

**COMPONENTES ANTIGÊNICOS DE ALTA MASSA MOLECULAR DE
PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E
IMPLICAÇÕES NA RESPOSTA TH1**

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.039-009>

Mari Sumigawa Kaminami

Mestre, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

Adriane Lenhard Vidal

Doutor, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, CPTL, Brasil

Bianca Dorana de Oliveira Souza

Mestre, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

Flávio Hiroshi Itano

Mestre, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

Mario Augusto Ono

Doutor, UNIFESP, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

Franciele Ayumi Semencio Chiyoda-Rodini

Doutor, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

Igor Massahiro de Souza Suguiura

Mestre, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

Ayako Sano

Doutor, Universidade de Chiba, Chiba, Japão, aposentada pela Universidade de Ryukyus, Okinawa, Japão

Eiko Nakagawa Itano

Doutor, UNIFESP, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil
E-mail: itano@uel.br; eikoitano@gmail.com (Correspondência)

RESUMO

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma infecção crônica causada pelos fungos *Paracoccidioides brasiliensis* ou *P. lutzii*, cuja defesa do hospedeiro é mediada por linfócitos Th1. Este estudo visou purificar e avaliar o efeito de componentes de alta massa molecular (hMM) de *P. brasiliensis* na resposta imune celular. Os antígenos solúveis do fungo (Pb18) foram submetidos a cromatografia em coluna de Sephadex G-200 seguida de HPLC, obtendo-se a fração F17 (~380 kDa) e sua subfração F17-IV (~70 kDa), ambas reativas a soros de pacientes com PCM. As frações foram testadas *in vitro* com as células esplênicas de camundongos infectados, resultando em resposta linfoproliferativa e aumento dos níveis de INF- γ e IL-10, sem alteração de IL-4. Esses achados indicam a ativação da resposta imunológica Th1 e sugerem que a fração de ~380 kDa pode se degradar gerando subcomponentes ativos de ~70 kDa. O subcomponente de ~70 kDa parece ser distinto da gp70 descrita na literatura, dada sua capacidade de induzir INF- γ . Os resultados apontam o potencial imunogênico

desses componentes, destacando sua relevância para o desenvolvimento de vacinas ou terapias contra a PCM.

Palavras-chave: Citocinas, Fungo, INF- γ , Paracoccidioidomicose, Terapia, Vacina.

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença infecciosa crônica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e a nova espécie *Paracoccidioides lutzii*. Esta micose é endêmica na América Latina, com maior prevalência no Brasil, afetando principalmente trabalhadores rurais (San-Blas, 1993, Shikanai-Yassuda et. al., 2017). O fungo apresenta duas formas morfológicas distintas, dependendo da temperatura: uma forma leveduriforme, presente nos tecidos do hospedeiro ou quando cultivado a 35-37°C (Queiroz-Telles, 1994), e uma forma miceliana em temperatura ambiente. Essa transição morfológica é reversível e ocorre em resposta à variação de temperatura, sendo regulada por enzimas que modificam a síntese de glucanas na parede celular (San-Blas, 1982).

Presume-se que o fungo *P. brasiliensis* ou *P. lutzii* habite o solo na forma miceliana, e a infecção ocorre pela inalação de propágulos fúngicos. A exposição ao fungo pode resultar em uma infecção assintomática ou no desenvolvimento da doença. Na maioria dos casos, forma-se um complexo pulmonar primário que regride espontaneamente com o estabelecimento de uma imunidade específica. Contudo, o fungo pode permanecer em estado de latência por anos em lesões residuais pulmonares ou extrapulmonares. Nas formas progressivas e disseminadas, o fungo pode atingir pulmões, mucosas, linfonodos, pele, glândulas suprarrenais e outros órgãos ou sistemas (Londero & Del Negro, 1986; Padilha-Gonçalves, 1985, Shikanai-Yassuda et. al., 2017, Cezar-dos-Santos et al., 2020).

Com base na evolução clínica e natural da doença, a PCM é classificada em quatro formas principais: **Infecção**: fase inicial, geralmente assintomática; **Forma aguda ou subaguda (juvenil)**: mais rara e severa, com envolvimento de linfonodos, baço e fígado; **Forma crônica (adulto)**: mais comum, podendo variar de forma localizada (unifocal) a disseminada (multifocal), dependendo da eficiência da imunidade; **Forma residual (sequelas)**: caracteriza-se por lesões permanentes resultantes de uma infecção anterior (Franco et al., 1987, Shikanai-Yassuda et. al., 2017).

O perfil imune também varia de acordo com a forma da doença: **Forma crônica-unifocal**: Predomínio de resposta de células T-helper 1 (Th1); **Forma aguda ou crônica-disseminada (multifocal)**: Predomínio de resposta de T-helper 2 (Th2), caracterizada por uma maior produção de imunoglobulinas G (IgG) e pela liberação de citocinas específicas (Singer-Vermes et al., 1993; Baida et al., 1999; Cezar-dos-Santos et al., 2020).

A imunidade celular desempenha um papel fundamental na defesa contra o fungo (Burger et al., 1996). Pacientes com infecção disseminada frequentemente apresentam um teste intradérmico negativo com paracoccidioidina e reações granulomatosas pouco definidas (Montenegro & Franco, 1994). Por outro lado, a imunidade humoral não é considerada protetora, pois a produção exacerbada de anticorpos está associada à gravidade da doença (Singer-Vermes et al., 1993; Mello et al., 2002; Cezar-dos-Santos et al., 2020).

Diversas glicoproteínas e outros componentes do fungo estão relacionados à sua patogenicidade e à resposta imunológica. Entre os principais componentes, destacam-se as glicoproteínas de 27-kDa (gp27), 43-kDa (gp43), 55-kDa (gp55), 70-kDa (gp70) e 87-kDa (gp87). Também estão presentes glicoconjugados de alta massa molecular (hMM) e glicolipídeos obtidos por diferentes métodos de extração (Puccia et al., 1986; Blotta & Camargo, 1993; Toledo et al., 1995; Ortiz et al., 1998; Salina et al., 1998, Marquez et al., 2005). A fração polidispersa de alta MM, rica em carboidrato e com migração eletroforética heterôgena, foi descrita pela primeira vez por Puccia et al. (1986) analisando antígeno de *P. brasiliensis* B339. Esta fração também foi detectada em *P. brasiliensis* Pb18 e em 20 isolados clínicos (Fredrich et al., 2010) e na nova espécie *P. lutzii* – LDR2 (Assolini et al., 2021), sugerindo a presença constante deste componente em *Paracoccidioides spp.*

Esses componentes desempenham um papel crucial na imunomodulação da PCM e podem influenciar tanto a defesa do hospedeiro quanto a sobrevivência do fungo. Pesquisas apontam que a resposta imune a componentes de alta massa molecular (hMM) estão associados a evolução clínica da PCM. Marquez et al. (2005) observaram que pacientes com PCM crônica apresentaram altos níveis de IgG, mas não de IgE, contra o componente de 380 kDa do *P. brasiliensis*, sugerindo que este não induz resposta Th2.

No contexto experimental, Pavanelli et al. (2007) avaliaram o efeito da fração de alta massa molecular do fungo em camundongos Balb/c e evidenciaram promoção de imunidade protetora.

Este trabalho caracterizou parcialmente os componentes de alta massa molecular (hMM) do fungo *P. brasiliensis* e analisou sua ação imunomoduladora. Os achados reforçam a importância de componentes imunogênicos no desenvolvimento de estratégias de vacinas ou terapias para a PCM.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DE ANTÍGENO *CELL-FREE* (CFA PB18)

O antígeno *cell-free* foi obtido de *P. brasiliensis* cepa 18 (Pb18), cultivado em Ágar Sabouraud por 5 dias a 35°C, de acordo com Camargo et al. (1991) com algumas modificações. Após cultivo de 5 dias, a massa fúngica coletada foi transferida para tubo contendo solução salina-fosfato tamponada (PBS 0,15M e pH 7,4), com inibidor de protease PMSF a 2,5 mM (Sigma) e solução thimerosol a 0,02%. Foi homogeneizada em vortex durante 15 minutos e a seguir centrifugada a 13.600 x g a 4°C. A concentração da proteína foi determinada pela Técnica de Folin (Lowry et al., 1951).

2.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX G-200

Amostra de 9 ml de CFA Pb18 (4 mg/ml) foi aplicada em Coluna de Sephadex G-200 seguida de eluição em PBS 0,15M pH 7,4. As frações obtidas pelo coletor automático de frações, foram analisadas em espectrofotômetro (Spectrum SP-2000UV) a 280 nm.

2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Amostra de 100 μ L da fração F17 (Coluna Sephadex G-200), foi refracionada em coluna de HPLC (Varian Pro Star), em coluna semi-analítica C18. Foi utilizado tampão gradiente: 50% tampão acetato de amônio (Merck, Alemanha) 300 mM pH 7,0 e 50% de água bidestilada (Milli Q). A pressão empregada foi 1410 a 97 bars, 2 ml/min. As concentrações das proteínas de sub-frações foram dosadas pela técnica de Folin e armazenadas a -80°C .

2.4 DOTBLOTTING DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS POR FRACIONAMENTO DE F-17 POR COLUNA DE HPLC

As amostras de 2 μ L de frações e sub-frações de hMM foram pipetadas em membrana de nitrocelulose (Gibco Invitrogen Corporation, Long Island, New York, EUA). Após o bloqueio com o tampão de bloqueio, as membranas foram lavadas e incubadas com “pool” de soros de pacientes PCM (banco biológico do Laboratório de Imunologia Aplicada, CCB, UEL/CONEP268, processo 33455.2011.06)), diluído 1:40, por 2h a 37°C . Após novas lavagens a membrana foi incubada com conjugado peroxidase anti-IgG humano (Sigma 8775) por 1:30 h a 37°C . A reação foi evidenciada com solução de diaminobenzidina (DAB - Sigma) e peróxido de hidrogênio em solução de PBS 0,15M.

2.5 IMMUNOBLOTTING

Inicialmente as amostras de CFA Pb18, fração F17 e sub-fração de hMM-HPLC (F17-IV) e padrão de proteína de MM de 10-200 kDa (Invitrogen 1078-010), foram submetidas a eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida de 5-15%. Após a corrida, em tampão tris glicina 1M (Pharmacia Biotech –Sweden e Sigma Co., Germany), pH 8,2 a 100 V, as amostras foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Gibco Invitrogen Corporation, Long Island, New York, USA) em tampão tris-HCl-metanol a 23 V por 18 horas e 100 V por 1 h. A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio, por 1 h à temperatura ambiente, seguida de lavagens e incubação com “pool” de soros de pacientes com PCM diluído 1:40 (2h a 37°C . Após novas lavagens foi adicionado conjugado peroxidase anti-IgG humano diluído 1:3000 (Sigma A-8775, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), por 1:30 h a 37°C . A membrana foi novamente lavada, a qual foi revelada com DAB (diaminobenzidina-Sigma Co., USA) em PBS 0,15M e peróxido de hidrogênio.

2.6 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C

Dez camundongos Balb/c machos de 4 a 6 semanas foram infectados por via endovenosa com 1×10^6 céls./ml de *P. brasiliensis* (Pb18) e como controle 6 camundongos foram inoculados com solução de PBS 0,15M (estéril) e eutanasiados após 28 dias de infecção . Os camundongos, foram manipulados

conforme normas e autorização do Comitê de ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Londrina (CEEAA nº 67/08).

2.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA

Amostras de suspensão celular de baço de camundongos infectados com *P. brasiliensis* Pb18 durante 28 dias ou não infectadas foram tratadas com tampão de cloreto de amônio 0,14M pH 7.2, para lise das hemácias, centrifugadas e lavadas com PBS estéril. As células obtidas foram ressuspensas em meio RPMI (Sigma Co., USA) completo (L-glutamina, Hepes, gamicina e 10% de soro bovino fetal) na concentração de 1×10^6 células/ml, adicionando-se: F17(100 µg/ml), ou F17-IV (50 µg/ml) ou exoantígeno (50 µg/ml) com 100 µL de suspensão celular, incubando-se por 120 horas. Dezoito horas antes das células serem colhidas, foi adicionado 3,5 µL de timidina tritiada. O índice de estimulação das respostas linfoproliferativa foi calculado através da liberação da radioatividade incorporada em líquido de cintilação, contadas em aparelho cintilador Beckmann LS 6.800. O índice de proliferação foi calculado pela média de leitura das triplicatas da resposta linfoproliferativa a antígeno, em contagem por minuto (cpm), dividida pela média de leitura das triplicatas da resposta linfoproliferativa na ausência de antígeno.

2.8 CULTURA DE LINFÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DE NÍVEIS DE CITOCINAS

A cultura foi realizada como descrito no item anterior, porém com tempo de incubação de 72 horas. Amostras de sobrenadantes foram colhidas e armazenadas a -20°C para posterior análise. Anticorpos anti-IL-10, anti-IL-4 e anti-INF- γ na concentração de 3 µg/ml (50 µL) foram diluídos em tampão bicarbonato 0,06M pH 9,6, adicionados em imunoplaquetas (TPP, Switzerland) e incubadas por 18 horas a 4°C em câmara úmida. As placas foram lavadas com tampão de lavagem, seguida de bloqueio com 100 µL de tampão PBS contendo soro bovino fetal 10% com pH 7.0; 0,05% de tween 20 e leite mólico 5%. Após incubação por 1 hora a temperatura ambiente, foram lavadas e adicionados 50 µL/orifício de padrões de IL-10, IL-4 e INF- γ , iniciando-se com uma diluição seriada de 2ng/ml em PBS/SFB 10% de pH7,0. Foram adicionados 50 µL de sobrenadante de cultura, incubadas por 2h a temperatura ambiente. Após lavagens, foi adicionando 50 µL/orifício de anti-IL-10, anti-IL-4 e anti-INF- γ biotilado, incubando-se por 1h a temperatura ambiente. Após nova lavagens adicionou-se 50 µL do conjugado avidina-peroxidase, incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente e no escuro. A reação foi revelada com solução de OPD em tampão substrato e peróxido de hidrogênio, leitura realizada a 450 nm no aparelho Molecular Devices Emax (*precision microplates reader*).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

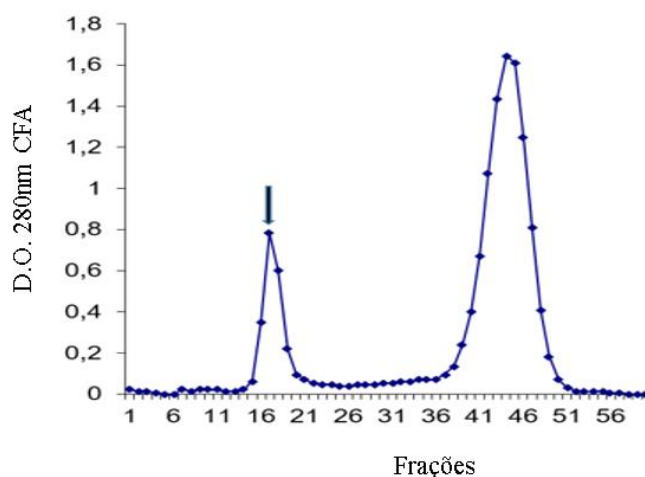
Foi realizada análise de variância (ANOVA) e teste Tukey-Kramer. Os valores descritos pela média $\pm$ desvio padrão, e os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 CROMATOGRAFIA DE CFA (PB18) EM COLUNA DE SEPHADEX G-200

O perfil espectrofotométrico das frações de CFA Pb18 em Coluna de Sephadex G-200, a 280 nm foi demonstrado na figura 1. O primeiro pico (tubo 17) foi considerado fração de hMM, denominada de F17.

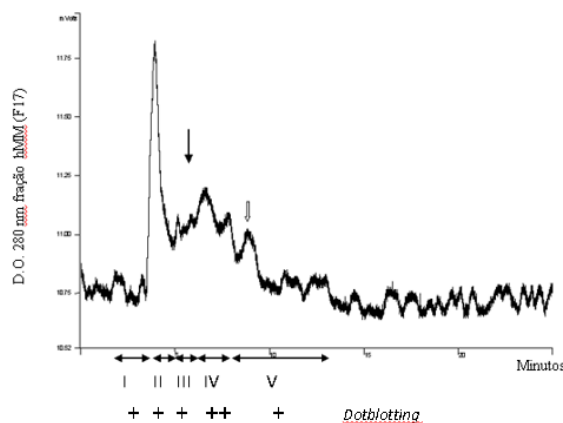
Figura 1: Perfil espectrofotométrico a 280 nm de CFA de Pb18 por cromatografia em coluna Sephadex G-200. A seta (fração 17) corresponde ao antígeno de hMM, denominado F17.



3.2 RE-FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO F17 EM COLUNA DE HPLC

O re-fracionamento de 100 μ L de F17 (116,8 μ g/ml) em coluna de HPLC, resultou no perfil espectrofotométrico a 280 nm demonstrado na figura 2. A análise das frações eluídas por *dotblotting*, resultou em frações reativas com pool de soros de pacientes com PCM. Estas frações foram misturadas formando os pools I a V: F17-I (fração 6 a 9), F17-II (fração 10 a 15), F17-III (fração 16 a 19), F17-IV (fração 20 a 26) e F17-V (fração 27 a 45), sendo a fração IV mais fortemente reativa. Esta fração mais reativa foi denominada de F17-IV. Considerando os padrões de MM utilizados; ovoalbumina (45 kDa) e IgG humana (150 kDa), a subfração F17-IV foi estimada como tendo MM entre 45-150kDa.

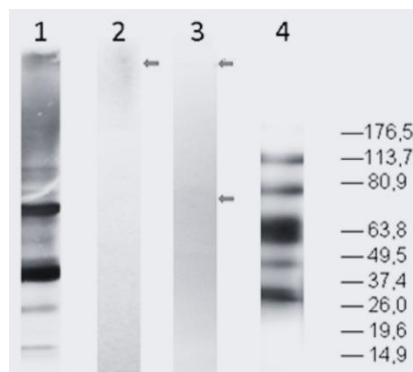
Figura 2: Perfil espectrofométrico a 280 nm da fração de hMM (F17) refracionada em coluna C18 de HPLC. Padrões: ovoalbumina 45 kDa e IgG humana de 150 kDa. As frações I,II,III, IV e V foram positivas por *dotblotting* com pool de soros de pacientes com PCM. A sub-fração hMM na faixa de MM entre 45-150kDa, denominada de F17-IV foi a fração mais reativa.



3.3 IMMUNOBLOTTING DAS FRAÇÕES (F1) E SUB-FRAÇÕES (F1-17) DE HMM

Os resultados de *immunoblotting* demonstraram muitas bandas reativas no CFA com anticorpos de pacientes com PCM. Na fração F17 foi observada banda de ~380 KDa (assinalada com seta) e na sub-fração F17-IV, banda fraca de ~380 KD, banda um pouco mais evidente de ~70 KDa (assinalada com seta) e mais uma banda fraca em torno de 43kDa, não assinalada (Figura 3).

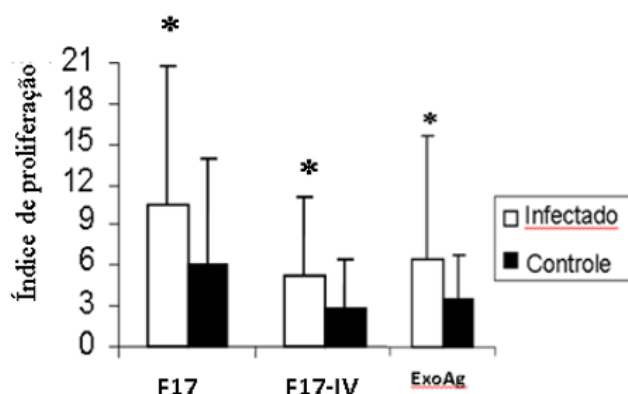
Figura 3: Resultado de *immunoblotting* das amostras: 1) CFA Pb18, 2) F17, 3) F17-IV reativos com “pool” de soros de pacientes com PCM. Setas na porção superior das colunas indicam banda de ~ 380 kDa e seta na porção inferior a banda de ~70 kDa. Coluna 4) Padrões de MM.



3.4 ANÁLISE DE RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA

A resposta linfoproliferativa aos antígenos: F17 (100 µg/ml), F17-IV (50 µg/ml) e Exoantígeno (50 µg/ml), expressa em índice de proliferação celular, foi significativamente maior nas células de baço de grupo de camundongos infectados com Pb18 em relação ao grupo não infectado ($P < 0,05$) (Figura 4).

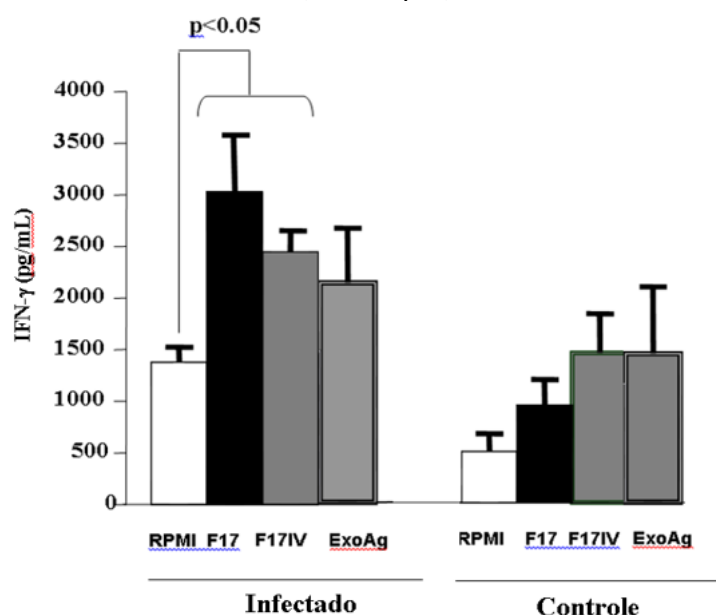
Figura 4: Índice de proliferação celular de linfócitos de baço de camundongos infectados com Pb18 e camundongos normais (como controle) em resposta aos estímulos com os antígenos: 1) F17 (100 µg/ml); 2) F17-IV (50 µg/ml); e 4) ExoAg (Exoantígeno) (50 µg/ml). * $p < 0,05$ (controle versus infectado).



3.5 DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE CITOCINA INF- γ

Os resultados de dosagem de INF- γ em sobrenadante de cultura de células de baço de camundongos **Balb/c** infectados com *P. brasiliensis* e estimulados com a fração de ~380 kDa e produto de HPLC, subcomponente de ~70 kDa demonstraram aumento significativo de INF- γ com ambos os componentes ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle não estimulado, por ELISA. Todavia o estímulo com ExoAg não induziu aumento significativo, possivelmente por interferência de vários antígenos presentes neste preparado (Figura 5).

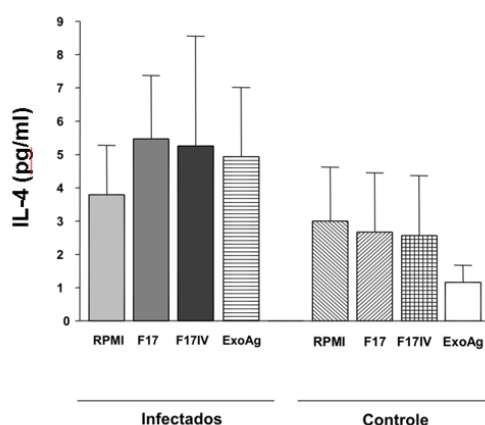
Figura 5: Resultado da análise de nível INF- γ (pg/ml) em sobrenadante de cultura celular de baço de camundongos Balb/c, grupo infectado com Pb18 (Infectado) e grupo controle sem infecção (Controle), estimulados com F17, F17-IV e ExoAg, por ELISA. RPMI, controle sem estímulo. RPMI x F17, F17-IV $p < 0,05$.



3.6 DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE CITOCINA IL-4

A análise dos níveis de IL-4 (pg/ml) no sobrenadante de cultura de células de baço de camundongos Balb/c infectados com Pb18 e do grupo controle, estimulados com as frações F17, F17-IV e ExoAg, foi realizada por ELISA. O controle negativo foi representado pelo meio RPMI sem estímulo. Os resultados não mostraram diferença significativa nos níveis de IL-4 entre o controle RPMI e os grupos estimulados com F17, F17-IV e ExoAg ($P > 0,05$).

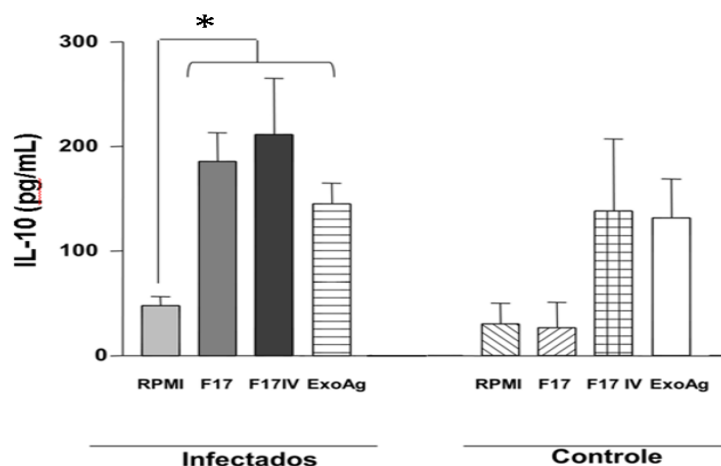
Figura 6: Resultado da análise de nível de IL-4 (pg/ml) em sobrenadante de cultura celular de baço de camundongos Balb/c infectados com Pb18 (Infectado) e grupo controle sem infecção (Controle), estimulados com F17, F17-IV e ExoAg, por ELISA. RPMI, controle sem estímulo. RPMI x F17, F17-IV, ExoAg $p > 0,05$.



3.7 DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE CITOCINA IL-10

O resultado da análise dos níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura de células de baço de animais infectados com Pb18 em resposta a F17, F17-IV e ExoAg demonstrou diferenças significativas em relação ao meio sem estímulo ($p < 0,05$), Figura 7.

Figura 7: Resultado da análise de nível de IL-10 (pg/ml) em sobrenadante de cultura celular de baço de camundongos Balb/c infectados com Pb18 (Infectado) e grupo controle sem infecção (Controle), estimulados com F17, F17-IV e ExoAg, por ELISA. RPMI, controle sem estímulo. RPMI x F17, F17-IV, ExoAg $p > 0,05$.



4 DISCUSSÃO

Diversas glicoproteínas são excretadas/liberadas pela levedura de *P. brasiliensis*, incluindo as gp27, gp43, gp55, gp70, gp87 e o glicoconjugado polidisperso de alta massa molecular (hMM) (Puccia et al., 1986; Blotta & Camargo, 1993; Toledo et al., 1995; Ortiz et al., 1998; Salina et al., 1998). Dentre esses componentes, a gp43 é a mais estudada por ser liberada em maior quantidade, ser reconhecida por 100% dos soros de pacientes com PCM e por ser considerada um antígeno específico. A gp70 também se destaca (Cezar-dos-Santos et al., 2020), enquanto os componentes de hMM são menos investigados.

Neste trabalho, foi obtida uma fração antigênica de aproximadamente 380 kDa, denominada fração 17, a partir de cromatografia em coluna de filtração em gel de preparado de antígeno livre de células (CFA) de *P. brasiliensis*. A massa molecular aproximada de 380 kDa foi evidenciada por immunoblotting. Este resultado está em concordância com estudos anteriores de Marquez et al. (2005), que detectaram na fração 17 um componente de aproximadamente 366 kDa, dentro de uma faixa de polidispersão variando de 278 kDa a 466 kDa em *P. brasiliensis* B339. De forma semelhante, Pavanelli et al. (2007) obtiveram uma fração de aproximadamente 380 kDa, também obtida por cromatografia de filtração em gel de CFA de *P. brasiliensis* Pb18.

A presença desse glicoconjugado polidisperso de hMM parece ser uma característica comum em *Paracoccidioides* spp. Fredrich et al. (2010) observaram a presença de componentes de hMM em CFAs de *P. brasiliensis* (Pb18) e de 20 isolados clínicos. A proporção de hMM em relação aos demais componentes variou de 16% a 20%, indicando uma presença consistente dessa fração entre os isolados. Esta fração de hMM e migração eletroforética heterogênea também foi detectada na nova espécie *P. lutzii* – LDR2 (Lenhard-Vidal et al., 2018; Assolini et al., 2021), sugerindo a presença constante deste componente em *Paracoccidioides* spp.

Neste estudo, a fração 17, de aproximadamente 380 kDa, foi re-fracionada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise da antigenicidade das frações obtidas revelou maior reatividade da fração IV. A massa molecular desta fração foi inicialmente estimada entre 45 kDa e 150 kDa, com base nos padrões de massa molecular de ovalbumina e IgG, respectivamente. Posteriormente, por *immunoblotting*, foi constatada a presença de três bandas principais, correspondentes a ~380 kDa, ~70 kDa e ~43 kDa, sendo a reatividade mais evidente com a de ~70 kDa.

Estes resultados reforçam a presença de antígeno de ~380kDa dentre os componentes polidispersos de hMM nos preparados antigênicos de *P. brasiliensis* Pb18 e componentes antigênicos menores associados que podem ter um papel importante na resposta imunológica, especialmente considerando a presença das bandas de ~70 kDa que é imunorreativa.

A presença de enzimas proteolíticas autólogas no preparado de CFA foi considerada, e para evitar sua ação foi utilizado o inibidor de protease PMSF. No entanto, o PMSF não foi capaz de impedir a geração de subcomponentes de menor massa molecular. Isto sugere que, independentemente da presença de enzimas, o componente de hMM pode gerar espontaneamente componentes menores. Todavia, não se pode descartar a hipótese de existência de outra enzima autóloga resistente ao PMSF ou a possibilidade de dissociação de gp70 do componente de hMM durante os processos cromatográficos.

Puccia et al. (1986) realizaram o refractionamento do primeiro pico de ExoAg, obtido por filtração em coluna de Bio-Gel P30, em coluna de Sepharose-Con A. Neste processo, detectaram a presença de componente de hMM e glicoproteínas menores de 72 kDa, 55 kDa e 43 kDa. Por *immunoblotting*, utilizando soro de pacientes com PCM, foi observada uma forte reatividade com gp43 e uma reatividade fraca com os componentes de hMM e gp72. Esses dados também sugerem que o componente de hMM gera componentes menores. No presente estudo, o refractionamento em HPLC permitiu detectar apenas banda de ~70 kDa e fracamente de ~380kDa e de ~ 43 kDa. A banda de 55 kDa não foi detectada, possivelmente devido às diferenças nas cepas de fungo utilizadas (B339 versus Pb18), nos tipos de antígeno (ExoAg versus CFA) e nas metodologias aplicadas (Bio-Gel/Sepharose Con A versus Sephadex G-200/HPLC). Ademais, a fração de hMM obtida neste estudo consistiu em uma única fração com o maior pico de absorção a 280 nm, enquanto Puccia et al. (1986) utilizaram parte de um pico de absorção mais amplo a 280 nm.

O estudo dos componentes que induzem proteção é de grande importância, especialmente para o desenvolvimento de estratégias alternativas de tratamento, como procedimentos imunoterapêuticos, considerando a toxicidade dos agentes antifúngicos atualmente utilizados. Neste contexto, o presente trabalho avaliou a resposta linfoproliferativa induzida pela fração de ~380 kDa e sua subfração de ~70 kDa. Concordando com os dados de Pavanelli et al. (2007), a fração de 380 kDa foi capaz de induzir a resposta linfoproliferativa em células de baço provenientes de camundongos infectados experimentalmente com *P. brasiliensis*. De forma interessante, o produto gerado durante o processo de purificação por HPLC, um componente de MM ~ 70 kDa, manteve a capacidade de induzir a proliferação celular. Isso sugere uma ativação da imunidade celular tanto pelo componente de ~380kDa quanto pelo componente de ~70 kDa, um dos mecanismos de defesa mais relevantes na PCM. O aumento da proliferação de linfócitos é um indicativo de que esses componentes fúngicos possuem epítomos capazes de ser reconhecidos pelas células T, estimulando a resposta imune adaptativa.

Na avaliação do perfil de citocinas em resposta à fração de 380 kDa e sua subfração, foi observado aumento significativo nos níveis de INF- γ (interferon-gama) e IL-10 (interleucina 10), enquanto IL-4 (interleucina 4) não apresentou diferença significativa. Esse perfil de citocinas é característico de uma resposta imune do tipo Th1, que é fundamental para a defesa contra a PCM. O

INF- γ é uma citocina crítica para a ativação de macrófagos. Embora a IL-10 tenha sido originalmente descrita como uma citocina secretada por células Th2, estudos recentes demonstram que ela também pode ser produzida por células Th1, Th2, Th17, Treg, células dendríticas, monócitos e macrófagos. A IL-10 atua de forma dual no sistema imunológico: por um lado, é uma potente citocina anti-inflamatória e imunossupressora; por outro, pode apresentar propriedades imunoestimuladoras (Carlini et al., 2023).

O subcomponente de ~70 kDa é possivelmente uma entidade distinta da gp70 previamente relatada na literatura (Marquez et al., 2005; Biselli et al., 2001; Rigobello et al., 2013). Uma evidência importante dessa distinção é a sua capacidade de induzir o aumento de INF- γ , sugerindo um potencial imunomodulador diferenciado para a resposta Th1. Essa característica torna o subcomponente um alvo interessante para investigações futuras, pois ele pode representar um novo biomarcador ou um potencial agente imunoterápico para a PCM.

5 CONCLUSÃO

Os dados apresentados demonstram a importância dos componentes de alta massa molecular (hMM) do *P. brasiliensis*, especialmente a fração de **380 kDa** e os subcomponentes, no desencadeamento da **resposta imune celular**. O aumento de citocinas associadas à resposta **Th1**, como **INF- γ** , e a ausência de aumento de **IL-4**, reforçam o papel desses componentes na indução de uma resposta imunológica eficaz na PCM. Estes achados destacam a relevância desses componentes antigênicos para o desenvolvimento de estratégias para vacina ou terapêutica para a **PCM**.

AGRADECIMENTOS

Fundação Araucária/PR, PROPPG/PROEX, UEL e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- ASSOLINI, J. P. et al. Distinct Pattern of *Paracoccidioides lutzii*, *P. restrepiensis* and *P. americana* Antigens Recognized by IgE in Human Paracoccidioidomycosis. *Current Microbiology*, v. 78, n. 7, p. 2608-2614, 2021.
- BAIDA, H. et al. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infection*, v. 1, p. 273-278, 1999.
- BISELLI, P. J. C. et al. IgE antibody response to the main antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in patients with paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology*, v. 39, p. 475-478, 2001.
- BLOTTA, M. H.; CAMARGO, Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 3, p. 671-676, 1993.
- BURGER, E. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 55, n. 4, p. 391-398, 1996.
- CAMARGO, Z. P. et al. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 29, n. 1, p. 31-38, 1991.
- CARLINI, V. et al. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1161067, 2023.
- CEZAR-DOS-SANTOS, F. et al. Unraveling the susceptibility of paracoccidioidomycosis: Insights towards the pathogen-immune interplay and immunogenetics. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 86, p. 104586, 2020.
- FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of this clinical forms. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 20, n. 2, p. 129-132, 1987.
- FREDRICH, A. L. et al. High molecular mass fraction in clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 5, p. 526-530, 2010.
- LENHARD-VIDAL, A. et al. Polyclonal antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* are able to recognise antigens from different strains from *Paracoccidioides* species complex, including *Paracoccidioides lutzii* LDR2. *Mycoses*, v. 61, n. 11, p. 826-832, 2018.
- LONDERO, A. T.; DEL NEGRO, G. Paracoccidioidomicose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 12, p. 41-60, 1986.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MARQUEZ, A. S. et al. Reactivity of antibodies from patients with acute and chronic paracoccidioidomycosis to a high molecular mass antigen from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 19, n. 5, p. 199-204, 2005.

MELLO, L. M.; SILVA-VERGARA, M. L.; RODRIGUES JR., V. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high interleukin-4 and interleukin-5 production. *Human Immunology*, v. 63, p. 149-154, 2002.

MONTENEGRO, M.; FRANCO, M. Pathology In *Paracoccidioidomycosis*. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (eds.). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994. p. 131-150.

ORTIZ, B. L. et al. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 5, n. 6, p. 826-830, 1998.

PADILHA-GONÇALVES, A. Paracoccidioidomicose. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 60, n. 1, p. 271-280, 1985.

PAVANELLI, W. R. et al. Protection induced in BALB/c mice by the high-molecular-mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*, v. 163, n. 3, p. 117-128, 2007.

PUCCIA, R. et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infection and Immunity*, v. 53, p. 199-206, 1986.

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

RIGOBELLO, F. F. et al. Patients with chronic-form paracoccidioidomycosis present high serum levels of IgE anti-paracoccidioides brasiliensis Gp70. *Mycopathologia*, v. 175, n. 3-4, p. 307-313, 2013.

SALINA, M. A. et al. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 6, p. 1723-1728, 1998.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 31, n. 2, p. 99-113, 1993.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. Estudio comparativo de la actividad de glucán sintetasa en dos cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* [Comparative study of glucan synthetase activity in 2 strains of *Paracoccidioides brasiliensis*]. *Acta Científica Venezolana*, v. 33, n. 4, p. 327-332, 1982.

SINGER-VERMES, L. M. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 94, p. 75-79, 1993.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, p. 715-740, 2017.

TOLEDO, M. S. et al. Glycolipids from *Paracoccidioides brasiliensis*. Isolation of a galactofuranose-containing glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 33, n. 4, p. 247-251, 1995.