

Anticorpos a antígeno somático e antígeno solúvel de *Paracoccidioides brasiliensis* no curso de paracoccidioidomicose murina

Antibody to somatic and soluble *Paracoccidioides brasiliensis*'s antigens in the course of murine paracoccidioidomycosis

Solange de Paula Ramos, Mari Kaminami Sumigawa, Nilson de Jesus Carlos, Kátia Key Oshiro, Nádia Hizuru Kamiji, Eiko Nakagawa Itano
Depto. De Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina

Resumo

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é utilizado com frequência no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com paracoccidioidomicose, sendo a sua sensibilidade e especificidade dependente do tipo de preparação antigênica utilizada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune humoral no curso da infecção experimental em camundongos, utilizando antígeno somático (PbAg) e antígeno liberado pelo *Paracoccidioides brasiliensis* em meio líquido, o exoantígeno (exoAg). Os camundongos Swiss, infectados com Pb18 foram sacrificados nos períodos de 7, 28, 56 e 84 dias, tendo como controle camundongos inoculados com PBS. Placas de ELISA sensibilizadas com ExoAg ou PbAg foram incubadas com amostras de plasma dos animais, seguida de conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo e OPD. Os resultados obtidos demonstraram aumento no nível plasmático de IgG aos antígenos de *P. brasiliensis* após 28, 56 e 84 dias de pós-infecção, não sendo observada diferença significativa entre os dois antígenos analisados. Concluímos pelo trabalho que a sensibilidade de ELISA utilizando PbAg ou exoAg é mesma na PCM murina.

Palavras-chave: ELISA, *P. brasiliensis*, antígeno, IgG.

Abstract

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is frequently used in diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis (PCM). Assay sensitivity and specificity depend of kind of antigenic preparation used. The aim of the present study was to evaluate the humoral immune response

against the exoantigen (exoAg) liberated by *Paracoccidioides brasiliensis* into liquid medium and somatic antigen (PbAg) by ELISA in the course of experimental infection. Swiss mice, infected with yeast form of Pb18 and sacrificed at 7, 28, 56 e 84 days post-infection and non-infected control mice inoculated with PBS. Immunoplates sensitized with exoAg or PbAg were incubated with plasma samples, anti-mouse IgG labeled with peroxidase and OPD. The results demonstrated increased levels of IgG anti- *P. brasiliensis* antigens after 28, 56 and 84 days post-infection, with similarities between exoAg and PbAg. In conclusion, the sensitivity is same with exoAg and PbAg in murine PCM.

Key words: ELISA, *P. brasiliensis*, antigen, IgG.

INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa crônica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. A doença é endêmica nos países da América Latina e o Brasil o país com o maior número de casos relatados. O diagnóstico da doença é realizado através de identificação do fungo em material biológico ou exame histopatológico para identificação do microrganismo. No entanto, quando não é possível é possível a identificação de leveduras de *P. brasiliensis* através destas metodologias, a utilização de técnicas de imunodiagnóstico torna-se necessária, à fim de identificar anticorpos específico contra o fungo ⁽¹⁾.

O ensaio imunoenzimático (ELISA) têm sido proposto nos ensaios de diagnóstico e acompanhamento de pacientes com PCM, devido a sua alta sensibilidade, comparado a outros ensaios de imunodiagnóstico ^(2,3,4). No entanto, a especificidade do método é comprometida por reações cruzadas com soros de pacientes com histoplasmose, lobomicose e tuberculose relatadas em grau variável, dependendo do tipo de preparação antigênica utilizada ⁽⁵⁾. Embora seja uma técnica menos sensível, a utilização de imunodifusão radial dupla é um método

confiável para o diagnóstico da PCM, devido a sua especificidade, sendo que a presença de bandas de precipitação indicam a presença da doença em fase ativa ^(6, 7, 8).

O exoantígeno é um antígeno produzido à partir de moléculas liberadas pelo fungo em meio líquido e foi introduzido inicialmente em técnicas de imunodifusão ⁽⁷⁾, sendo também indicada no ELISA ⁽⁹⁾. Outras preparações antigênicas, incluindo células rompidas mecanicamente também já foram utilizadas com a mesma finalidade ^(6,10).

O objetivo deste trabalho é avaliar a sensibilidade do ELISA e da IDRD na evolução da paracoccidiodomicose experimental, frente a antígenos liberados para o meio extracelular (exoantígeno) e antígenos somáticos do *P. brasiliensis*.

MATERIAL DE MÉTODOS

Animais

Camundongos Swiss machos, 4 a 5 semanas, aproximadamente 25 gramas, mantidos em biotério a 25°C e alimentados *ad libitum*.

Microrganismos

P. brasiliensis, cepa 18, cultivado em agar Sabouraud Dextrose 4% , mantido a 35°C, na fase leveduriforme e repicado a cada 5 dias. O fungo foi colhido em salina estéril e a concentração de células foi ajustada a 1×10^6 células/mL.

Protocolo experimental

Os animais foram infectados com 100 µL da suspensão de células, via endovenosa e sacrificados nos períodos de 7, 14, 28, 56 e 84 dias. Animais controle receberam apenas salina estéril.

Produção de antígeno somático (PbAg)

Leveduras do *P. brasiliensis*, cepa 18, cultivadas nas condições já descritas, foram colhidas em PBS estéril, mortas em nitrogênio líquido e centrifugadas em 12000rpm, 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi armazenado a -80°C antes do uso. A concentração de proteínas foi avaliada em espectrofotômetro a 280 nm.

Produção de exoantígeno (ExoAg)

Leveduras de *P. brasiliensis*, cepa 339, foram cultivada em mio líquido, nas condições descritas previamente por CAMARGO et al, 1988 ⁽⁷⁾.

ELISA para detecção de IgG anti-exoantígeno e anti-antígeno somático

Placas de 96 orifícios (TPP, Switzerland, Europe) foram sensibilizadas com 100mL por orifício de exoantígeno (1mg/mL) ou antígeno somático (25µg/mL), diluído em tampão carbonato bicarbonato (Na₂CO₃ 1,59g, NaHCO₃ 2,93g, água destilada qsp 1000mL, pH 9,6) e incubadas por 1 hora, à 37°C e *overnight* à 4°C. As placas foram lavadas 4 vezes em tampão de lavagem (PBS pH 7,2, contendo 0,05% Tween 20 e leite desidratado 0,5%) e bloqueadas por uma hora em tampão de bloqueio (PBS pH 7.2, contendo 0,5% Tween 20 e leite desidratado 5%), à temperatura ambiente. As amostras de plasma foram distribuídas em duplicatas, 100mL/orifício, diluídas 1:10 em tampão de diluição (PBS pH 7,2, leite desidratado 0,5%) e incubadas por 1 hora, à 37°C. A placa foi novamente lavada e adicionados 100µL/orifício de conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase (A8729; 1:4000; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) e incubados por 1 hora, à 37°C. Após a última lavagem, foram adicionado 100mL de solução reveladora (10 mL tampão citrato 0,1M pH 4,5, 5mg

ortho-phenylenediamine, 5 μ L H₂O₂) e a reação foi interrompida em 15 minutos, com 50mL de H₂SO₄ 4N por orifício. A leitura da placa foi realizada em Multiskan Reader, à 492nm.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados por software InStat 2.0, utilizando análise ANOVA, teste Tukey-Kramer, considerando $p < 0,05$ significativo.

RESULTADOS

ELISA

Os resultados obtidos foram expressos em média da densidade óptica (D.O) a 492nm (Figura 1). O ELISA utilizando ExoAg e PbAg em animais controle não-infectados ($0,058 \pm 0,002$ e $0,036 \pm 0,001$, respectivamente) e animais infectados após 7 dias ($0,065 \pm 0,001$ e $0,041 \pm 0,001$) não apresentaram diferença estatisticamente significante. Níveis plasmáticos detectáveis de IgG anti-exoantígeno ($0,258 \pm 0,016$) e anti-PbAg ($0,271 \pm 0,074$) foram observados somente após 28 dias ($p < 0,05$, em relação ao respectivo grupo controle. Os níveis de IgG anti-exoantígeno aumentaram significativamente ($p < 0,001$) em relação aos grupos controle e não infectados, nos animais aos 56 ($0,344 \pm 0,063$) e 84 ($0,401 \pm 0,048$) dias pós-infecção. O mesmo perfil foi observado quando utilizado o PbAg contra plasmas de 56 ($0,393 \pm 0,029$) e 84 ($0,362 \pm 0,032$) dias pós-infecção.

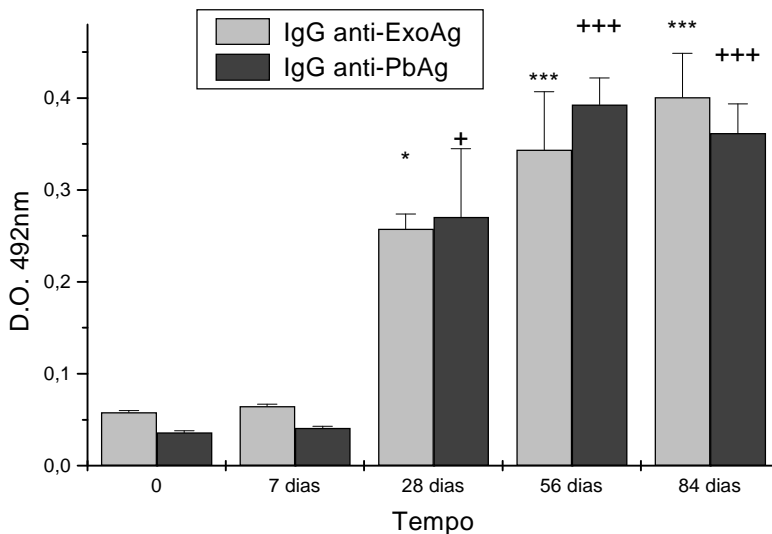


Figura 1. Níveis de IgG anti-exoantígeno (ExoAg) e anti-antígeno somático (PbAg) em plasma de camundongos Swiss infectados experimentalmente com 10^6 células de Pb 18 na fase leveduriforme. O ELISA foi realizado em placas sensibilizadas com 1mg/mL de ExoAg ou 25 μ g/mL de PbAg e incubadas com amostras de soro diluídas 1:10. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.) à 492 nm, considerando $p < 0,05$ significante em relação ao controle não infectado.

* $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

*** $p < 0,001$, em relação ao grupo controle.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento da resposta imune humoral e produção de altos títulos de anticorpos específicos estão associados à gravidade e disseminação da PCM em pacientes e animais experimentais ^(1,11). O plasma de camundongos infectados experimentalmente com *P. brasiliensis* e pacientes com PCM apresentam IgG contra mais de 38 componentes presentes em antígenos extraídos da fase leveduriforme do

fungo, sendo o antígeno de 43 kDa reativo com 100% de soros de pacientes com PCM ^(12, 13).

Em 1988, CAMARGO *et al* ⁽⁷⁾, sugeriram o uso de exoantígeno produzido da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* 339, para uso em testes de imunodifusão (ID). Por este ensaio, os autores detectaram uma especificidade de 100% e sensibilidade de 97,1%. A principal linha de precipitação no teste de ID corresponde aos anticorpos anti-gp43, portanto, a presença de altas concentrações deste antígeno nas preparações antigênicas confere maior sensibilidade ao método. Embora os títulos de anticorpos específicos, detectados por ELISA, contra ambos os antígenos fossem consideravelmente elevados aos 84 dias, no trabalho anterior observamos que apenas 30% das amostras foram positivas por ID⁽¹⁴⁾. Segundo NEVES *et al*, 2003 ⁽¹⁵⁾, este fenômeno pode ocorrer devido a presença de IgG2 direcionada a epítomos carboidratados da molécula de gp43, uma vez que estes anticorpos apresentam baixa avidéz, não produzem bandas de precipitação na ID.

Como esperado, aos 7 dias de infecção a resposta não foi evidente, sendo o aumento significativo observado aos 28 dias, para ambos os antígenos. A partir deste período, 100% das amostras foram positivas, mantendo o nível sérico elevado até 84 dias pós- infecção.

Um dos principais problemas apontados nos diagnóstico da PCM através do ELISA é a reação cruzada com plasma de outras micoses e tuberculose ⁽⁹⁾. No entanto, mesmo utilizando gp43 pode se observar as reações cruzadas entre os soros de pacientes com PCM, histoplasmose e doença de Jorge Lobo, devido ao reconhecimento de epítomos carboidratos da gp43^(5,6,16, 17).

Apesar da existência da reação cruzada de gp43, o ensaio imunoenzimático (ELISA clássico) ainda é usado com frequência utilizando exoAg, porém com a determinação de uma zona

de corte (cut off), o que permite distinguir das outras doenças fúngicas. No presente trabalho não foi avaliada a reação cruzada, porém considerando nível elevado de anticorpos tanto ao exoAg como PbAg, após 28 dias, em relação ao controle, a utilização de zona de corte, possivelmente eliminaria este problema. Dentre os dois antígenos utilizados, possivelmente a exoAg teria menor possibilidade de reação cruzada por ser menos complexo e de ser constituído principalmente de gp43^(7,10,13). Assim, possivelmente a exoAg seria mais importante para fins de diagnóstico e o PbAg para estudos epidemiológicos e na detecção de PCM infecção. No entanto, são necessários estudos adicionais.

A utilização de antígenos não purificados de *P. brasiliensis* é interessante devido a facilidade de obtenção e baixo custo⁽¹⁸⁾ e concluímos pelo trabalho que tanto o exoAg como PbAg apresentam eficiência semelhante em ELISA, durante o curso da infecção experimental em PCM murina.

REFERÊNCIAS

1. Franco MF, Mendes RP, Rezkallah-Iwasso M, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. *Baillière's Clinical Tropical Medicine and communicable diseases* 1989; **4**: 185-219.
2. Camargo ZP, Guesdon JL, Drouhet E, Improvisi L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmunoelectrophoresis and erythro-immunoassay. *Mycopathologia* 1984; **88**: 31-37.
3. Cano LE, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Na evaluation of enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for qauntification of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Mediacal Veterinary Mycology* 1987; **25**: 467-475.

4. Martins R, Marques S, Alves M, Fecchio D, Franco MF. Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with itraconazole using dot-blot, ELISA and Western-blotting. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1997; **39**:
5. Puccia R, Travassos LR. 43-Kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis or Jorge Lobo's disease. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; **29**: 1610-1615.
6. Restrepo A, Moncada LH. Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. *Applied microbiology* 1974; **28**: 138-144.
7. Camargo ZP, Unterkircher, C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *Journal of Clinical Microbiology* 1988; **26**: 2147-2151.
8. Del Negro GMB, Garcia NM, Rodrigues EG, Cano MIN, Aguiar, MSMV, Lirio VS, Lacaz CS. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1991; **33**: 277-280.
9. Botteon FA, Camargo ZP, Benard G, Coelho RF, Chamone DA, Itano EN. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors. *Medical Mycology* 2002; **40**:387-391.
10. McGowan KL, Buckley HR. Preparation and use of cytoplasmic antigens for the serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Journal Clinical Microbiology* 1985; **22**: 39-43.
11. Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CAC, Russo M, Calich VLG. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. *Infection and Immunity* 1995; **63**: 1777-1783.
12. Vaz CAC, Mackenzie DWR, Hearn VM, Camargo ZP, Singer-Vermes LM, Burger E. Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis. *Clinical Experimental Immunology* 1992; **88**: 119-123.

13. Casotto M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; **28**: 1188-1193.
14. Ramos SP, Crescêncio HV, Carlos NJ, Itano EN. Anticorpos precipitantes no curso da paracoccidioidomicose experimental em camundongos Swiss. *Biosaúde*. 2003.
15. Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MHSL. Negative immunodifusion test results obtained with será of *Paracoccidioides brasiliensis* patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2003; **10**: 802-807.
16. ALMEIDA, I. C.; NEVILLE, D.C.; MEHLERT, A.; et al. Structure of the n-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glicobiology*, 1996, **6**:507-515,
17. MENDES-GIANINNI, M.S.J; CAMARGO, M.E.; LACAZ, C.S.; et al. Immunoenzimatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1984, **20**:103-108,.
18. Toriello C, Reyes-Montes MR, Taylor ML. Production of fungal antigens from local strains for the immunodiagnosis of mycoses in Mexico. *Revista de Investigacion Clinica* 1997; **49**: 501-505.