de 20 ml. de sangue, como hipotensão seguida de náusea.</p> <p>Procedimentos usuais de biossegurança: seringas descartáveis, etc.</p> <p>A confidencialidade é assegurada.</p>

- **MONITORAMENTO DE SEGURANÇA E DOS DADOS AO LONGO DA PESQUISA** Adequada.
 - **TERMO DE CONSENTIMENTO** O termo de consentimento está redigido em linguagem demasiado técnica, não acessível aos sujeitos da pesquisa, especialmente se levarmos em conta que os afetados por este tipo de micose podem ser, por exemplo, população de baixa renda ou provenientes da zona rural. Mesmo na linguagem técnica, tampouco esclarece adequadamente os sujeitos sobre a pesquisa, no que diz respeito aos objetivos do projeto, riscos envolvidos – como, por exemplo, a possibilidade de hipotensão e náusea na coleta de sangue - ressarcimento ou não de despesas, endereço do COEP, etc, etc.
 - **CRONOGRAMA** O projeto foi iniciado em Nov. 2001 e sua conclusão está prevista para Nov. 2005
 - **ORÇAMENTO** Projeto financiado pela CAPES
 - **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** Adequadas
 - **GERAÇÃO DE CONHECIMENTOS** Há necessidade de maiores pesquisas sobre o tema.
 - **RELEVÂNCIA** O projeto é relevante.
 - **EXEQUIBILIDADE** O projeto é exequível.
- PARECER CONCLUSIVO** SMJ, sou de parecer que o projeto seja colocado em diligência para reformulação do termo de consentimento livre e esclarecido e para a devida aprovação pelo Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz.