

JUNNIA ALVARENGA DE CARVALHO OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO ACOMETIMENTO CARDÍACO EM CAMUNDONGOS BALB/C
INFECTADOS POR *Paracoccidioides brasiliensis***

UFMG

2017

JUNNIA ALVARENGA DE CARVALHO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO ACOMETIMENTO CARDÍACO EM CAMUNDONGOS BALB/C
INFECTADOS POR *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff (Departamento de Microbiologia)

Co-orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes (Departamento de Bioquímica e Imunologia Celular)

Belo Horizonte

2017

*“O conhecimento científico não é atraente por ter todas as respostas,
mas sim por querer decifrar um conjunto cada vez maior de
perguntas.”*

Lázaro de Souza Gomes

Dedico a minha família, em especial aos meus pais que me instruíram o caminho até aqui e me forneceram todas as ferramentas necessárias para construir uma base sólida sobre os pilares que sustentam o meu conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar por ter me concedido a oportunidade de realizar esse trabalho, pela sabedoria adquirida, por me proteger e guiar os meus passos.

Aos meus pais, Elizabeth de Carvalho Oliveira e Marcos Vinício de Oliveira e ao meu irmão Samuel de Carvalho Oliveira pela compreensão e atenção, pelo incentivo e exemplo de grande perseverança e ética profissional. A vocês que nunca deixaram de acreditar no meu sucesso, muito obrigada.

Ao Júlio César de Abreu Júnior, meu companheiro, amigo pra toda hora. Obrigada por compartilhar todo este momento e acreditar no meu potencial.

À minha sobrinha Luiza e meu afilhado Rafael que de uma maneira muito diferente dos demais fazem parte deste momento. Fazem parte porque me fizeram entender que a busca deste futuro tem muito mais sentido quando se tem alguém para ensinar. Meu chefe me ensinou que devemos ensinar ao seus irem além do que somos. Assim eu agradeço a vocês!

À minha família: tios, tias, primos e primas. Todos vocês contribuíram diretamente ou indiretamente para este trabalho, pois de fato operaram na construção da minha história e que me fizeram chegar até aqui.

Aos professores Alfredo Miranda de Góes e Maria Aparecida de Resende Stoianoff minha gratidão pela confiança, atenção, dedicação, disponibilidade, valiosa orientação, pelo aprendizado proporcionado e pela oportunidade de me orientar. Chefe, obrigada por me aceitar desde o princípio de braços abertos em seu laboratório e por fazer com que me sentisse parte da família LICM.

À Prof^a. Daniele da Glória de Souza pela impecável orientação no Treinamento Didático.

À Dra. Estefânia Mara do Nascimento Martins pelo carinho, amizade e disponibilidade de avaliação deste trabalho.

Ao professor Dawidson Gomes pelo apoio, auxílio e paciência.

Ao laboratório de Imunologia Celular e Molecular, em especial as minhas companheiras de projeto Elis Morais, Eliza Mathias, Pricila Cunha, Camila Medeiros e Lucina Nascimento que contribuíram na execução desse trabalho e pela valiosa amizade que surgiu entre nós. À Joyce Spósito, Thalita Valverde, Ludmila Alves, Thais Martins, Lilian da Silva, Ana Cláudia de Chagas e Marina Rodrigues obrigada por toda amizade, por todo carinho, por partilhar de minhas histórias e por fazer parte deste trabalho. A Betinha por ser sempre tão acessível, tão amiga e tão doce! Maira Oliveira e Juliana Lott pelas grandes ideias!! Aos demais colegas do laboratório muito obrigada!

À Dra. Viviane Santos pela amizade, confiança e incentivo. De grande importância no início desta corrida acadêmica. Você foi um elo fundamental nesta jornada e serei eternamente grata.

Às minhas amigas e amigos do curso de Pós Graduação em Microbiologia.

Aos professores e funcionários da Universidade Federal de Minas Gerais. Agradeço em especial a toda a equipe docente da Pós Graduação em Microbiologia, que aperfeiçoou meu conhecimento na área.

A Prof^a. Gerluza e sua equipe pela ajuda e colaboração, em especial Iria.

Ao Laboratório de Radiação Gama do CDTN/CNEN da UFMG.

Ao Departamento de Microbiologia do ICB e ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB.

Aos camundongos utilizados neste trabalho e que tornaram possível mais uma pesquisa científica.

A todas as pessoas que, mesmo não sendo citadas, contribuíram e foram importantes no desenrolar deste trabalho, tornando mais prazerosa a realização da mesma.

Aos órgãos fomentadores desta pesquisa: Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

A paracoccidioidomicose é uma doença sistêmica, endêmica da América Latina, causada por fungos dimórficos do gênero *Paracoccidioides*. Embora a via primária de infecção seja a pulmonar, pela inalação de conídios, vários sítios anatômicos podem ser acometidos pela disseminação linfematogênica, inclusive o coração. Estudos demonstram a complexidade da doença causada pelo *P. brasiliensis* e revelam a necessidade de se investigar os locais onde o fungo se aloja, uma vez que acometimento cardíaco pode estar sendo subdiagnosticado. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar a colonização do fungo no coração de camundongos infectados pelo *P. brasiliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados com a cepa virulenta Pb18 de *P. brasiliensis* os quais foram eutanasiados com 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção. O coração foi removido e utilizado para os seguintes procedimentos experimentais: recuperação do fungo em meio de cultura; análise histológica por diferentes colorações para detectar o fungo e a reação inflamatória no tecido cardíaco; *nested* PCR para evidenciar o material genético do fungo no tecido; e quantificação das citocinas IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α no tecido. Parte dos animais foi imunossuprimido por radiação gama e eutanasiados após 7 dias de infecção para avaliar a recuperação de colônias do tecido cardíaco em meio de cultura. As células fúngicas recuperadas do tecido cardíaco se mostraram viáveis e virulentas. A visualização do *amplicon* do fungo pela técnica do PCR confirmaram a presença do *P. brasiliensis* no tecido cardíaco. As análises histológicas revelaram um infiltrado inflamatório granulomatoso apresentando fibras colágenas ao redor dos fungos corroborando aos achados de ELISA que revelaram uma elevação dos níveis de TNF- α no tecido cardíaco. Esses achados demonstraram a capacidade do fungo de colonizar o tecido cardíaco e desenvolver reações inflamatórias características de Paracoccidioidomicose.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose; disseminação da PCM; tecido cardíaco; *Paracoccidioides brasiliensis*.

SUMMARY

Paracoccidioidomycosis is a systemic disease, endemic in Latin America, caused by dimorphic fungi of *Paracoccidioides* genus. Even though the primary pathway of infection is pulmonary, by inhalation of conidia, several anatomical sites may be affected by lymphoematogenic dissemination, including the heart. Studies demonstrate the complexity of the *P. brasiliensis* caused disease and reveal a necessity to investigate the microorganism infection sites, so the involvement may be underdiagnosed. The aim of this work was to identify and characterize fungal colonization in the heart of *P. brasiliensis* infected mice. BALB/c mice were infected with virulent Pb18 strain of *P. brasiliensis* that were euthanized at 7, 15, 30 and 60 days after infection. The heart was removed and used for the following experimental procedures: fungi recovery culture medium; histological analysis using different methodologies to detect fungi and inflammatory reaction in cardiac tissue; nested PCR to evidence fungi genetic material in the tissue; quantification of the cytokines IL-4, IL-6, IL-10 and TNF- α cytokines in the tissue by ELISA method. Some animals were immunosuppressed by gamma radiation and euthanized after 7 days of infection to fungi recovery of cardiac tissue in culture medium and rate survival of the animals. Fungal cells recovered from cardiac tissue were viable and virulent. Visualization of the amplicon of the fungus by the PCR technique confirmed the presence of *P. brasiliensis* in cardiac tissue. As histological analyzes revealed a granulomatous inflammatory infiltrate presenting collagen fibers around the fungi corroborating the ELISA findings that revealed elevated levels of TNF- α in cardiac tissue. These results demonstrated fungi colonization and development of inflammatory reactions in the heart of *P. brasiliensis* infected mice, characteristic of Paracoccidioidomycosis

Keywords: Paracoccidioidomycosis; PCM dissemination; cardiac tissue; *Paracoccidioides brasiliensis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês “*acquired immunodeficiency syndrome*”)

BHI – Meio infuso cérebro coração

BSA – Albumina sérica bovina

CD – Agrupamento de diferenciação

CDTN – Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear

CEUA – Comissão de Ética do Uso de Animais

CN – Controle negativo (grupo da PCM experimental)

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear

CNI – Controle negativo imunossuprimido (grupo da PCM experimental)

CP – Controle positivo (grupo da PCM experimental)

CPI – Controle positivo imunossuprimido (grupo da PCM experimental)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPS – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DPI – Dias após infecção

ECM – Matrix extracelular

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio de absorção imunoenzimático

Fc – fração cristalizável do anticorpo

gp43 – glicoproteína de 43kda

gp70 – glicoproteína de 70kda

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HC – Hospital das Clínicas

HE – Hematoxilina e Eosina

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IL – Interleucina

IFN- γ – Interferon gama

LTH1 – Células T-auxiliares do tipo 1

LTH2 – Células T-auxiliares do tipo 2

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
MHC II – Complexo principal de histocompatibilidade II
NaCl – Cloreto de sódio
NO – Oxido Nítrico
NP-40 – Tipo de tergitol (Detergente)
PAMPS – Padrões Moleculares associados a patógenos
Pb27 – Proteína de 27 kDa
Pb40 – Proteína de 40 kDa
PBS – Tampão Salino Fosfato
P. brasiliensis – *Paracoccidioides brasiliensis*
pb – pares de bases
Pb – *Paracoccidioides brasiliensis*
Pb18 – Cepa de *P. brasiliensis* isolado virulento humano
PCM – Paracoccidioidomicose
PCR – Reação em cadeia da polimerase
RPM – Rotações por minuto
SNC – Sistema Nervoso Central
T1 – Tempo 1 (7 dias após a infecção)
T2 – Tempo 2 (15 dias após a infecção)
T3 – Tempo 3 (30 dias após a infecção)
T4 – Tempo 4 (60 dias após a infecção)
TLR – Receptor do tipo toll
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
Tris-HCl – Cloridrato de tris
UFC – Unidades formadoras de colônia
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
YPD – Yeast extract peptone dextrose (meio composto de extrato de levedura)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transição de fase em <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	20
Figura 2. Distribuição geográfica da PCM	23
Figura 3. Ciclo biológico hipotético de <i>P. brasiliensis</i>	29
Figura 4. Formas clínicas da PCM segundo Franco e colaboradores (1987)	31
Figura 5. Fluxograma dos experimentos realizados.	49
Figura 6. Unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas de tecido cardíaco de animais imunocompetentes após 30 dias de infecção	50
Figura 7. Unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas de tecido cardíaco e pulmonar de animais imunocompetentes após 7, 15, 30 e 60 dias de infecção.....	51
Figura 8. Histologia do tecido cardíaco de camundongos imunocompetentes corado pela técnica de Grocott 30 dias após infecção pelo <i>P. brasiliensis</i>	52
Figura 9. Fotomicrografia do tecido cardíaco de camundongo imunocompetente em ensaio de imunofluorescência 30 dias após a infecção pelo <i>P. brasiliensis</i> utilizando anticorpo para a Pb27 e contra coloração por DAPI.	52
Figura 10. Fotomicrográfrica do tecido cardíaco de camundongos imunocompetentes processada em 15, 30 e 60 dias após a infecção pelo <i>P. brasiliensis</i>	53
Figura 11. Fotomicrografia do tecido cardíaco de camundongos imunocompetentes processada em 15, 30 e 60 dias após a infecção pelo <i>P. brasiliensis</i>	54
Figura 12. Análise eletroforética em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio dos <i>amplicons</i> produzidos pela PCR1 (A) e PCR2 (B)	55
Figura 13. Análise eletroforética em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio dos <i>amplicons</i> produzidos pela PCR3	56
Figura 14. Níveis relativos de IL-10 no tecido cardíaco e pulmonar de camundongos BALB/c imunocompetentes e infectados com <i>P. brasiliensis</i>	57
Figura 15. Níveis relativos de IL-4, IL-6 e TNF- α no tecido cardíaco e pulmonar de camundongos BALB/c imunocmpetntes infectados com <i>P. brasiliensis</i>	58
Figura 16. Número de leucócitos/ μ L de sangue em camundongos BALB/c.....	59
Figura 17. Unidades formadoras de colônia recuperadas de tecido cardíaco e pulmonar de camundongos BALB/c imunocompetentes e imunossuprimidos com 7 dias de infecção.	60
Figura 18. Taxa de sobrevivência dos camundongos após imunossupressão e infecção por <i>P. brasiliensis</i>	60

LISTA DE TABELAS

Quadro 1. Frequência de acometimento dos órgãos/sistemas pela PCM por diferentes autores (Araujo, 2011).....	36
Quadro 2. Grupos experimentais.....	44
Quadro 3. Sequências dos <i>primers</i> e tamanho dos <i>amplicons</i>	47
Quadro 4. Nível de citocinas IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α no tecido	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Histórico da Paracoccidioidomicose (PCM).....	18
1.2	Agente etiológico	19
1.3	Ecologia e epidemiologia	22
1.4	Processo infeccioso e Resposta imunológica.....	26
1.5	Formas clínicas	29
1.6	Diagnóstico da PCM.....	31
1.7	Tratamento da PCM.....	33
1.8	Processo de disseminação	35
1.8.1	Histórico de infecção do tecido cardíaco e vasos sanguíneos.....	37
2	JUSTIFICATIVA.....	41
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo geral.....	42
3.2	Objetivos específicos	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Microrganismo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	43
4.2	Animais e grupos experimentais	43
4.3	Imunossupressão.....	44
4.4	Infecção	44
4.5	Eutanásia.....	45
4.6	Recuperação de fungos presentes no tecido cardíaco e pulmonar	45
4.7	Análise histológica.....	46
4.8	Extração de DNA genômico e PCR.....	46
4.9	Extração de proteínas	48
4.10	Quantificação de citocinas (ELISA de Citocinas)	48
4.11	Análise estatística e Delineamento Experimental.....	49
5	RESULTADOS.....	50
5.1	Determinação da via de infecção do coração pelo <i>P. brasiliensis</i>	50
5.2	Comparação da colonização do coração e pulmões na infecção pelo <i>P. brasiliensis</i>	51
5.3	Análise histológica do tecido cardíaco.....	52
5.4	Deteção de DNA genômico de <i>P. brasiliensis</i> em tecido cardíaco	55
5.5	Deteção de citocinas nos tecidos cardíaco e pulmonar	56
5.6	Comparação da infecção por <i>P. brasiliensis</i> em camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos	59
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	66
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
9	ANEXO.....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da Paracoccidioidomicose (PCM)

A Paracoccidioidomicose (PCM) foi descrita pelo pesquisador Adolfo Lutz (1855-1940) em 1908, na cidade de São Paulo, por meio do isolamento do fungo de dois pacientes que apresentavam a doença na forma muco cutânea tendo recebido seu primeiro nome: hifoblastomicose pseudococcidióidica. Em 1912, Alfonso Splendore (1871-1953), também em São Paulo, cultivando e estudando o agente etiológico da hifoblastomicose pseudococcidióidica enquadrando-o no gênero *Zymonema*, denominando-o *Zymonema brasiliense* Splendore (1912). No primeiro momento, a doença passou a ser chamada “blastomicose brasileira”, mas como foram relatados casos em outros países da América do Sul, passou a ser denominada “blastomicose sul-americana” (Lutz, 1908; Splendore, 1912).

Floriano Paulo de Almeida (1898-1977), após estudos sistematizados que objetivaram diferenciar esse novo agente sul-americano da espécie *Coccidioides immitis*, propôs a denominação *Paracoccidioides* (Floriano de Almeida, 1930), em razão do fungo apresentar alguma semelhança com o gênero *Coccidioides*. Desta forma, foi criado um novo gênero dentro do reino Fungi, o *Paracoccidioides*, revalidando o nome da espécie criada por Splendore (1912). De acordo com as regras estabelecidas por Linneu, o agente etiológico desta nova micose estava classificado (Lacaz, 1982).

O termo Paracoccidioidomicose (PCM) foi oficializado durante a reunião de micologistas do continente americano em 1971, em Medellín (Colômbia), sendo mundialmente aceito na denominação da doença (Lacaz, 1982).

Vários nomes foram propostos para denominar o agente da PCM, antes da aceitação universal de *Paracoccidioides brasiliensis*, como se observa a seguir: *Hiphoblastomyces pseudococcidica* Lutz, 1908; *Zymonema brasiliense* Splendore, 1912; *Zymonema histosporocellularis* Haberfeld, 1919; *Mycoderma brasiliense* Brumpt, 1922; *Monilia brasiliense* Vuillemin, 1922; *Proteomyces faverae* Dodge, 1935; *Paracoccidioides cerebriformis* Moore, 1935; *Paracoccidioides tenuis* Moore, 1938; *Coccidioides histosporocellularis* Fonseca Filho, 1939; *Lutziomyces*

histosporocellularis Fonseca Filho, 1939; *Blastomyces brasiliensis* Conant & Howell Jr., 1941; *Aleurisma brasiliensis* Aroeira Neves & Bogliolo, 1951 (Lacaz, 1982).

Atualmente, o gênero *Paracoccidioides* enquadra duas espécies: *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, que engloba um complexo de quatro espécies crípticas, as quais apresentam morfologia e genótipos divergentes (Matute et al., 2006).

1.2 Agente etiológico

Paracoccidioides spp. são microrganismos que se encontram taxonomicamente classificados no reino Fungi, filo Ascomycota, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórfica, gênero *Paracoccidioides* e espécie *Paracoccidioides brasiliensis* ou *Paracoccidioides lutzii*. O filo Ascomycota se caracteriza por fungos que apresentam hifas septadas e produção de conídios, que são esporos assexuais formados a partir de longas cadeias originadas de uma estrutura denominada conidióforo. Esses esporos têm facilidade de serem liberados e flutuam no ar como poeira, favorecendo a dispersão deste fungo pelo ambiente (Lacaz et al., 2002; Tortora et al., 2008).

Este microrganismo é conhecido apenas em sua forma assexuada e por isso se encontra em uma subfamília, dita anamórfica. Apresenta dimorfismo termo dependente, exibindo aspectos morfológicos distintos em cada fase como demonstrado na figura 1. Em temperaturas próximas a 25 °C (temperatura ambiente) se apresentam em morfotipo micelial e a 37 °C (temperatura corporal) se apresentam como levedura (San-Blas et al., 2002).

Fungos do gênero *Paracoccidioides*, em fase de levedura, apresentam colônias com aspecto cerebriforme, macias e de cor creme. Esta fase caracteriza-se, microscopicamente, por células esféricas ou ovais de 2-30 µm de diâmetro, apresentando paredes espessas e birrefringentes, aparentemente duplas, e citoplasma contendo vacúolos de lipídeos. Sua morfologia microscópica revela estruturas fúngicas com formato de “roda de leme” que representam um brotamento multipolar (Restrepo, 1978). McEwen e colaboradores (1987) verificaram que os conídios nesta forma são, geralmente, bi- ou multinucleados.

O crescimento micelial demonstra colônias pequenas com forma irregular, brancas ou com pigmentação difusa marrom (Brummer et al., 1993; San-Blas et al.,

2002). Microscopicamente, esta fase se caracteriza por hifas delgadas e septadas, apresentando clamidoconídias intercaladas ou terminais, assim como presença de artroconídias, aleurioconídias globosos e artroaleurioconídias (Edwards et al., 1991; Samsonoff et al., 1991).

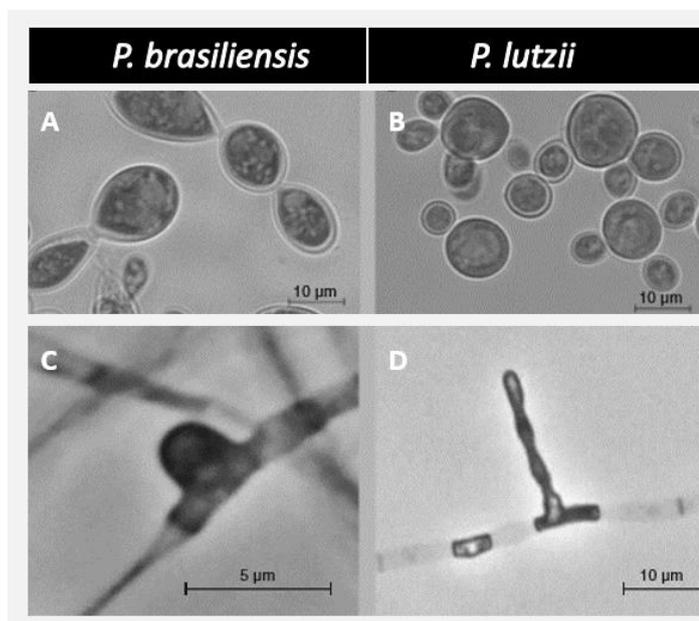


Figura 1. Transição de fase em *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. A e B: Aparência microscópica da fase leveduriforme à 37 °C, onde se observa a formação de múltiplos brotamentos; C e D: Aparência microscópica da forma micelial do fungo à 25 °C, onde se observa a formação de hifas septadas e clamidósporos (Adaptado de Bocca et al., 2013).

O dimorfismo envolve processos bioquímicos e por isso a estrutura dos carboidratos, assim como sua composição, também são alteradas no processo de transição morfológica (San-Blas et al., 2001). Genes diferentes são expressos nas diversas categorias funcionais, como catabolismo de aminoácidos, metabolismo da parede celular, resposta ao estresse oxidativo e síntese de proteínas (Bastos et al., 2007).

A parede celular de ambas as fases apresenta quitina, um polissacarídeo de N-acetilglicosamina, com maior proporção de cisteína/cistina na fase micelial em relação à fase leveduriforme (San-Blas et al., 1977; Marques, 1998). Alguns componentes relacionados à função estrutural da parede celular, como as glucanas, que estão relacionadas com a conversão de um estado para o outro, apresentam estruturas distintas. A parede celular da forma micelial é basicamente composta de β -1,3-glucanas enquanto a parede celular do morfótipo leveduriforme é basicamente composta por α -1,3-glucanas (Kanetsuna et al., 1969). A fase micelial apresenta um

metabolismo mais aeróbico enquanto que a fase leveduriforme exibe um metabolismo direcionado para a produção de etanol via fermentação do glicoxalato (Felipe et al., 2005; Rezende, 2011).

Uma intensa interação entre o patógeno e o hospedeiro definem o curso da doença. O desequilíbrio entre resposta imunológica do hospedeiro e os mecanismos de virulência causa uma quebra na homeostase e pode causar invasão, instalação e multiplicação do microrganismo, característicos do processo infeccioso (Bailão et al., 2008).

Uma série de estudos tem analisado fatores pertinentes ao fungo os quais favorecem seu desenvolvimento e disseminação pelo organismo do paciente. Já foi demonstrado que a substituição dos polímeros da parede celular é um importante fator de virulência do fungo, visto que o polímero α -1,3-glucanas protege o fungo contra enzimas do sistema imune do hospedeiro, permitindo a instalação do patógeno pelo morfotipo leveduriforme (San-Blas et al., 2002). A parede celular da forma micelial, que apresenta grande quantidade de β -1,3-glucana, é digerida pela enzima β -glucanase produzida pelos fagócitos humanos e por isso não é interessante na estruturação da fase patogênica (San-Blas et al., 1982).

Alguns antígenos extracelulares têm grande importância no processo de virulência do fungo. Dentre eles se destacam as glicoproteínas de peso molecular 43 kDa (gp43) e 70 kDa (gp70). A gp43 é uma proteína que atua como receptor de laminina, inibindo a expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e a função macrófagica, sendo assim, importante para evasão da resposta imunológica do hospedeiro pelo *P. brasiliensis* (Hogan et al., 1996; Borges-Walmsley et al., 2002; Ferreira e Almeida, 2006). Mattar-Filho e colaboradores (1997) verificaram que o teor de gp43 fica muitas vezes restrito à fase leveduriforme, correlacionando este fato à patogenicidade do fungo. A gp70 é importante no processo de inibição da fagocitose, induzida via receptor de manose e receptor de porção Fc da imunoglobulina, diminuindo a liberação de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), importantes no processo de degradação do fungo dentro do macrófago (Mato Grosso et al., 2003).

Paracoccidioides spp. são capazes de reconhecer várias moléculas de seu hospedeiro, tais como componentes da matriz extracelular (ECM). A ECM é composta basicamente por colágeno, fibras de elastina, glicosaminoglicanos,

proteoglicanos, fibronectina, laminina, sulfato de heparano, nidogênio/entatina, hialuronato, sulfato de condroitina e colágenos subtipos I, III, IV e V (Dunsmore e Rannels, 1996, Mendes-Giannini et al., 2000; Balestrini e Niklason, 2015). Diferentes estudos descrevem a importância das interações fúngicas com proteínas da ECM durante o processo de adesão, uma vez que estes compostos são utilizados como substrato e permitem a ligação dos microrganismos colonizadores nas células do hospedeiro (Chagnot et al., 2012).

Outros fatores diminuem a virulência do fungo, como hormônios femininos, que reduzem ou retardam a transformação de *P. brasiliensis* de sua forma micelial para levedura. Isto se dá por intermédio da interação de algum receptor do fungo com estes hormônios, principalmente o estradiol. Esta propriedade torna a população masculina mais susceptível a manifestar a doença, o que é confirmado por dados epidemiológicos, em que há uma maior taxa de prevalência desta doença no sexo masculino (Franco, 1987; Franco et al., 1993; Brummer et al. 1993; Restrepo et al., 1984).

Os fungos que causam doenças sistêmicas possuem propriedades que permitem o seu crescimento nas condições adversas do hospedeiro e que contribuem para o seu desenvolvimento (Casadevall e Pirofski, 1999). *Paracoccidioides* spp. apresentam esses mecanismos que lhes permite aderir e invadir barreiras impostas pelos tecidos hospedeiros e sintetizar várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasita-hospedeiro (Mendes-Giannini et al., 2000). Assim, a virulência de *Paracoccidioides* é um evento multifacetado envolvendo a expressão de múltiplos genes em diferentes estádios de infecção o que leva à colonização bem-sucedida dos tecidos hospedeiros pelo fungo (Da Silva et al., 2013).

1.3 Ecologia e epidemiologia

A PCM é uma doença endêmica que ocorre em regiões da América Latina, desde o México até a Argentina. Cerca de 80% dos casos relatados ocorreram no Brasil, e a maioria dos restantes ocorreu na Venezuela, Colômbia e Argentina (figura 2). O Brasil, que detém a maior quantidade de casos, apresenta maior prevalência

nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e Goiás (Colombo et al., 2007; Vieira et al., 2014).

As regiões que apresentam características favoráveis ao desenvolvimento do fungo possuem clima temperado ou quente, com temperatura variando entre 10 °C e 28 °C, umidade e pluviosidade anual de 500 mm a 3.500 mm, com verões chuvosos e invernos secos. A altitude destas regiões varia de 50 m a 1.700 m, com solo geralmente ácido e presença de rios e florestas tropicais e subtropicais ou de transição para o cerrado (Martinez, 2005; Góes et al., 2014).

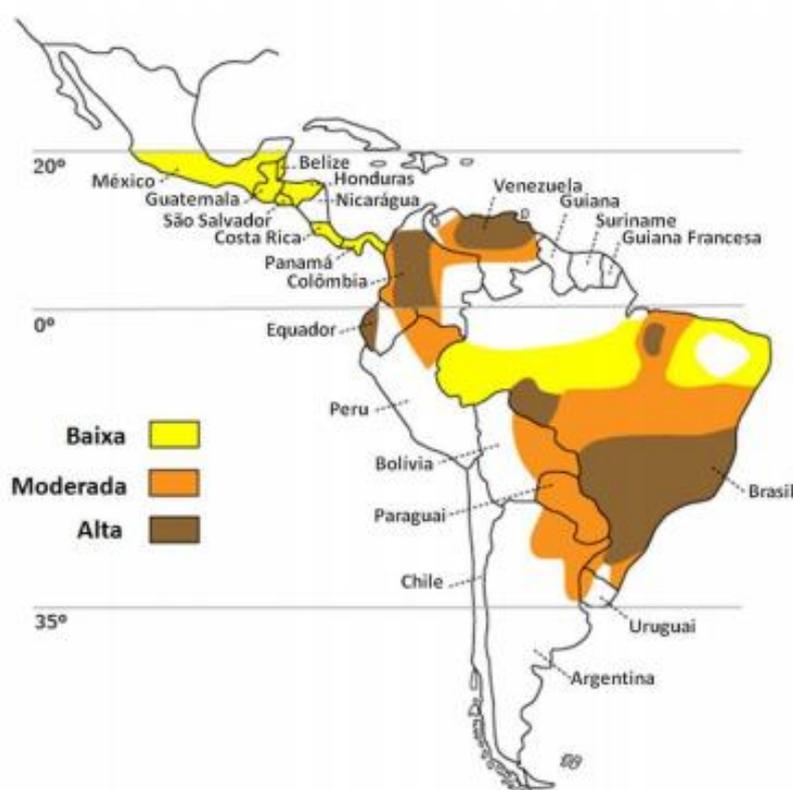


Figura 2. Distribuição geográfica da PCM. A PCM é prevalente na América Latina e, no Brasil, o maior número de casos é observado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Colombo et al., 2007).

Acredita-se que a fase micelial de *Paracoccidioides* sp., sua forma de vida saprofítica, a qual contém propágulos infectantes chamados conídios, está dispersa no solo e em detritos vegetais. Relatos de isolamento de *P. brasiliensis* dos solos de áreas endêmicas como, Argentina, Venezuela e Brasil demonstram este fato (Restrepo et al., 2001). O homem era tido como único hospedeiro animal até o reconhecimento de tatus (*Dasypus novemcinctus*) naturalmente infectados por esse fungo em regiões endêmicas da micose (Shikanai-Yasuda et al., 2006). Amostras

coletadas de rações para cães e fezes de pinguim (*Pygoscelis adeliae*) também demonstraram presença deste fungo em outros ambientes que não somente o solo (Ferreira et al. 1990; Silva-Vergara et al., 2000; Endo et al., 2004).

Estudos recentes demonstraram que *P. lutzii* é composto por uma única população monofilética e recombinante encontrada apenas no Equador e nas regiões centrais, sudoeste e norte do Brasil (Theodoro et al., 2012). Por outro lado, *P. brasiliensis* contém um complexo de quatro diferentes espécies crípticas (S1, PS2, PS3 e PS4). A espécie S1 de *P. brasiliensis* representa uma população monofilética e recombinante, amplamente distribuída na América do Sul e que tem sido associada à maioria dos casos de PCM detectados até o presente momento. Estirpes pertencentes a S1 de *P. brasiliensis* foram previamente recuperadas de tatus, solo e fezes de pinguins. A espécie PS2 é uma população parafilética e recombinante, identificada apenas no Brasil e na Venezuela. Já a espécie PS3 é composta por uma população monofilética e clonal, que foi recuperada em humanos e tatus em regiões endêmicas da Colômbia. A espécie PS4 foi recentemente encontrada e parece ser uma população monofilética de isolados clínicos recuperados da Venezuela (Matute et al., 2006; Theodoro et al., 2012).

Mais de 15.000 casos de paracoccidiodomicose foram relatados entre 1930 e 2012, número que apenas reflete parcialmente a prevalência da doença, um vez que não apresenta notificação compulsória e sua prevalência real não pode ser determinada. A taxa de mortalidade por paracoccidiodomicose variou de 0,9 a 1,0 / 1 milhão de habitantes / ano no Brasil, correspondendo a um número médio de 168 óbitos por ano no período de 1996 a 2006 (Prado et al., 2009). Considerando 5% como valor representativo para a letalidade da micose. Pode-se estimar sua incidência média em cerca de 2,0 / 100.000 habitantes / ano, ou seja, 3.360 novos casos por ano no Brasil. A PCM não tem recebido importância suficiente nas políticas de saúde pública e na indústria farmacêutica, o que dificulta o desenvolvimento de novas terapêuticas. (Prado et al., 2009; Martinez, 2010; Martinez, 2015). A co-infecção por *P. brasiliensis* / HIV tem sido relatada em países da América do Sul, e no Brasil em particular. Em áreas endêmicas, 1,4% a 1,5% dos pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) apresentam paracoccidiodomicose oportunista, geralmente mais disseminada, com maior taxa de mortalidade precoce e menor porcentagem de cura após tratamento antifúngico.

A infecção pelo HIV foi detectada em aproximadamente 5% dos pacientes com micoses e 1,4% das mortes causadas por fungos em pacientes com AIDS no Brasil foram atribuídas a paracoccidiodomicose (Paniago et al., 2005; Morejón et al., 2009; Prado et al., 2009). Os dados revelam que a micose é a oitava causa de mortalidade entre as doenças infecto parasitárias crônico-recorrentes.

Antes da introdução das sulfonamidas em 1940, todos os pacientes com Paracoccidiodomicose morriam devido a complicações da doença progressiva. Mesmo com a introdução de agentes antifúngicos, a letalidade continuou alta, de 16,2% a 27,0% no final do tratamento, de acordo com uma revisão dos dados obtidos em alguns estudos brasileiros (Del Negro, 1974). As mortes ocorridas antes ou durante a fase inicial do tratamento estão relacionadas ao diagnóstico tardio, lesões múltiplas devido à disseminação de *P. brasiliensis* e complicações da Paracoccidiodomicose, como insuficiência respiratória, insuficiência adrenal, necrose tecidual, perfuração das vísceras e hemorragia e a idade avançada. As mortes que ocorrem ao longo dos anos após o tratamento da micose são geralmente uma consequência de sequelas, particularmente a disfunção respiratória (Pereira et al., 2004; Martinez et al., 2015).

A infecção por *P. brasiliensis* geralmente é adquirida nas duas primeiras décadas de vida, sendo o pico de incidência entre 10 a 20 anos de idade (Valle et al., 2001). Contudo, as manifestações clínicas têm sido observadas, com maior predominância entre 30 e 50 anos de idade, afetando a fase mais produtiva de vida destas pessoas. Acredita-se que a baixa de ocorrência em crianças se deve, principalmente, ao longo período de latência do fungo (Martinez, 2005; Góes et al., 2014).

Até a puberdade, a incidência desta doença é igual para ambos os sexos, contudo após este período, segundo o Ministério da Saúde (2005), a PCM é verificada mais frequentemente em homens que em mulheres, em uma relação média de 11:1 nas áreas endêmicas. Esta desigualdade se deve à maior exposição dos homens às fontes de infecção e, principalmente, por fatores regulatórios hormonais. A ausência de estrógeno, responsável pela proteção contra o fungo nas mulheres, é um fato importante para confirmação destes dados (Brummer et al., 1991; Coutinho et al., 2002; Fagundes-Pereyra et al., 2006; Martinez et al., 2010).

A PCM está relacionada à ocupação profissional, e, por isso, profissionais em contato direto com o solo têm maior predisposição à infecção. Dentre os indivíduos acometidos pela PCM, a maior incidência de casos é observada em trabalhadores rurais ou que trabalham diretamente no manejo do solo (Pedroso et al., 2008; Ramos-e-Silva, 2008). Paralelamente, esta doença prevalece em indivíduos de baixo nível socioeconômico, provavelmente porque a má nutrição favorece a transição entre infecção e doença (Greer e Restrepo, 1977; Londero, 1982; Martinez et al., 2015).

Apesar desta micose ter se beneficiado do constante avanço da ciência, principalmente da área da Biologia Molecular, ainda persiste o perfil de doença de alta prevalência e morbidade, acometendo segmentos sociais específicos que apresentam grandes deficiências de acesso e suporte aos serviços de saúde (Góes et al., 2014; Martinez et al., 2015).

1.4 Processo infeccioso e Resposta imunológica

A inalação de conídios por vias aéreas é a via mais aceita de infecção por *P. brasiliensis*. Este processo está intimamente relacionado ao manejo do solo, onde os propágulos conidiais estão dispersos e podem ser facilmente inalados (Moreira, 2008).

Provavelmente, o fungo entra como protoplasto e regenera sua parede celular no citoplasma do hospedeiro. A adesão dos propágulos infecciosos de *P. brasiliensis* durante a infecção das células hospedeiras é o passo inicial e crucial para a subsequente invasão, colonização e crescimento (Mendes-Giannini, 2001). Quando inalados, os propágulos migram até os alvéolos onde sofrem a transformação da fase micelial para leveduriforme. Estes propágulos podem ser disseminados, por via hematogênica ou linfática, para os demais órgãos, permanecerem no local ou serem eliminados pelo sistema imune do hospedeiro (Figura 3) (Hamdan et al., 1987; Bialek et al., 2000; Palmeiro et al., 2005).

Em um indivíduo imunocompetente, o crescimento fúngico pode ser inibido pela resposta imune, sem deixar dano aparente ao hospedeiro (infecção subclínica). Nesses casos, o foco primário desaparece e o fungo é normalmente destruído. Entretanto, se há uma imunossupressão do hospedeiro, a infecção pode progredir

para a forma crônica ou aguda e manifestar sintomas clássicos da doença (Bialek et al., 2000; Góes et al., 2014).

Após a infecção por *P. brasiliensis* percebe-se uma maior concentração de linfócitos T no local de interação com o fungo. Este fato se dá devido ao estímulo dos antígenos de *P. brasiliensis*, que sinalizam a migração destas células para tal local. Estes linfócitos, por sua vez, sintetizam e liberam diferentes citocinas, que determinam uma resposta inflamatória específica, caracterizada por congestão vascular, edema e presença de células inflamatórias, em especial as polimorfonucleares. Em seguida, estas células vão sendo substituídas por células mononucleares, em sua maioria macrófagos (Calich et al., 2008; Fortes et al., 2011; Góes et al., 2014).

Os antígenos do fungo são reconhecidos pelos macrófagos e células dendríticas e logo são internalizados pela célula ativada, que, no caso do macrófago, pode eliminar o microrganismo por meio da ação de espécies reativas do oxigênio, enzimas líticas ou contenção microbiana. A partir do reconhecimento do antígeno, há secreção de quimiocinas e citocinas que controlam a expressão de moléculas de adesão celular e quimiotáticas, as quais regulam a entrada e ativação de células inflamatórias para o local da infecção (Souto et al., 2003; Morais, 2012). Para que o fungo seja degradado ou lisado, é necessário um sinal de ativação inicial induzido pelo interferon-gama (IFN- γ), que estimula as células a produzirem fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) o qual poderá estar envolvido, através de uma via autócrina, na fase final do processo de ativação (Brummer et al., 1993; Fortes et al., 2011; Góes et al., 2014). Além disso, o IFN- γ ativa os macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO), o qual inibe a transformação de *P. brasiliensis* de micélio para levedura (Gonzales et al., 2000). Em alguns casos, quando não há ativação de IFN- γ , os neutrófilos e os macrófagos, ao chegarem ao foco infeccioso não conseguem digerir o fungo e impedir a sua multiplicação (Góes et al., 2014).

Os fagócitos possuem importante papel na defesa dos hospedeiros, uma vez que *P. brasiliensis* é um microrganismo intracelular facultativo (Morais, 2012). Os linfócitos do tipo 1 (LTh1) que produzem IL-2, TNF- α e IFN- γ , favorecem a ativação de macrófagos. Os linfócitos auxiliares do tipo 2 (LTh2) liberam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que inibem a imunidade celular. Essas interleucinas podem inibir a atividade de LTh1, por intermédio de citocinas supressoras IL-4 e IL-10, além de favorecer a

síntese de anticorpos. A depressão da resposta LTh1 promove diminuição de leucócitos, da atividade de células *natural killer* (NK), da produção de IFN- γ , TNF- α e de IL-2, e conseqüente depressão da resposta proliferativa de linfócitos, favorecendo o estabelecimento da doença (Bozzi et al., 2004; Shikanai-Yasuda et al., 2006; Pinzan et al., 2010; Fortes et al., 2011).

Em Paracoccidioidomicose, vários estudos indicam que, entre os receptores do tipo Toll (TLR), os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) relacionados a leveduras de *P. brasiliensis* são reconhecidas por TLR2 e TLR4 e que estes são utilizados como via de entrada em macrófagos para infectar hospedeiros mamíferos, aumentando a capacidade fagocítica e secreção de óxido nítrico (Blotta et al., 1999; Camargo, 2008; Bonfim et al., 2009; Morais, 2012).

A ativação do complemento pelo *P. brasiliensis* foi confirmada por vários estudos. Ambas as vias, clássica e alternativa, são ativadas em pacientes como resposta ao fungo (Calich et al., 2008). Munk e colaboradores (1992) verificaram a ativação do sistema complemento pela via clássica e observaram que seus produtos possuem grande importância na opsonização de células leveduriformes do *P. brasiliensis* (Lacaz et al., 2002).

A reação granulomatosa na PCM é resultado de uma resposta imunológica ao fungo *P. brasiliensis*. Este processo se dá através do infiltrado de células no local de instalação do fungo, onde as células recrutadas acumulam-se em torno das células leveduriformes (Camargo e Franco, 2000; Lacaz et al., 2002). Este se inicia a partir da apresentação do antígeno, pelas células dendríticas e macrófagos e que, quando associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), são apresentados aos linfócitos T-auxiliares. Os linfócitos são então ativados e sofrem expansão clonal, secreção de citocinas e recrutamento de leucócitos adicionais. Por meio de quimiotaxia, os fibroblastos deslocam-se para o local de lesão e produzem colágeno, a fim de auxiliarem no reparo e na cicatrização do local, mas que, por sua vez, levam à fibrose tecidual (Franco et al., 1988; Brito & Franco, 1994; Bertini et al., 2007).

A reação granulomatosa é um importante mecanismo para o controle da multiplicação e dos efeitos tóxicos das células leveduriformes. Este processo ajuda a delimitar a patologia e por sua vez evitar a disseminação do patógeno (Camargo e Franco, 2000; Lacaz et al., 2002).

Em pacientes que apresentam a forma menos grave da PCM, a resposta imune do hospedeiro induz granulomas compactos e densos que são associados com baixos números de células fúngicas. Entretanto, os pacientes com a doença grave, desenvolvem, frequentemente, granulomas frouxos associados com altos números de células de leveduras viáveis. 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, Lacaz et al., 2002; Góes et al., 2014).

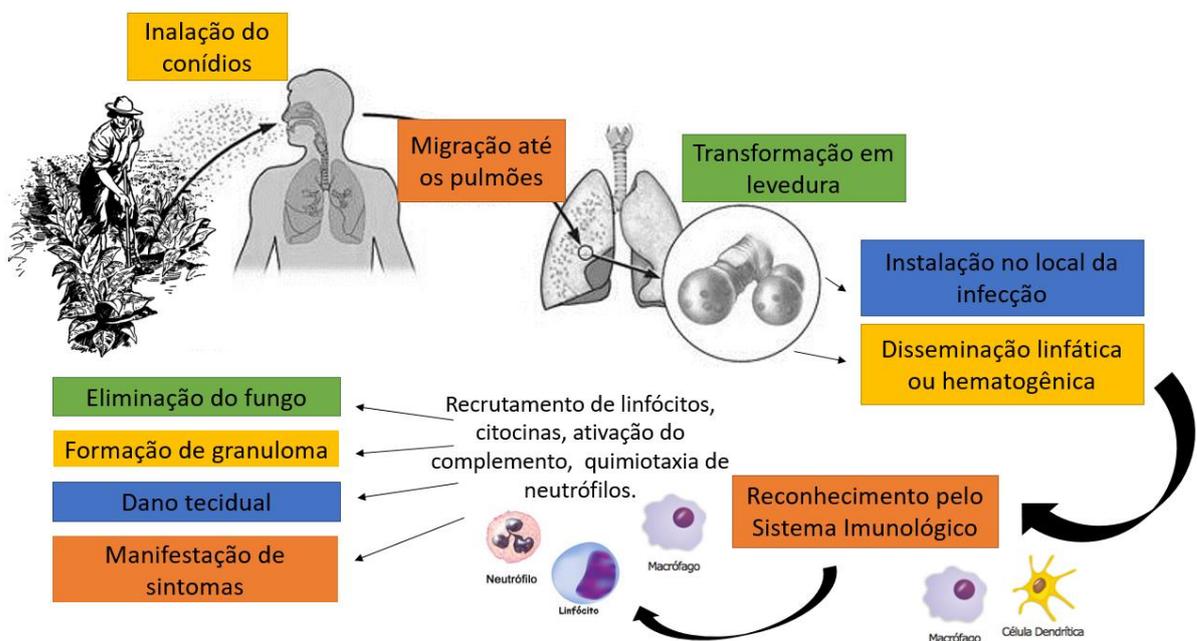


Figura 3. Ciclo biológico hipotético de *P. brasiliensis*. Inicialmente o fungo encontra-se no solo, sob a forma miceliana. Os conídios dispersos no ambiente são inalados pelo hospedeiro, podem assumir seu morfotipo leveduriforme e levar à doença clínica.

1.5 Formas clínicas

A PCM infecção se caracteriza pelo processo de entrada do fungo no organismo e sua posterior eliminação pelo sistema imune. Neste caso, não há depressão da resposta imune celular, geralmente, assintomática e ocorre, frequentemente, em indivíduos saudáveis que residem em áreas endêmicas e demonstram reatividade ao teste de pele com paracoccidioidina (Restrepo-Moreno, 1993). A PCM infecção também pode desenvolver lesões residuais. No caso da

infecção se tornar sintomática e/ou se disseminar para outros órgãos é caracterizada como PCM-doença, que pode ser dividida em forma crônica (adulta) ou forma aguda (juvenil) (Franco et al., 1987; Shikanai-Yasuda et al., 2006).

A forma aguda ou subaguda, também chamada de forma juvenil, representa cerca de 3 a 5% dos casos e se caracteriza por pequenos períodos de incubação do fungo. É a forma mais grave, com rápida disseminação para órgãos do sistema retículo-endotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea) apresentando múltiplas lesões (multifocal). Também pode se apresentar de forma moderada onde há deterioração do estado geral e da capacidade de trabalho, mas que, geralmente, compromete apenas um sistema. Ocorre em crianças e adultos jovens de ambos os sexos e os pacientes, em geral, apresentam depressão da resposta imune celular e aumento na produção de anticorpos específicos. Os achados histopatológicos da literatura demonstram a presença de processo inflamatório inespecífico, com granulomas pouco organizados contendo numerosos fungos, que também pode ser observado na forma crônica (Franco et al., 1987; Restrepo-Moreno, 1993; Shikanai-Yasuda et al., 2006; (Wanke e Aide, 2009).

A forma crônica, também conhecida como forma 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. Pode ser unifocal, onde há manifestações de sintomas referidos a apenas um órgão ou sistema. Neste caso a imunidade celular está pouco deprimida e os anticorpos em nível moderado. Os pulmões, geralmente, são os órgãos mais afetados nesta forma da doença. A doença pode se disseminar para outros órgãos e desta forma apresenta-se como multifocal, levando à formação de lesões secundárias nas membranas mucosas, pele, linfonodos, glândulas adrenais e outros (Franco et al., 1987; Ameen et al., 2009).

De maneira geral, o órgão acometido pela PCM sofre fibrose, o que pode interferir seriamente no quadro clínico do paciente já que esta leva a alterações anatômicas e funcionais dos órgãos afetados durante a doença. A forma residual é resultado deste processo que se dá pela formação de sequelas cicatriciais ou lesões ativas, como enfisema pulmonar. Estas lesões são de grande impacto social e econômico na sociedade visto que podem limitar a vida do paciente em diversas questões (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

De acordo com Londero (1986), as manifestações pulmonares são divididas em formas clínicas regressivas, progressiva infanto-juvenil e progressiva do adulto. No caso da forma regressiva não há manifestação de sintomas. Em contrapartida, a forma progressiva infanto-juvenil é mais grave e pode ser do tipo disseminada aguda. A forma progressiva crônica caracteriza-se como a forma multifocal, ou seja, disseminada.

A infecção por *P. brasiliensis* pode ser distribuída de diferentes formas, levando em conta seu avanço infeccioso e seu agravamento clínico. Segundo Franco e colaboradores (1987), a PCM pode ser classificada como PCM-infecção, PCM-doença ou PCM-sequelar, conforme demonstrado na figura 4.

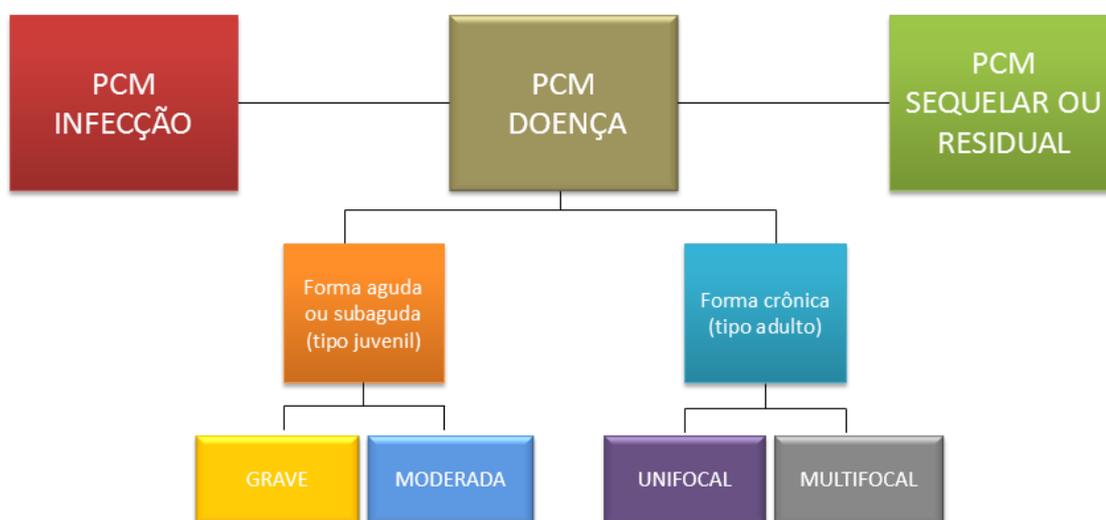


Figura 4. Formas clínicas da PCM segundo Franco e colaboradores (1987). A PCM-infecção caracteriza-se pela entrada do fungo no hospedeiro, enquanto que a PCM-doença é a manifestação dos sintomas da doença de forma aguda ou crônica. A PCM-sequelar ou residual ocorre em consequência da resposta inflamatória gerada pelo hospedeiro contra o patógeno.

1.6 Diagnóstico da PCM

O diagnóstico micológico da PCM é feito a partir de espécime clínico obtido de lesão suspeita e examinado diretamente, à fresco, entre lâmina e lamínula e, após clarificação e homogeneização com hidróxido de sódio ou potássio, com ou sem coloração. Também pode ser realizado o diagnóstico após o cultivo. Este exame é baseado na identificação de células leveduriformes birrefringentes ou de duplo contorno com brotamento simples ou múltiplo, também denominado de “roda

de leme”. Este método é de difícil realização e muito demorado quando há necessidade de cultivo, sendo este o motivo de estabelecer técnicas mais rápidas e de fácil reprodução para aplicação clínica (Ambrosio et al., 2014).

O diagnóstico presuntivo da PCM pode ser baseado em provas sorológicas, como evidência indireta da presença do fungo no paciente, quando não é possível o seu isolamento. A detecção de anticorpos contra antígenos do *Paracoccidioides* ou a existência desses antígenos em fluidos corporais constituem critério indireto do diagnóstico de PCM (Marques, 2003; Shikanai-Yasuda et al., 2006; Camargo, 2008).

Os métodos de biologia molecular, como hibridização *in situ*, reação em cadeia da polimerase (PCR) tradicional, *nested* PCR e PCR em tempo real têm sido propostos para o diagnóstico mais sensível e específico de PCM, porém ainda não estão disponíveis na prática clínica. A PCR constitui-se em excelente alternativa para o diagnóstico da PCM em comparação com os métodos convencionais, uma vez que pode detectar baixa carga fúngica, chegando a obter picogramas de DNA/mL de espécime clínico e pode ser usada em pequenas quantidades de amostras (Gomes et al., 2000; Ambrosio et al., 2014).

A intradermorreação com paracoccidioidina (gp43) possui grande valor na PCM-infecção. É um exame imunológico com aplicações em inquéritos epidemiológicos, prognóstico e controle de cura (Brummer et al., 1993). A gp43 é o principal componente da parede fúngica e é secretada em sua fase patogênica como componente antigênico; desta forma possui grande utilização como marcador no reconhecimento de anticorpos séricos em pacientes com PCM (Fortes et al., 2011; Ambrosio et al., 2014).

Em 1996, McEwen e colaboradores descreveram a clonagem e sequenciamento de uma região genômica de *P. brasiliensis* que codificava uma proteína antigênica de aproximadamente 27 kDa. A Pb27, é uma proteína citoplasmática associada à parede celular (Reis et al., 2008; Garcia Blanco et al., 2011). Essa localização é interessante visto que proteínas da parede celular são alvo preferencial para o desenho de drogas antifúngicas e vacinas, já que a parede celular dos fungos desempenha papel ativo na interação patógeno-hospedeiro e seus componentes são específicos para fungos (Pitarch et al., 2008). Em 1998, Ortiz e colaboradores (1998) utilizaram essa proteína recombinante em ensaios de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para detecção de anticorpos

reativos em soros de pacientes com PCM. O antígeno foi capaz de identificar a presença de anticorpos em 73,4% dos soros analisados. A Pb27r, também já foi utilizada como o antígeno em testes de *dotblot*. Nesses ensaios, soros de pacientes com PCM utilizados em conjunto ou individualmente, reconheceram a proteína, com ausência de reação cruzada com outras micoses ou tuberculose e apresentaram sensibilidade de 100%. Mais uma vez, a Pb27 recombinante foi confirmada como sendo de grande valor no sorodiagnóstico de PCM e agora em um novo formato de teste, diferente do ELISA (Correa et al., 2007). Diéz e colaboradores (1999) utilizaram a técnica de PCR para estudos ecológicos de *P. brasiliensis*. Nesse ensaio, eles avaliaram a amplificação da sequência nucleotídica de Pb27 em solos artificialmente contaminados com o fungo e em tecidos de tatus capturados em uma área endêmica na Colômbia. Esse estudo mostrou que a sequência do gene codificador da Pb27 pode ser utilizada como marcador da presença do fungo em diferentes amostras (Coitinho et al., 2013; Ambrosio et al., 2014).

A mesma proteína, Pb27, combinada com outro antígeno de *P. brasiliensis*, a Pb40r, forneceu um excelente ensaio de imunodiagnóstico, com altos valores de sensibilidade e especificidade, mesmo em relação a outras micoses semelhantes (Fernandes et al., 2011a; Fernandes et al., 2011c).

1.7 Tratamento da PCM

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). Diferentemente de outros fungos patogênicos, *P. brasiliensis* é um microrganismo sensível à maioria das drogas antifúngicas, inclusive aos sulfamídicos. Consequentemente, existem várias categorias de drogas que podem ser usadas para o tratamento da PCM como, as Sulfonamidas, a Anfotericina B e os derivados do Imidazol (Menezes et al., 2006).

As Sulfonamidas são usadas desde 1940 para tratamento da PCM (Ribeiro, 1940). Esta droga apresenta administração oral, baixo custo e baixos níveis de toxicidade, e por isso tem sido usada com frequência. Em contrapartida, sua principal desvantagem é o longo período requerido para o tratamento (acima de 3

anos) e a taxa de recidiva é significativa (25%). Às vezes, a recidiva é acompanhada por resistência induzida do fungo (Ambrosio et al., 2014b; Restrepo-Moreno, 1993).

A Anfotericina B, introduzida em 1958, é mais eficiente do que as sulfonamidas no tratamento da PCM e, desde então, se tornou a principal ferramenta para o tratamento de pacientes com a doença grave disseminada. Entretanto, seus efeitos colaterais, administração intravenosa (tratamento hospitalar) e alto custo dificultam a sua utilização. A Anfotericina B atua como fungicida ligando-se ao ergosterol, esteróide presente na membrana de fungos sensíveis, alterando a permeabilidade desta e causando a perda de constituintes citoplasmáticos. Este medicamento apresenta alta taxa de nefrotoxicidade, o que pode prejudicar o paciente em determinados casos (Restrepo-Moreno, 1993; Martinez, 2005; Ambrosio et al., 2014b).

Os derivados do Imidazol são drogas de administração oral efetivas no tratamento da PCM e foram implantadas a partir de 1978. Os azólicos atuam sobre as enzimas dos fungos, que a partir de uma série de reações bioquímicas bloqueiam a síntese do ergosterol, o que altera a permeabilidade da membrana e a viabilidade fúngica. Também agem modificando a síntese de lipídeos e inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos (Martinez, 2005). O primeiro azólico a ser administrado foi o cetoconazol, em que mais de 90% dos pacientes responderam a sua administração por períodos mais curtos, mas é importante ressaltar que as lesões fibróticas permanecem como sequelas. Esta droga tem demonstrado poucos efeitos colaterais, apresentando quadros de distúrbios gastrointestinais e endócrinos. Outros azólicos se destacam na terapia da PCM, entre eles o itraconazol e o fluconazol (Restrepo-Moreno, 1993; Ambrosio et al., 2014b).

A proteína Pb27 recombinante também foi utilizada em ensaios de imunização em camundongos BALB/c desafiados com *P. brasiliensis*. Foi observado um efeito aditivo entre a imunização associada à quimioterapia com fluconazol, sugerindo que uma vacina baseada na Pb27r pode ser utilizada para melhorar o tratamento com antifúngicos (Fernandes et al., 2011b). Morais e colaboradores (2013) observaram que a imunização de camundongos com Pb27r reduz a carga fúngica e o infiltrado inflamatório dos pulmões.

Todas estas terapias devem ser controladas por exames periódicos. Na fase inicial do tratamento, 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 (Mendes, 2005). Além da terapêutica antifúngica específica, o paciente com PCM necessita de medidas gerais que melhorem o estado do paciente, uma vez que desnutrição proteico-calórica e a imunodepressão celular contribuem para o agravamento da PCM (Ambrosio et al, 2014b).

1.8 Processo de disseminação

A PCM é uma doença sistêmica e por isso pode acometer qualquer órgão, através da sua disseminação por via canicular, hematogênica ou linfática, causando lesões sintomáticas ou não. Quando assintomáticas, as lesões constituem apenas achados de necropsias e, quando sintomáticas, são um grande problema, visto que nem sempre a etiologia paracoccidioidica é suspeitada (Góes et al., 2014).

Quando há acometimento unifocal, comumente são encontrados fungos apenas em tecido pulmonar e lesões mucocutâneas, enquanto que na forma multifocal são encontrados vários focos secundários da doença, e esta pode se tornar do tipo generalizada (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Ramos-e-Silva e Saraiva, 2008).

O acometimento do pulmão está associado ao processo de infecção que ocorre por meio da inalação de conídios, pelas vias superiores aéreas e sua posterior instalação nos alvéolos pulmonares. Os principais sintomas manifestados, quando do comprometimento deste órgão, são a dispneia e a tosse. A maioria dos pacientes analisados em exames de necropsia apresenta envolvimento pulmonar com a formação de granuloma. Também são visualizadas fibroses progressivas, retráteis e deformantes, originando quadro de fibrose difusa. Nos pulmões também desenvolvem um quadro funcional obstrutivo e de hipóxia na maioria dos casos. Além disso, tem se observado destruição do leito capilar, onde se observa paciente com “*cor pulmonale*” crônico (Del Negro et al., 1982; Lacaz et al., 2002; Araújo, 2011).

Segundo Del Negro e colaboradores (1982) e Araújo (2011), diferentes autores descreveram a frequência de lesões encontradas em exames de necropsias, entre os anos de 1960 a 1992. As lesões mucocutâneas, por sua vez, estão

intimamente relacionadas à disseminação linfática e por isso também se percebe uma alta taxa de comprometimento dos linfonodos, conforme a quadro 1.

Quadro 1. Frequência de acometimento dos órgãos/sistemas pela PCM por diferentes autores (Araujo, 2011).

Órgãos	Autores (Ano) – (Numero de casos Necrópsias)					
	Benaim Pinto (1961) (50)	Del Negro (1961) (56)	Brass (1969) (36)	Salfelder (1969) (11)	Dillon (1972) (14)	Botucatu (1992) (57)
Pulmões	69,6%	67,8%	75,0%	100,0%	42,0%	89,4%
Mucosas	55,6%	41,1%	40,0%	27,3%	NA	54,1%
Linfonodos	67,7%	64,3%	33,0%	90,9%	28,0%	100,0%
SNC	2,2%	12,5%	NA	9,1%	21,0%	22,8%
Suprarrenais	56,7%	48,2%	80,0%	36,4%	57,0%	49,1%
Baço	17,6%	39,3%	2,7%	54,5%	21,0%	22,8%
Fígado	29,0%	37,5%	27,0%	45,4%	21,0%	28,0%
Rins	6,2%	19,6%	8,3%	9,1%	14,0%	15,7%
Pele	31,3%	39,3%	2,7%	0,0%	64,0%	17,5%
Gastrointestinal	23,4%	28,4%	2,7%	18,2%	NA	14,0%
Coração	2,0%	NA	2,7%	NA	7,0%	3,5%
Medula Óssea	NA	NA	NA	9,1%	NA	10,5%
Reprodutor	6,2%	NA	2,7%	0,0%	NA	NA
Ossos	4,7%	5,3%	8,3%	NA	NA	NA

Mucosas (oral, faríngea, laríngea); SNC: sistema nervoso central; reprodutor: Aparelho reprodutor (testículos, próstata, ovários, útero); NA: dados não assinalados pelos autores.

O fungo apresenta tropismo pelo sistema reticulo endotelial e por isso o envolvimento linfonodal tem sido muito comum. O comprometimento linfonodal se dá através das lesões teciduais dos linfonodos e tem sido identificado como adenopatia subclínica. Clinicamente, podem ser observadas linfonodomegalias regionais ou generalizadas, podendo estas ser acompanhadas de linfodema (Costa et al., 2005).

Lesões na mucosa, seja oral, faríngea, laríngea, assim como na pele, também são sintomas frequentes do processo de infecção por *P. brasiliensis*. Estes órgãos também são comumente afetados em razão do processo de inalação do fungo pelas vias superiores, onde ele pode se instalar e se tornar o foco da doença. É possível perceber lesões ulceradas, infiltradas, duras a palpação e apresentando numerosos pontos hemorrágicos em toda superfície (Lacaz et al., 2002; Costa et al., 2005). Além destes achados, por se tratar de uma doença sistêmica, já foram identificadas

lesões no aparelho digestivo; nas suprarrenais, que podem levar a insuficiência glandular crônica; nos gânglios; nos olhos; nos órgãos genitais; no aparelho urinário, como rins, ureteres e bexiga; no sangue; no baço; no fígado; na medula óssea; e no coração. Observou-se também lesões ósseas, osteoarticulares e/ou neurológicas, que podem levar a inflamação das meninges com consequentes lesões isquêmicas ou produção de lesões necróticas no encéfalo (Del Negro et al., 1982; Igami et al., 2002; Costa et al., 2005; França et al., 2008; Arruda et al., 2013; Safe et al., 2014).

Estudos experimentais em modelo animal, como descrito por Loures e colaboradores (2010) que caracterizam o acometimento de órgãos como fígado e baço, resultado do processo de disseminação do fungo, são frequentes na literatura atual. Entretanto, outros órgãos importantes não têm sido reportados com frequência. Isso demonstra a importância que os pesquisadores têm atribuído a determinados órgãos, mas que não são suficientes para o entendimento total do agravamento clínico do paciente.

Há uma série de órgãos e sistemas que estão intimamente relacionados à via de disseminação e que não são frequentemente descritos, sendo assim considerado como um órgão de ocorrência rara, como é o caso do sistema cardiovascular. O acometimento da função de algum órgão deste sistema pode estar sendo subdiagnosticado, e por sua vez, pode estar relacionado com o agravamento clínico do paciente e, ainda, deixar sequelas no mesmo.

1.8.1 Histórico de infecção do tecido cardíaco e vasos sanguíneos

O sistema cardiovascular ou circulatório é uma ampla rede de vasos, de diferentes tipos e calibres, que permite a comunicação de todas as partes do corpo. Dentro desses vasos circula o sangue, que é impulsionado pelo bombeamento, resultado das contrações rítmicas do coração (Burghardt, 2011).

O coração contém quatro câmaras, sendo dois átrios e dois ventrículos. Os átrios servem como reservatórios do volume sanguíneo, que será enviado para os ventrículos. O átrio direito recebe sangue venoso retornando do corpo, através da veia cava inferior e superior. O átrio esquerdo recebe sangue oxigenado dos pulmões através das quatro veias pulmonares (Burghardt, 2011).

A pequena circulação ou circulação pulmonar é o movimento do sangue, que sai do ventrículo direito, através da artéria pulmonar, passando pelos alvéolos, onde é oxigenado. Depois de oxigenado, o sangue retorna para o átrio esquerdo através das veias pulmonares, seguindo para o ventrículo esquerdo e para a grande circulação. A grande circulação ou circulação sistêmica é o movimento do sangue que sai pela aorta para os demais órgãos do corpo e retorna pelas veias cavas inferior e superior de volta ao átrio esquerdo (Burghardt, 2011). Estes processos tornam o coração um ponto de encontro para todos os demais órgãos, fazendo um elo entre o pulmão, que se caracteriza como um foco primário da PCM, e os demais órgãos do corpo que podem se tornar o foco secundário da doença.

A parede do coração é composta de três camadas: epicárdio, miocárdio e endocárdio. O epicárdio, a camada exterior, é constituída por células epiteliais escamosas subjacentes ao tecido conjuntivo. O miocárdio, a camada do meio, é a maior parte da parede do coração. Esta camada apresenta músculos contráteis que auxiliam no batimento cardíaco. O endocárdio, camada mais interna do coração, contém tecido endotelial com pequenos vasos de sangue e feixes de músculo liso. Uma camada de tecido conjuntivo circunda o pericárdio do coração e atua como um saco resistente e protetor. O pericárdio é dividido em pericárdio fibroso e o pericárdio seroso. O pericárdio fibroso, composto por um tecido branco, resistente e fibroso, ajusta-se frouxamente ao redor do coração. O pericárdio seroso, a porção fina, lisa e no interior, tem duas camadas: a camada parietal, que reveste o interior do pericárdio fibroso e a camada visceral, que adere à superfície do coração (Burghardt, 2011).

O coração contém quatro válvulas: duas atrioventriculares, tricúspide e mitral e duas semilunares, denominadas aórtica e pulmonar. As válvulas abrem e fecham em resposta a mudanças na pressão dentro das câmaras. Eles servem como portas de sentido único que mantêm o sangue fluindo para frente através do coração. Quando as válvulas fecham, previnem o refluxo do sangue. A valva tricúspide está localizada entre o átrio direito e o ventrículo direito. A válvula mitral está localizada entre o átrio esquerdo e o ventrículo esquerdo (Burghardt, 2011).

A primeira referência a comprometimento circulatório na PCM deve-se a Pereira & Vianna (1911) com a publicação do caso de “piohemia blastomicótica”,

que apresentava quadro de insuficiência cardíaca e que, na necropsia apresentou pericardite, em paciente infectado com *P. brasiliensis* (Del Negro et al., 1961).

Em casos de autopsia analisados por Motta (1948), foi visualizada a presença de *P. brasiliensis* no pericárdio e no miocárdio. Em 1956, Silva observou em exames de necropsia, a formação de granulomas pequenos e fibras cardíacas de pigmento pardo amarelado. Também houve estudos que demonstraram miliar da miocardite, sugestiva de patogenia hematogênica (Viera e Silva et al., 1974). Diversos casos de aortite foram identificados em pacientes infectados (Benain Pinto, 1950; Brass, 1969).

No 26º Congresso Brasileiro de Cardiologia, foi enviado um resumo intitulado “Lesões vegetantes sobre valva aórtica e comprometimento difuso do epicárdio e endocárdio” referentes ao fungo *P. brasiliensis* (Milazzo et al., 1970). No XVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, em 1980, foi informada presença de inúmeras células de *P. brasiliensis* no endocárdio causando endocardite valvular (Boulos et al., 1980). A destruição e a restrição do leito capilar com frequência levam os pacientes ao “*cor pulmonale*” crônico. Este termo se refere à alteração na estrutura e funcionamento do ventrículo direito, causada por doença pulmonar. A síndrome respiratória obstrutiva e a fibrose residual constituem os subsídios essenciais para instalação de “*cor pulmonale*” na evolução da doença (Campos et al., 1991).

Machado Filho e seus colaboradores (1960) avaliaram lesões pulmonares e suas repercussões cardiovasculares, através de dados hemodinâmicos, oximétricos e angiopneumográficos, verificando em um grupo de 22 pacientes, quatro apresentavam sinais evidentes de hipertensão pulmonar (Lacaz et al., 2002). Mais casos clínicos de pacientes infectados por *P. brasiliensis* apresentavam insuficiência cardíaca congestiva associado a hipertensão da circulação pulmonar, que em exames de necropsia apresentavam hipertrofia das cavidades direitas do coração (Prado, 1944).

A hipertrofia do miocárdio é uma resposta cardíaca compensatória de longa ação, que surge para manter o débito cardíaco, frente a uma situação de aumento na sobrecarga de pressão ou de volume.

A insuficiência cardíaca congestiva, em geral, desenvolve-se lentamente, devido à perda gradual da eficiência cardíaca, junto à sobrecarga de pressão ou de

volume à lesão miocárdica. É iniciada por cardiopatias diversas, ou aumento de trabalho associado a doenças pulmonares, renais ou vasculares. Causa redução do fluxo aos tecidos periféricos (insuficiência projetada) e acúmulo de sangue antes dos pulmões (insuficiência retrógrada). Mais uma vez os estudos das cardiopatias mostram intensa relação com o pulmão, que, neste caso, é o principal órgão acometido pela infecção fúngica aqui estudada.

Conforme demonstrado por Araújo (2011), das 41 requisições de necropsia, que acompanhavam o paciente após o seu óbito, no encaminhamento ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) após autorização escrita feita por seu responsável, foi demonstrado, em exame realizado em 1961, a presença fúngica no miocárdio hipotrófico (Figura 5).

Outras alterações, sugestivas da presença fúngica, também foram observadas neste estudo em diversos casos. Entre elas se destacam “*cor pulmonale*” e hipotrofia parda do miocárdio, que, apesar de não serem descritas como patologias relacionadas diretamente com a infecção, não se pode excluir estes achados, que já foram confirmados em outros casos por outros autores. A hipotrofia parda do miocárdio se caracteriza pela diminuição deste tecido em função da diminuição da atividade ou metabolismo das células ali presentes. A célula atrófica tem menor quantidade de mitocôndrias e de retículo endoplasmático e pode, também, apresentar vacúolos autofágicos, contendo fragmentos de membranas, mitocôndrias e retículo endoplasmático. Parte dos restos celulares pode resistir à digestão e persistir como corpúsculos residuais, como os grânulos de lipofuscina. Quando em quantidade suficiente, a lipofuscina dá uma coloração parda ao tecido (atrofia parda), que apesar de não comprometer a função celular, pode se acumular nas fibras e auxiliar na detecção e confirmação de hipotrofia parda deste órgão.

Apesar dos poucos casos descritos, percebe-se que o sistema cardiovascular está envolvido na PCM e por isso deve receber atenção especial, visto que o seu comprometimento pode estar associado ao agravamento do quadro clínico do paciente.

2 JUSTIFICATIVA

Diante do fato de que a PCM é uma doença que afeta indivíduos, principalmente na sua fase mais produtiva de vida, levando a um impacto social e econômico, faz-se cada vez mais necessário a caracterização e o estudo desta micose para a obtenção de um melhor diagnóstico e tratamento. Outro fator que torna o trabalho relevante é o fato de que a PCM possui altas taxas de mortalidade entre as doenças infecciosas e parasitárias crônicas recorrentes, mesmo não sendo uma doença de notificação compulsória. A PCM é uma doença de grande ocorrência no Brasil e, por se tratar de uma doença sistêmica, necessita de uma melhor caracterização dos possíveis sistemas acometidos por sua disseminação, visando posteriores estudos de formas de imunização ou tratamento.

Sabe-se que o principal órgão acometido pela PCM é o pulmão e que os principais sintomas relacionados ao comprometimento pulmonar se dão pela formação de áreas fibrosas e insuficiência pulmonar, que, em geral, está intimamente relacionada à sobrecarga cardíaca. As células leveduriformes podem se disseminar para os tecidos por vias linfáticas e hematogênicas a partir de um foco primário. Dessa forma, supõe-se que a infecção por *P. brasiliensis*, ao acometer o coração, possa promover inflamação local e comprometer a função cardíaca, que, por sua vez, afetaria diretamente o sistema cardiovascular e pulmonar.

Os relatos da presença de *P. brasiliensis* no coração, por meio de exames de necropsia, permitem inferir que a infecção vem sendo subdiagnosticada e, conseqüentemente, o comprometimento da função ventricular vem sendo subestimado (Benaim-Pinto, 1961; Brass, 1969; Dillon, 1972). Além disso, o Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFMG reportou a ocorrência de focos de infecção em corações de camundongos experimentalmente infectados (Reis, 2007). Dessa forma, pode-se inferir que os casos de infecção cardíaca por *P. brasiliensis* não vêm sendo avaliados e tal situação é capaz de promover uma reação inflamatória local, provocando a formação de áreas fibrosas e que conseqüentemente podem comprometer diretamente a função cardíaca, o que possivelmente contribuiria para o agravamento do quadro clínico do paciente infectado (Brummer et al., 1993; Shikanai-Yasuda et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar a infecção cardíaca por *P. brasiliensis* em camundongos BALB/c.

3.2 Objetivos específicos

Identificar a infecção cardíaca por *P. brasiliensis* em camundongos BALB/c por meio da recuperação de colônias viáveis, amplificação de DNA genômico e análise histológica.

Identificar e caracterizar o infiltrado inflamatório da infecção cardíaca por *P. brasiliensis* em camundongos BALB/c por meio de análise histológica e quantificação de citocinas inflamatórias.

Detectar a presença de fibrose no tecido cardíaco frente a infecção por *P. brasiliensis* em camundongos BALB/c.

Identificar a infecção cardíaca por *P. brasiliensis* em camundongos BALB/c imunossuprimidos e comparar aos resultados obtidos com camundongos imunocompetentes.

4 MATERIAL E METÓDOS

4.1 Microrganismo *Paracoccidioides brasiliensis*

A cepa utilizada de *P. brasiliensis* Pb18 foi cedida pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Carlos Pelleschi Taborda do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantida, por repiques semanais, em meio de cultura YPD Ágar (0,5% extrato de levedura, 0,5% peptona A, 1,5% D-glucose, 1,5% ágar) à 37 °C. Para manutenção da virulência, o fungo foi utilizado na infecção de camundongos BALB/c e as leveduras de *P. brasiliensis* foram recuperadas do tecido destes animais em meio de cultura BHI Ágar (Difco). Essas infecções foram realizadas por três vezes sucessivas até a utilização desse fungo na PCM experimental (Fernandes et al., 2011).

4.2 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c de 6-8 semanas de idade, e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Protocolo nº 321/2012) e disponibilizados pelo biotério do ICB-UFMG (Belo Horizonte, MG).

Estes animais foram divididos em quatro grupos: controle negativo (CN), animais que não sofreram intervenções; infectados (INF), animais infectados com a cepa Pb18; controle negativo imunossuprimido (CNI), animais imunossuprimidos com radiação gama, mas não infectados; e infectados imunossuprimidos (INF+IMU), animais imunossuprimidos com radiação gama e infectados com a cepa de Pb18.

Os grupos com os animais imunocompetentes (CN e INF) foram analisados com 7(T1), 15(T2), 30(T3) e 60(T4) dias após a infecção e os grupos com os animais imunossuprimidos (CNI e INF+IMU) foram analisados apenas com 7(T1) dias após a infecção, devido as suas condições e limitações de sobrevivência. Cada intervalo de tempo contou com 9 animais por grupo, conforme estabelecido por análise estatística de cálculo amostral e aprovação da CEUA. O quadro 2 resume os dados de cada grupo analisado.

Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia, em condições adequadas à manutenção da qualidade de vida dos mesmos e foram diariamente acompanhados para observação da sobrevivência e de sinais indicativos de dor, tais como postura arqueada, vocalização ao ser manuseado, piloereção e perda de peso. Quando da confirmação destes sintomas, foi realizada a eutanásia do animal (Neves et al., 2013).

Quadro 2. Grupos experimentais

Grupos	Nº de animais	Infecção	Irradiação	Tempo (DPI)
CN	36	-	-	7, 15, 30 e 60
INF	36	3x10 ⁵ células	-	7, 15, 30 e 60
CNI	9	-	5 Gy	7
INF + IMU	9	3x10 ⁵ células	5 Gy	7

4.3 Imunossupressão

Parte dos camundongos BALB/c foi imunossuprimido no Laboratório de Radiação Gama do CDTN/CNEN, a uma dose de 5 Gray de Co⁶⁰, fonte da radiação. Os animais foram mantidos sob condições livres de patógenos utilizando gaiolas isoladoras e estéreis. Para verificação da imunossupressão dos animais, foi realizada a contagem de leucócitos totais presentes no sangue total dos animais 24h antes da radiação, 1 e 10 dias após a radiação. Para contagem dos leucócitos, foi realizada a coloração das células com líquido de Turk (Renylab) na diluição de 1:20 (v/v) e sua subsequente contagem em câmera de Neubauer. O resultado da contagem das células foi dado em número de leucócitos/mm³ de sangue (Spósito, 2008).

4.4 Infecção

Testes experimentais envolvendo diferentes vias de infecção em camundongos BALB/c foram realizados para determinação da via de infecção a ser realizada durante os demais procedimentos experimentais. Foram realizados três tipos de infecções distintas: infecção intratraqueal, na qual foi realizado

procedimento cirúrgico para exposição da traqueia e inoculação da preparação fúngica; infecção endovenosa pelo plexo orbital; e infecção endovenosa pela veia caudal, na qual os animais foram submetidos à luz branca, por alguns minutos, para dilatação dos vasos e em seguida inoculados através da veia caudal. Para realização da infecção intratraqueal e da infecção pelo plexo orbital os animais foram previamente anestesiados intramuscularmente com 40 µL de uma solução contendo 43% de xilazina (Dopaser) e 57% de quetamina (Dopalen) (Fernandes et al., 2011).

A preparação fúngica apresentava 3×10^5 células/animal de leveduras de *P. brasiliensis*, cepa Pb18, em PBS 0,15 M estéril, sendo utilizado 50 µL do inóculo em cada animal. A viabilidade fúngica foi calculada pela coloração com Verde Janus (Merck) e contagem em câmara de Neubauer, sendo utilizadas apenas preparações fúngicas com viabilidade superior a 90% (Morais et al., 2013). A infecção dos animais imunossuprimidos ocorreu 72h após a irradiação.

4.5 Eutanásia

Os animais imunossuprimidos foram eutanasiados em 7(T1) e os animais imunocompetentes foram eutanasiados em 7(T1), 15(T2), 30(T3) e 60(T4) dias após a infecção. Para a realização dos procedimentos, os animais foram previamente anestesiados intramuscularmente com 40 µL de uma solução contendo 43% de xilazina (Dopaser) e 57% de quetamina (Dopalen) (Morais et al., 2013). Após a aplicação da anestesia foi realizado o procedimento de deslocamento cervical para retirada dos órgãos: coração e pulmão. Esses órgãos foram divididos em quatro partes para a realização das demais análises.

4.6 Recuperação de fungos presentes no tecido cardíaco e pulmonar

Unidades formadoras de colônias (UFCs) presentes em fragmentos de corações e pulmões foram determinadas em T1, T2, T3 e T4 para os animais imunocompetentes, enquanto que as colônias presentes nos órgãos dos animais imunossuprimidos foram recuperadas apenas em T1. Cada fragmento do órgão foi semeado por plaqueamento em triplicata. Para tanto, os fragmentos foram pesados e homogeneizados em PBS 0,15 M. Desse volume, 10% da suspensão foi semeada

em meio de cultura ágar *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco) acrescido de 4% de soro fetal bovino e 5% de sobrenadante de cultura de Pb18. As placas foram incubadas a 37 °C e avaliadas após 20 dias de crescimento (Morais et al., 2013). Os resultados foram expressos como Log10 da média do número de UFCs por grama de tecido.

4.7 Análise histológica

Para análise histológica parte dos corações coletados dos animais imunocompetentes foram fixadas em solução tamponada de paraformaldeído 4%, emblocados em parafina, submetidos à microtomia (obtenção de fragmentos de 5 µm de espessura) e fixados em lâminas de microscopia. Os tecidos foram corados utilizando a técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), Grocott (Prophet et al., 1992) e Tricrômico de Masson. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica em campos sucessivos do menor para o maior aumento e posteriormente fotodocumentadas.

Lâminas também foram coradas pela técnica de imunofluorescência, com anticorpo anti-Pb27, proteína específica da parede celular de *P. brasiliensis*, obtida do soro de animais infectados. Primeiramente, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas. Em seguida foi realizado uma etapa de permeabilização em PBS 0,15 M e TritonX-100 0,1% por 5 minutos. Foi realizado o bloqueio com soro de cabra 5% (diluído em PBS/BSA 1%) por uma hora em temperatura ambiente. O anticorpo anti-Pb27 foi então adicionado em concentração de 1:200 (diluído em PBS/BSA 1%) à 4 °C e deixado *overnight*. No dia seguinte, o anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo (Alexa 555) foi adicionado a uma diluição de 1:500 e mantido por 1h à 4 °C na ausência de luz. Para finalizar, as lâminas foram montadas e analisadas por microscopia de fluorescência confocal e posteriormente fotodocumentadas. O microscópio utilizado foi o de fluorescência confocal de modelo 510 META da Zeiss no Centro de Aquisição de Imagens do ICB/UFMG.

4.8 Extração de DNA genômico e PCR

O DNA genômico de *P. brasiliensis* foi extraído a partir do tecido cardíaco de camundongos BALB/c imunocompetentes por meio de procedimento de maceração

mecânica e utilização do reagente DNAzol® (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. Para confirmar a presença fúngica foi realizada a *nested* PCR que consistiu de três reações de PCR sucessivas, e em cada reação foi utilizado um par de *primers* distinto e específico para amplificação do gene que codifica a proteína Pb40 de *P. brasiliensis* [Símbolo do gene: PADG_01298; Número de acesso no *GenBank*: NW_011371359.1 (319,496-323,005)]. As sequências dos *primers* e o tamanho esperado de cada *amplicon* são apresentadas no quadro 3.

Quadro 3. Sequências dos *primers* e tamanho dos *amplicons*

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'→3')	<i>Amplicon</i> (pb)
40.1 F	AGTCGCGTGTGCCACAAGACTT	301
40.1 R	GCCAGGTACTGCCATTCTCC	
40.2 F	GAGCCGGACAGGCTTACG	202
40.2 R	GAAGGCCGGAATTCCACGGC	
40.3 R	AATGGCCGCGCCATTGAGT	97
40.3 F	AAAGTGCGTGATCTCGAGATGC	

pb: pares de bases.

O experimento de *nested* PCR foi inicialmente estabelecido e padronizado pela estudante de pós-doutorado Lílian da Silva Santos (dados ainda não publicados). No presente trabalho, foram feitas algumas modificações a partir desses experimentos iniciais. A PCR1 consistiu em 1000 ng de DNA de tecido cardíaco (infectado ou não com *P. brasiliensis*); 1,5 mM de MgCl₂; tampão 5X *Green GoTaq® Flexi Buffer* (Promega); 0,2 mM de cada um dos quatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,2 μM de cada *primer* e 1 unidade de *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega), totalizando um volume final de 15 μL. A PCR2 e PCR3 foram preparadas com o mesmo *mix* de reação, substituindo-se apenas os *primers*, sendo utilizado 1 μL do produto de reação da primeira e segunda PCR, respectivamente. O produto da PCR2 foi diluído (1:10) antes de se proceder à terceira reação.

Os ciclos de amplificação para a PCR1 foram utilizadas uma etapa inicial de desnaturação à 95 °C por 5 minutos, 43 ciclos de desnaturação à 95 °C por 30 segundos, anelamento à 58 °C por 30 segundos e extensão à 72°C por 18 segundos, seguido por uma etapa final de extensão à 72 °C por 2 minutos. Para a

PCR2 as condições de reação foram: uma etapa inicial de desnaturação à 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 12 segundos, seguido por uma etapa final de extensão à 72 °C por 2 minutos. Para a PCR3, foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: uma etapa inicial de desnaturação à 95 °C por 5 minutos, 32 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 6 segundos, seguido por uma etapa final à 72 °C por 2 minutos. Em todas as reações foi feito um controle branco de amplificação (NTC), onde água estéril foi acrescentada no lugar de DNA, além de um controle positivo contendo DNA genômico de *P. brasiliensis*. Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em géis de agarose 1% (PCR1 e PCR2) e 2% (PCR3), corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

4.9 Extração de proteínas

Para extração de proteínas totais, os tecidos foram pesados e macerados em um tampão de lise contendo 10mM de Tris-HCl (TRIZMA), 150 mM de cloreto de sódio (NaCl), 1% de NP-40, 10% de Glicerol, 5 mM de EDTA e *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich). O volume do tampão utilizado para cada amostra representou 5 vezes o peso do tecido. Os lisados foram incubados durante 1 hora à 4 °C, mantidos sob sonicação por 7 minutos e centrifugados à 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a 20 °C até a utilização na detecção e quantificação das citocinas.

4.10 Quantificação de citocinas (ELISA de Citocinas)

A detecção de citocinas no tecido cardíaco de camundongos imunocompetentes foi realizada por meio da técnica de ELISA nos tempos T1, T2, T3 e T4. Foram avaliadas as citocinas IL-4, IL-10, IL-6, TNF- α , conforme protocolo do fabricante do kit DuoSet® ELISA Development System Mouse (R&D Systems). O ELISA utilizado foi do tipo indireto. As placas foram primeiramente sensibilizadas com anticorpo de captura específico e posteriormente foi adicionada a amostra de interesse (lisado de tecido cardíaco). Para detecção, foi utilizado um segundo anticorpo específico para a citocina analisada. As citocinas foram dosadas em leitor

de densidade ótica a 595 nm e os dados foram representados em picogramas/mL conforme o padrão do kit.

4.11 Análise estatística e Delineamento Experimental

O delineamento experimental adotado foi casualizado em parcela subdividida. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e pós- testes de Bonferroni. A figuras 5 é um resumo dos experimentos realizados.



Figura 5. Fluxograma dos experimentos realizados.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da via de infecção do coração pelo *P. brasiliensis*

Com o objetivo de determinar a via de infecção mais apropriada para a colonização do coração pelo *P. brasiliensis*, camundongos BALB/c foram infectados por vias distintas: via intratraqueal e via endovenosa pelo plexo orbital ou pela veia caudal. Após 30 dias da infecção, os camundongos foram eutanasiados e o *P. brasiliensis* foi recuperado do tecido cardíaco. Os resultados representados na figura 6 mostram que não houve diferença significativa na recuperação de UFCs, entre as vias investigadas.

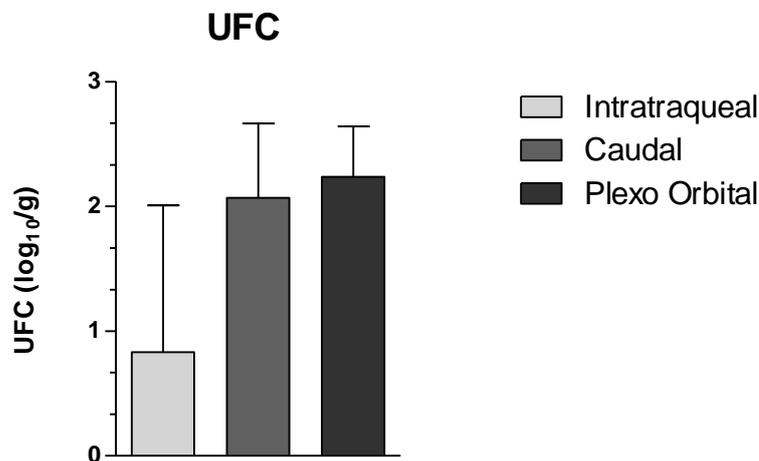


Figura 6. Unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas de tecido cardíaco de animais imunocompetentes após 30 dias de infecção. Colônias recuperadas de tecido cardíaco de camundongos BALB/c imunocompetentes após a infecção por *P. brasiliensis* pelas vias intratraqueal e endovenosa (plexo orbital ou caudal). Os histogramas representam a média \pm o desvio padrão de UFCs e os valores são expressos em log₁₀ (n=3). Teste 1way ANOVA e pós-teste Bonferroni.

É sabido que o *P. brasiliensis* é capaz de se disseminar por via hematogênica para qualquer órgão do corpo e após a análise dos resultados obtidos, o método de infecção selecionado para os demais experimentos foi a via endovenosa utilizando a veia caudal que é capaz de mimetizar o processo de disseminação da doença. Além disso, a inoculação pela veia caudal caracteriza-se por ser menos invasiva que as demais, já que não necessita de incisões ou anestésias. Portanto, os resultados dos próximos experimentos foram obtidos por infecção endovenosa utilizando a veia caudal.

5.2 Comparação da colonização do coração e pulmões na infecção pelo *P. brasiliensis*

Experimentos visando a comparação da infecção pelo *P. brasiliensis* entre o coração e pulmões foram realizados em camundongos imunocompetentes. O fungo foi recuperado dos tecidos 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção experimental. As UFCs estão representadas na figura 7 e confirmam a colonização dos pulmões e do tecido cardíaco nos diferentes tempos analisados após a infecção.

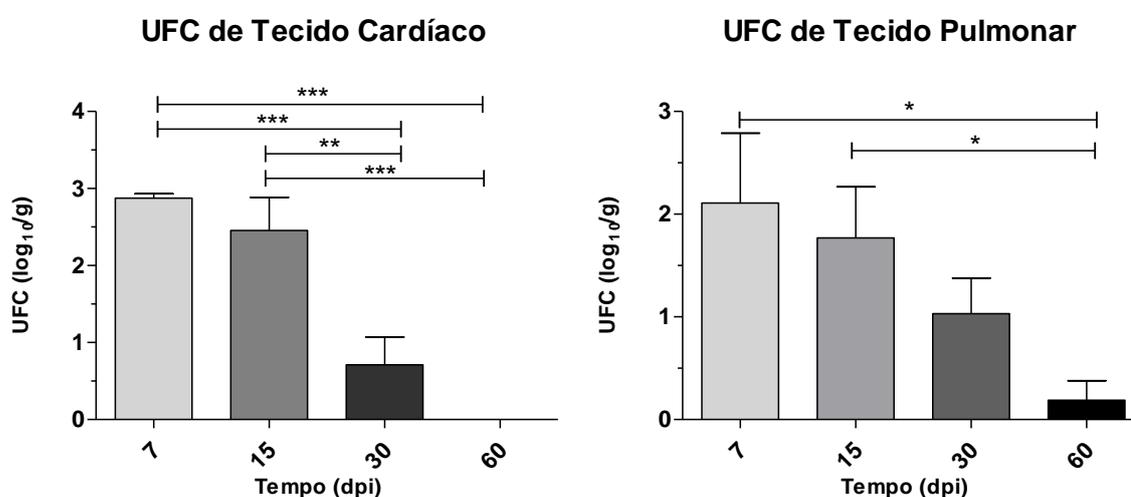


Figura 7. Unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas de tecido cardíaco e pulmonar de animais imunocompetentes após 7, 15, 30 e 60 dias de infecção. Colônias recuperadas em 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção pelo *P. brasiliensis*, via veia caudal. Os histogramas representam a média \pm o desvio padrão de UFCs e os valores são expressos em log₁₀ (n=9). * representa p <0,05 ou *** representa p <0,001. Teste 2way ANOVA e pós- teste Bonferroni.

Já se sabe que o pulmão é o foco primário da PCM e que está totalmente associado a inalação dos conídios que se instalam e colonizam o pulmão. Os resultados mostram que não houve diferença significativa do número de colônias recuperadas entres os diferentes tecidos analisados, sugerindo que o perfil de UFC encontrado no tecido cardíaco é equivalente ao perfil encontrado no tecido pulmonar, quando realizada uma infecção que mimetiza o processo de disseminação da doença. Ainda, observa-se que na fase inicial de infecção, 7 e 15 dias, tanto o tecido cardíaco quanto o tecido pulmonar apresentam valores de recuperação mais elevados e que diminuem ao longo do curso da infecção.

5.3 Análise histológica do tecido cardíaco

Para evidenciar as alterações histológicas no tecido cardíaco dos animais imunocompetentes infectados com *P. brasiliensis* foi realizada uma bateria de técnicas histológicas. O processamento histológico do coração dos animais imunocompetentes com 30 dias de infecção evidenciou a presença de células fúngicas através da coloração de Grocott (figura 8). A coloração de Grocott é uma técnica que utiliza metenamina-prata e demonstra os microrganismos por impregnação argêntica do corpo celular, permitindo forte destaque dos mesmos, facilitando o reconhecimento de formas em brotamento. A presença do fungo nos tecidos também foi evidenciada pelo ensaio de imunofluorescência, utilizando anticorpo para a proteína Pb27. A Pb27 está localizada na superfície do *P. brasiliensis* e vem sendo utilizada como um marcador específico desse fungo em ensaios de imunohistoquímica (figura 9).

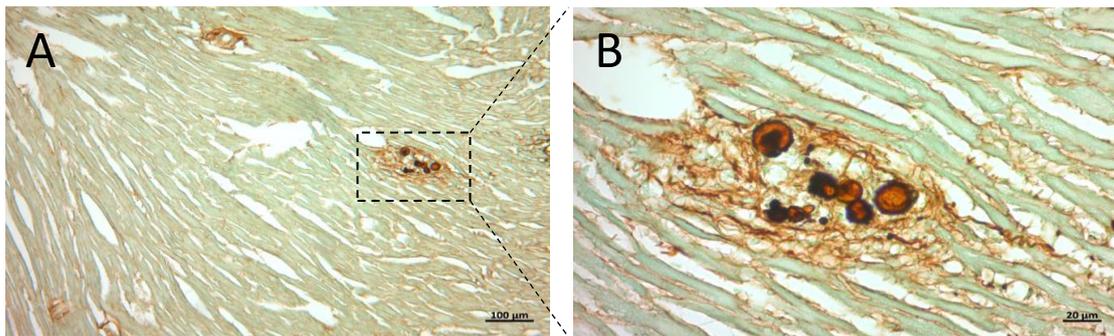


Figura 8. Histologia do tecido cardíaco de camundongos imunocompetentes corado pela técnica de Grocott 30 dias após infecção pelo *P. brasiliensis*. Células de coloração marrom e arredondadas evidenciando a presença de células fúngicas. Escalas: A: 100 µm; B: 20 µm.

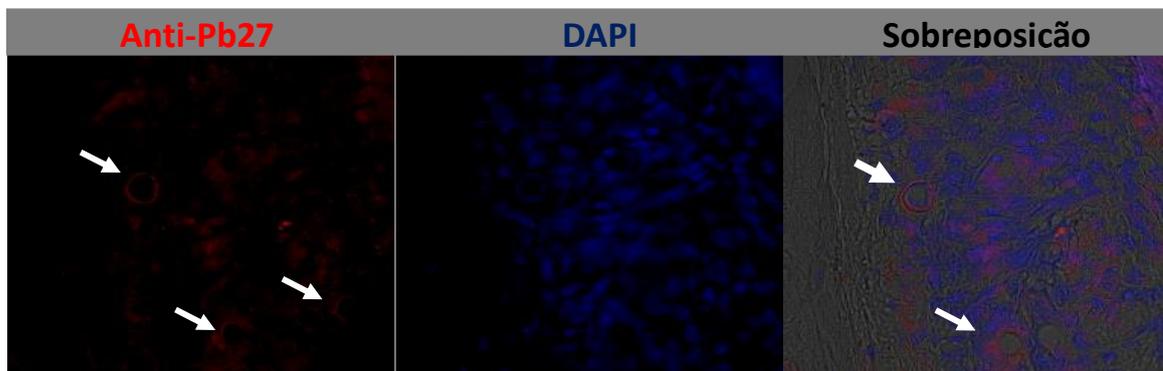


Figura 9. Fotomicrografia do tecido cardíaco de camundongo imunocompetentes em ensaio de imunofluorescência 30 dias após a infecção pelo *P. brasiliensis* utilizando anticorpo para a Pb27 e contra coloração por DAPI. A coloração vermelha evidencia a interação do anti-Pb27 à superfície do fungo. A marcação em azul evidencia os núcleos das células do infiltrado celular. As setas evidenciam as células de *P. brasiliensis*.

A coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) foi utilizada para avaliação do processo inflamatório e formação de granulomas, após 15, 30 e 60 dias de infecção. Há presença de granulomas multifocais constituídos por infiltrados inflamatórios intersticiais. Nesses processos inflamatórios foram detectadas estruturas celulares birrefringentes circulares, variando entre 6 e 20 μm de diâmetro, evidenciadas como células leveduriformes de *P. brasiliensis* (figura 10).

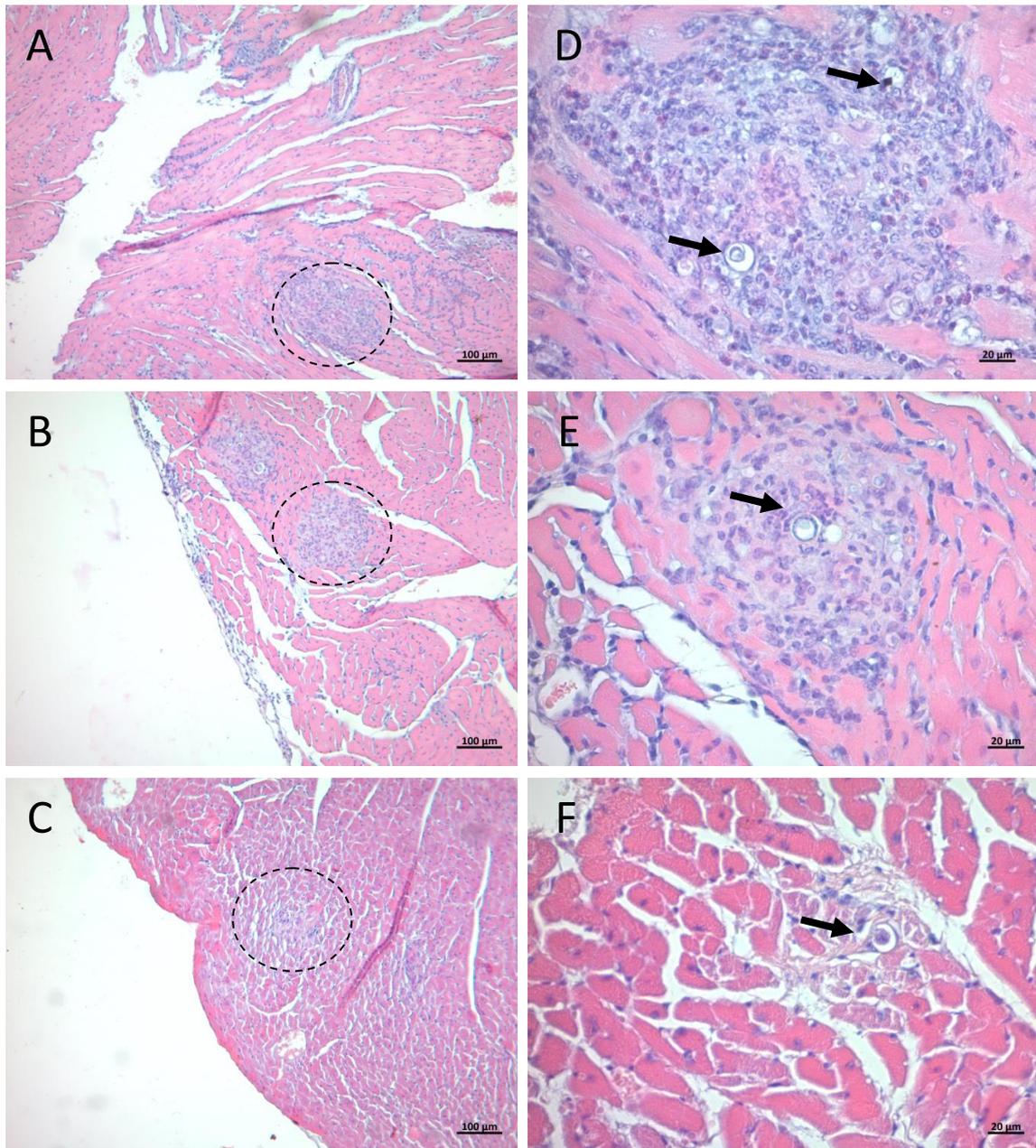


Figura 10. Fotomicrográfica do tecido cardíaco de camundongos imunocompetentes processada em 15, 30 e 60 dias após a infecção pelo *P. brasiliensis*. Coloração de HE. Fotomicrografia em menor aumento (A, B e C) escala: 100 μm . Em maior aumento (D, E e F) escala: 20 μm . Os círculos pontilhados indicam infiltrado inflamatório e as setas pretas indicam a localização das células fúngicas no tecido.

Além disso, cortes histológicos do tecido cardíaco dos animais infectados também foram corados pela técnica de Tricrômico de Masson. A análise histológica mostrou que após 15, 30 e 60 dias de infecção por *P. brasiliensis* reações granulomatosas e células fúngicas estão circundadas e entremeadas por tecido conjuntivo fibroso, além da presença de fibras colágenas (figura 11).

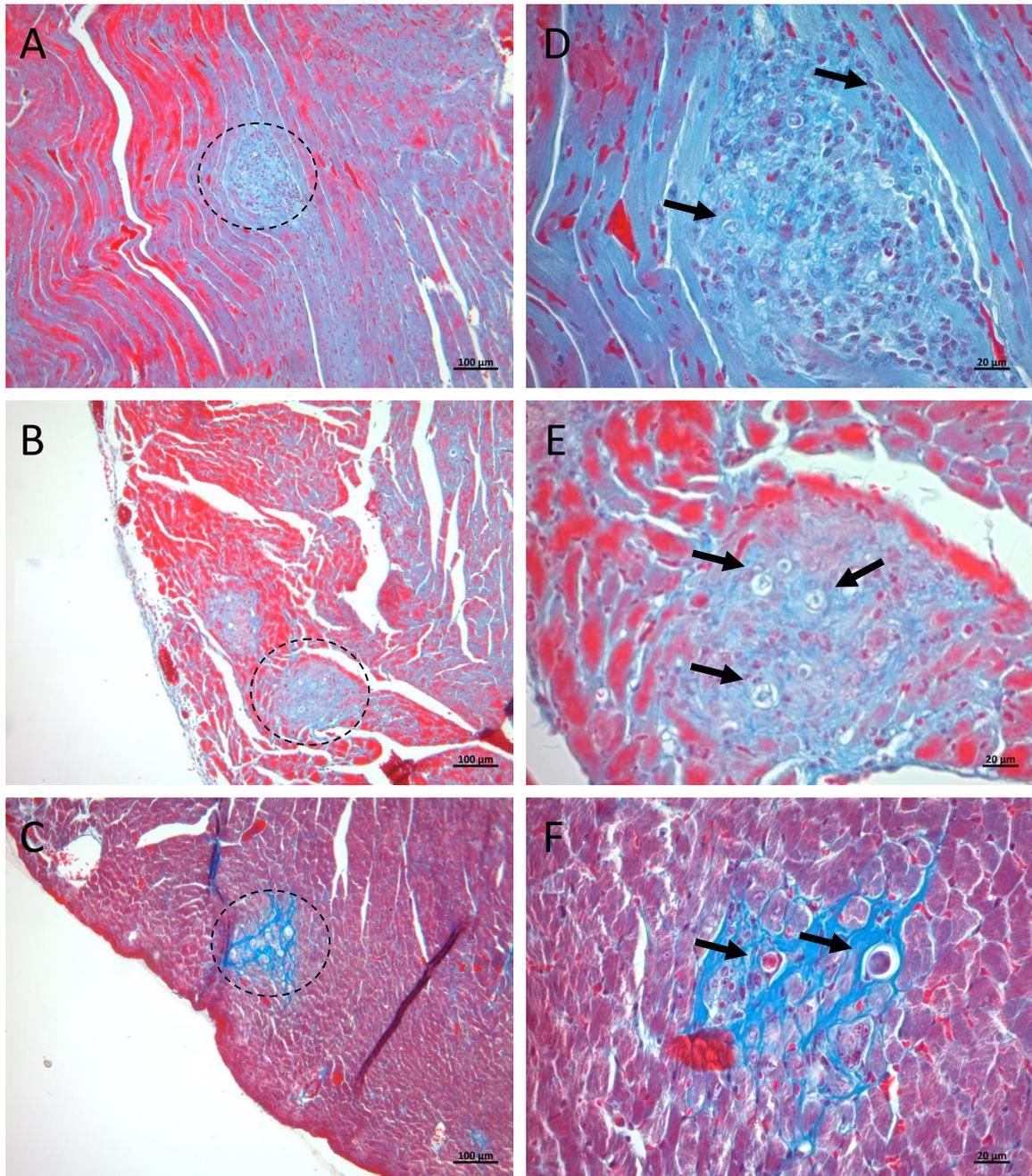


Figura 11. Fotomicrografia do tecido cardíaco de camundongos imunocompetentes processada em 15, 30 e 60 dias após a infecção pelo *P. brasiliensis*. Coloração por Tricrômico de Masson. Fotomicrografia em menor aumento (A, B e C) escala: 100 µm. Em maior aumento (D, E F) escala: 20 µm. Os círculos pontilhados indicam infiltrado de fibras colágenas (azul) e as setas pretas indicam a localização das células fúngicas no tecido.

5.4 Detecção de DNA genômico de *P. brasiliensis* em tecido cardíaco

As figuras 12 e 13 apresentam o resultado da *nested* PCR para uma amostra de tecido cardíaco infectado com *P. brasiliensis* e uma amostra de tecido cardíaco não infectado. Foi possível verificar a presença de uma banda única e do tamanho esperado correspondente à amplificação do gene alvo (PADG_01298) nas três reações de PCR para a amostra infectada, apresentando o mesmo perfil eletroforético dos produtos obtidos após amplificação do DNA genômico da cultura de *P. brasiliensis*. Tal fato não ocorreu para a amostra não infectada, comprovando que o tecido cardíaco é um local de alojamento do fungo e que a *nested* PCR foi capaz de discriminar entre amostras infectadas e não infectadas.

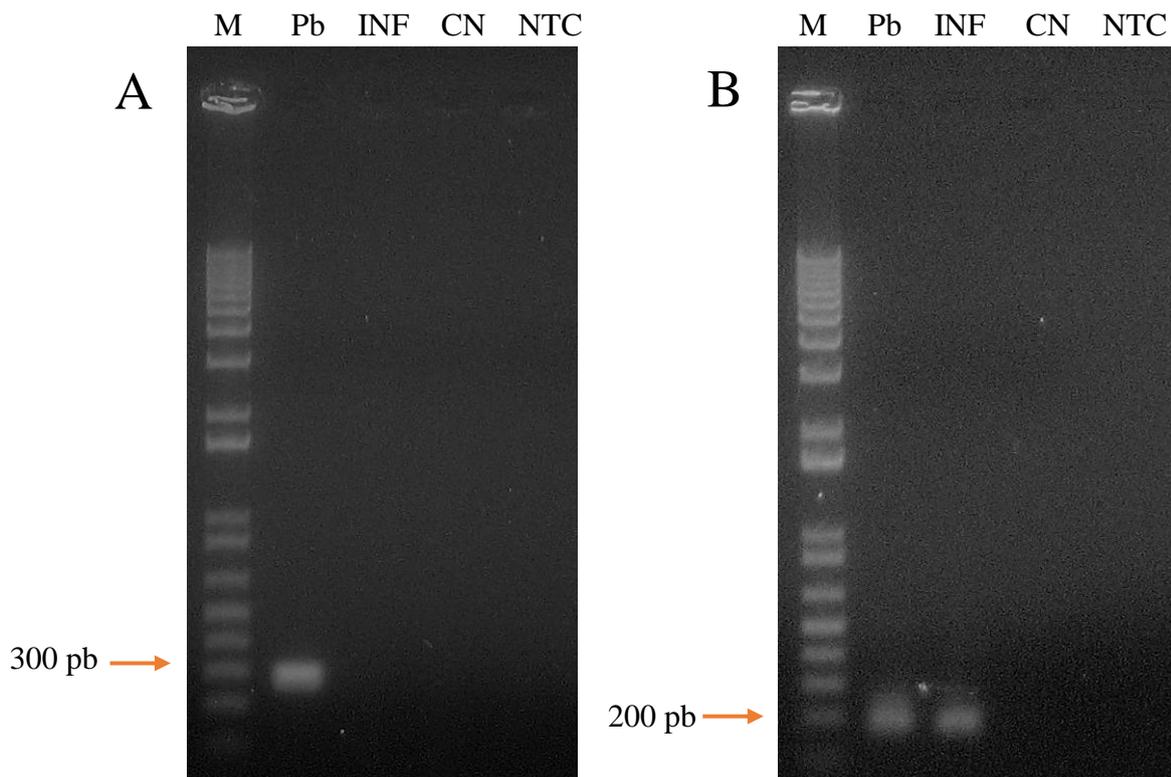


Figura 12. Análise eletroforética em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio dos amplicons produzidos pela PCR1 (A) e PCR2 (B). A ordem da numeração é: (M) marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Pb: amplicon produzido a partir do DNA genômico da cultura de *P. brasiliensis*; INF: tecido cardíaco infectado; CN: tecido cardíaco não infectado; NTC: branco da reação de PCR.

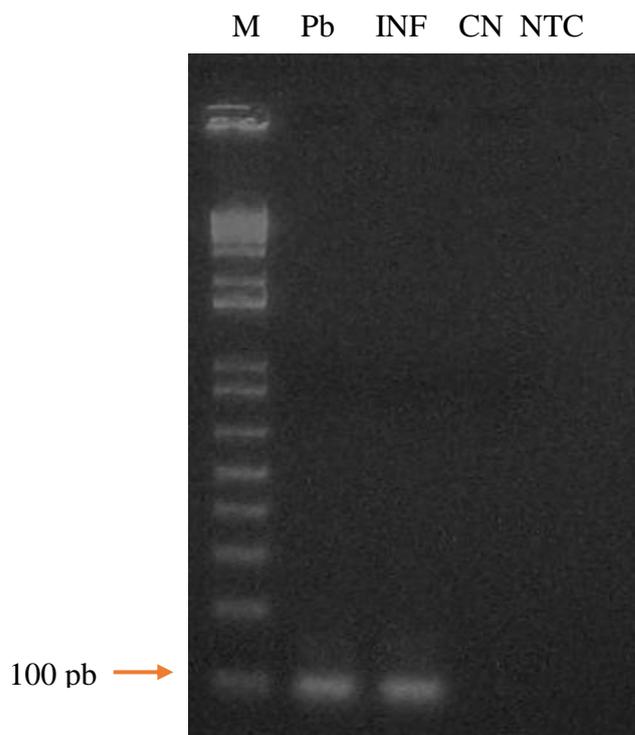


Figura 13. Análise eletroforética em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio dos amplicons produzidos pela PCR3. A ordem da numeração é: (M) marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Pb: amplicon produzido a partir do DNA genômico da cultura de *P. brasiliensis*; INF: tecido cardíaco infectado; CN: tecido cardíaco não infectado; NTC: branco da reação de PCR.

5.5 Detecção de citocinas nos tecidos cardíaco e pulmonar

O ensaio de ELISA foi realizado para detectar o nível de citocinas no tecido cardíaco e pulmonar dos camundongos BALB/c imunocompetentes e infectados com *P. brasiliensis* com 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção. O quadro 4 demonstra de maneira simplificada a expressão das citocinas quantificadas neste trabalho e as figuras 14 e 15 ilustram os níveis de cada citocina no tecido cardíaco e pulmonar.

Quadro 4. Nível de citocinas IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α no tecido.

Citocinas	Tecido Cardíaco					Tecido Pulmonar				
	CN	7dpi	15dpi	30dpi	60dpi	CN	7dpi	15dpi	30dpi	60dpi
IL-4	BASAL	↓	↔	↓	↓	BASAL	↓	↓	↓	↓
IL-6	BASAL	↔	↓	↓	↓	BASAL	↓	↓	↔	↓
IL-10	BASAL	↔	↑	↑	↓	BASAL	↔	↑	↑	↑
TNF- α	BASAL	↑	↑	↑	↓	BASAL	↔	↓	↔	↑

↓ níveis inferior ao basal; ↑ níveis superior ao basal; ↔ nível constante em relação ao nível basal.
dpi: dias após infecção.

A partir da análise dos dados no tecido cardíaco foi possível perceber que IL-4 apresentou níveis expressivamente menores que os basais com 7, 30 e 60 dias após infecção, entretanto os valores se mantiveram constantes 15 dias após a infecção. Em relação a IL-6, os valores se mantiveram constantes na fase inicial da infecção com 7 dias, mas diminuíram expressivamente com 15, 30 e 60 dias após a infecção. TNF- α apresentou valores significativamente maiores que os valores basais no início da infecção com 7, 15 e 30 dias após a infecção. Os níveis de IL-10 se tornaram expressivamente maiores nas fases intermediários da infecção (15 e 30 dias), mas houve um decaimento na fase mais tardia da infecção (60 dias).

Os níveis pulmonares de citocinas apresentaram um padrão similar aos níveis cardíacos, com pequenas variações. No caso de IL-4, os níveis se mantiveram baixo por todo o período da infecção. Os níveis de IL-10 foram expressivamente menores 15, 30 e 60 dias de infecção quando comparado ao basal, enquanto que o TNF- α apresentou valores expressivamente maiores que os basais nos mesmos tempos. Os ensaios com IL-6 revelaram um perfil similar já que apresentaram valores expressivamente menores com 7, 15 e 60 dias após a infecção.

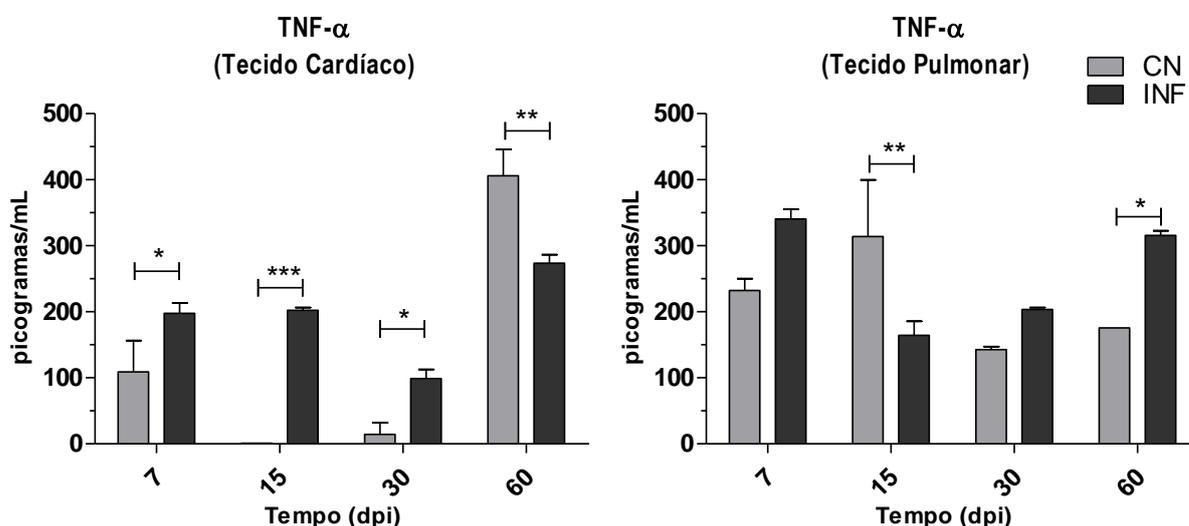


Figura 14. Níveis relativos de TNF- α no tecido cardíaco e pulmonar de camundongos BALB/c imunocompetentes e infectados com *P. brasiliensis*. Nível de IL-10 no tecido cardíaco e pulmonar após 7, 15, 30 e 60 dias de infecção. CN: não infectado; INF: infectado. * representa $p < 0,05$ ou *** representa $p < 0,001$. Teste 2way ANOVA e pós- teste Bonferroni.

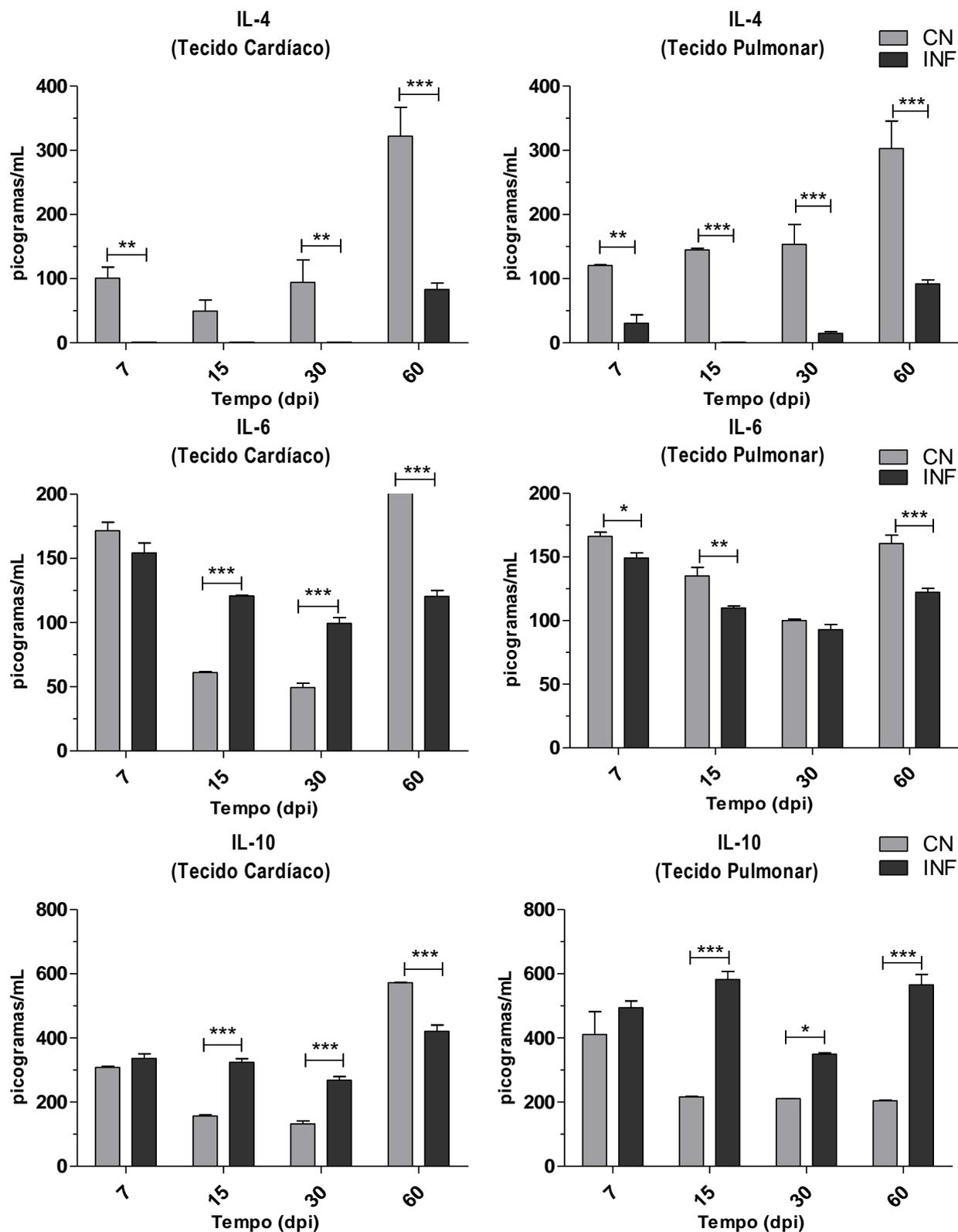


Figura 15. Níveis relativos de IL-4, IL-6 e TNF- α no tecido cardíaco e pulmonar de camundongos BALB/c imunocompetentes infectados com *P. brasiliensis*. Níveis de IL-4, IL-6 e TNF- α no tecido cardíaco (a esquerda) e pulmonar (a direita) após 7, 15, 30 e 60 dias de infecção. CN: não infectado; CP: infectado. * representa $p < 0,05$ ou *** representa $p < 0,001$. Teste 2way ANOVA e pós- teste Bonferroni.

5.6 Comparação da infecção por *P. brasiliensis* em camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos

A imunossupressão foi realizada por radiação gama e o sangue foi coletado após a irradiação para monitoramento do efeito supressor que foi mensurado por meio da contagem de leucócitos. A imunossupressão foi confirmada 24 após a irradiação e se manteve após 10 dias da irradiação. Após 48h da confirmação da imunossupressão os animais foram infectados. Os camundongos foram eutanasiados 7 dias após infecção para recuperação da unidades formadoras de colônias presente em fragmentos de tecido cardíaco e pulmonar. A figura 16 mostra a contagem de leucócitos presentes no sangue destes animais 10 dias após a irradiação e 7 dias após a infecção.

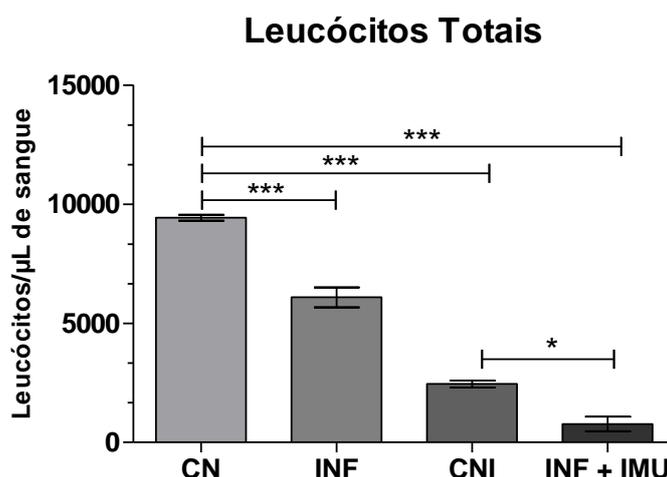


Figura 16. Número de leucócitos/μL de sangue em camundongos BALB/c. CN: não infectado; INF: infectado; CNI: controle da imunossupressão; INF + IMU: imunossuprimido e infectado. Os histogramas representam a média ± o desvio padrão de leucócitos 10 dias após a irradiação e 7 dias após a infecção (n=9). * representa $p < 0,05$ ou *** representa $p < 0,0001$. Teste 1way ANOVA e pós-teste Bonferroni.

Os resultados obtidos demonstram que, após 10 dias de imunossupressão, o número de leucócitos foi significativamente menor no grupo imunossuprimido em comparação ao grupo imunocompetente, confirmando a imunossupressão dos animais após 10 dias da irradiação. Ainda, é possível perceber uma diferença significativa de leucócitos totais entre os animais infectados e não infectados, revelando que há uma diminuição de células leucocitárias no sangue na fase inicial da infecção por *P. brasiliensis*.

Os animais imunossuprimidos foram eutanasiados após 7 dias de infecção, o coração e os pulmões foram retirados e utilizados para recuperação do fungo. A figura 17 representa as UFCs recuperadas dos tecidos dos animais infectados (INF) e dos animais imunossuprimidos e infectados (INF + IMU).

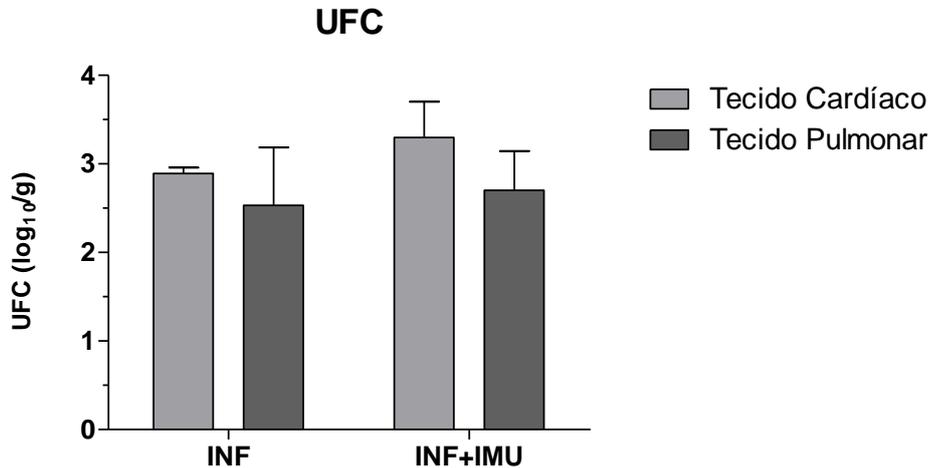


Figura 17. Unidades formadoras de colônia recuperadas de tecido cardíaco e pulmonar de camundongos BALB/c imunocompetentes e imunossuprimidos com 7 dias de infecção. Colônias recuperadas após infecção pelo *P. brasiliensis*, via veia caudal, e imunossuprimidos com radiação gama. INF: infectado; INF + IMU: infectado e imunossuprimido. Os histogramas representam a média \pm o desvio padrão de UFCs e os valores são expressos em log₁₀ (n=9). Teste 2way ANOVA e pós- teste Bonferroni.

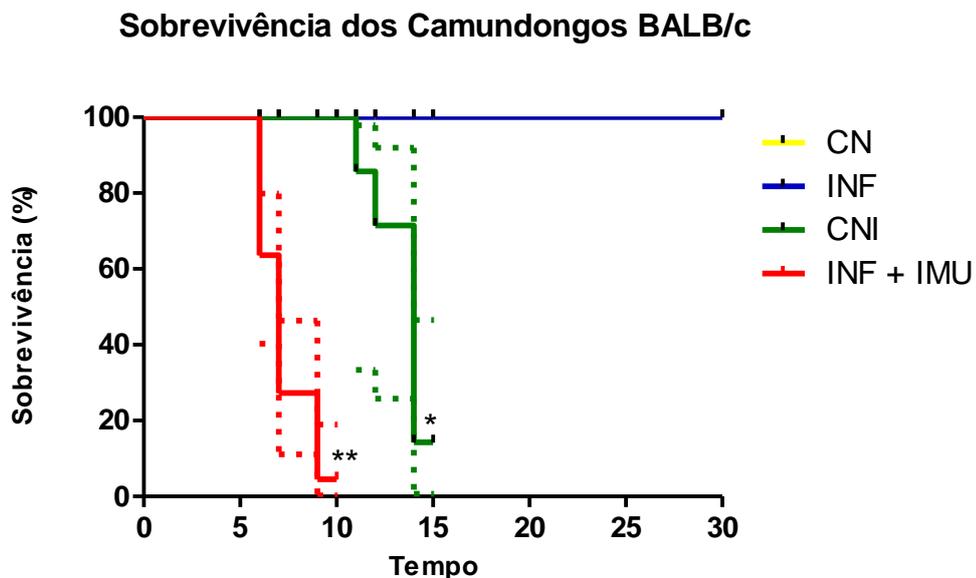


Figura 18. Taxa de sobrevivência dos camundongos após imunossupressão e infecção por *P. brasiliensis*. CN: não infectado; CNI: imunossuprimido e não infectado; INF: infectado; INF+ IMU: imunossuprimido e infectado. *** representa $p < 0, 0001$. Teste Log-rank (Mantel-Cox).

Os dados de UFC entre o grupo imunocompetente e imunossuprimido não revelam diferença significativa. Todavia, o experimento demonstrou que, com 10 dias de imunossupressão, houve uma menor taxa de sobrevivência dos camundongos infectados quando comparado ao grupo de animais imunossuprimidos não infectados e ao grupo de animais imunocompetentes, como demonstrado na figura 18.

6 DISCUSSÃO

A interação entre o patógeno e o hospedeiro define a patogenicidade da doença, pois o desequilíbrio no balanço entre resposta imunológica do hospedeiro e os mecanismos de virulência podem causar invasão, instalação e multiplicação do microrganismo, característicos do processo infeccioso (Bailão et al., 2008).

Estudos analisam fatores pertinentes ao fungo e que favorecem seu desenvolvimento e disseminação pelo organismo do paciente tornando-os causadores de doenças sistêmicas e permitindo o seu crescimento nas condições adversas do hospedeiro (Casadevall e Pirofski, 1999). *Paracoccidioides* spp. apresentam esses mecanismos que lhes permitem aderir e invadir barreiras impostas pelos tecidos hospedeiros e sintetizar várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasita-hospedeiro (Mendes-Giannini et al., 2000). A virulência de *Paracoccidioides* sp. envolve a expressão de múltiplos genes em diferentes etapas da infecção e que levam a colonização bem sucedida dos tecidos hospedeiros pelo fungo (Da Silva et al., 2013).

Por se tratar de uma doença sistêmica, *P. brasiliensis* pode acometer qualquer órgão, através da sua disseminação por via canicular, hematogênica ou linfática, causando lesões sintomáticas ou não. O acometimento do pulmão está associado ao processo de infecção que ocorre através da inalação de conídios, pelas vias superiores aéreas e sua posterior instalação nos alvéolos pulmonares (Góes et al., 2014). O processo envolvendo a pequena circulação ou circulação pulmonar e a grande circulação ou circulação sistêmica são responsáveis pela disseminação hematogênica do fungo pelos tecidos. Estes processos tornam o coração um ponto de encontro para todos os demais órgãos, fazendo um elo entre o pulmão, que se caracteriza como um foco primário da PCM, e os demais órgãos do corpo, que podem se tornar um foco secundário da doença.

O modelo de infecção utilizado, neste trabalho, por meio endovenoso via veia caudal mimetiza o processo de disseminação, uma vez que as células fúngicas são depositadas no sistema sanguíneo. A detecção de UFCs no tecido cardíaco em níveis similares ao encontrados no tecido pulmonar demonstra que o fungo tem a capacidade de infectar e colonizar o tecido cardíaco e este evento pode proporcionar alterações histológicas que, por sua vez, podem acarretar a perda de função. A

coloração por Grocott evidencia a presença fúngica no tecido cardíaco que, por meio da técnica de imunofluorescência e da *nested* PCR, confirmam que *P. brasiliensis* é o agente fúngico presente neste tecido.

A resposta do hospedeiro ao agente infectante desta doença leva a um processo inflamatório granulomatoso crônico, pois o processo inflamatório agudo nem sempre é completamente resolvido. Isto porque a resposta inflamatória envolvida no processo de infecção por *P. brasiliensis* leva a destruição de algumas células fúngicas. Entretanto, algumas células fúngicas podem permanecer no interior do granuloma e, assim, serem reativadas após a maceração do tecido (Moreira et al., 2008). No presente trabalho, foi possível observar que o perfil de UFCs encontrado no tecido cardíaco apresentou-se similar ao observado no tecido pulmonar, uma vez que na fase inicial há uma maior expressão de unidades formadoras de colônia do que em um momento mais tardio. Este fato também foi demonstrado por Morais e colaboradores (2013) onde houve um decaimento de aproximadamente 50% das unidades formadoras de colônia no tecido pulmonar após 90 dias de infecção mesmo sem a realização de terapias.

Nos tecidos, a reatividade do hospedeiro induz a reação inflamatória, que culmina na formação de granuloma na tentativa de bloquear e restringir o desenvolvimento do fungo, impedindo sua multiplicação e disseminação (Bertini et al., 2007). As análises histopatológicas após coloração com Hematoxilina e Eosina demonstram a presença de infiltrados inflamatórios característicos ao redor das células fúngicas nos tempos T2, T3 e T4. Apesar de não terem sido realizadas análises quantitativas da presença de granulomas, as análises qualitativas sugerem uma menor frequência de granulomas em T4 do que nos demais tempos, o que concorda com o observado em relação ao nível de UFCs.

Os granulomas ao se formarem podem danificar o hospedeiro, pois é em seus arredores que a fibrose se torna organizada. Este tipo de inflamação gera ativação permanente e acúmulo de macrófagos e células T nos sítios da lesão e as citocinas liberadas pelos macrófagos cronicamente ativados estimulam a proliferação de fibroblastos, levando ao aumento da produção de colágeno que se transforma em fibrose (Cock et al., 2000; Brummer et al., 1993). A coloração por Tricrômico de Masson demonstra a presença de fibras colágenas ao redor das células fúngicas

nos tempos T2, T3 e T4, que, por sua vez, podem levar à perda de função e causar uma sobrecarga cardíaca.

A insuficiência cardíaca congestiva, em geral, se desenvolve lentamente, devido à perda gradual da eficiência cardíaca, junto à sobrecarga de pressão ou de volume à lesão miocárdica. A insuficiência cardíaca é iniciada por cardiopatias diversas ou aumento de trabalho associado a doenças pulmonares, renais ou vasculares. Mais uma vez, os estudos das cardiopatias mostram intensa relação com o pulmão, que na PCM é o principal órgão acometido.

O perfil de citocinas que leva à proteção murina é amplo. Vários artigos mostram que a imunorregulação à resistência na PCM está associada a padrões de resposta imune regulada por células LTh1 e a susceptibilidade relacionada a respostas LTh2. Os LTh1, que produzem IL-2, TNF- α e INF- γ , favorecem a ativação de macrófagos. Os LTh2 liberam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 inibem a imunidade celular. A depressão da resposta LTh1 promove diminuição de linfócitos, da atividade de células *Natural Killer*, da produção de INF- γ , TNF- α e de IL-2 que, conseqüentemente, levam à depressão da resposta proliferativa de linfócitos, favorecendo o estabelecimento da PCM-doença (Bernanrd et al., 2008; Fernandes et al., 2011). Neste trabalho, foram determinados os níveis das citocinas IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α .

O TNF- α atua sobre a função macrófágica na PCM humana e experimental, modulando e amplificando a resposta imune, promovendo reação granulomatosa e atividade fungicida mediada por macrófagos. A ausência desta citocina resulta no comprometimento dos mecanismos de defesa associado à incapacidade de desenvolver reações granulomatosas eficientes para conter a multiplicação fúngica (Fortes et al., 2011). A elevada expressão de TNF- α na fase inicial da infecção do tecido cardíaco sugere uma reação granulomatosa mais exacerbada do que em uma fase mais tardia, corroborando com os achados histológicos deste trabalho.

De acordo com Elias e colaboradores (1990), células inflamatórias regulam a função dos fibroblastos através da produção de citocinas. Estudos demonstraram que TNF- α , e as interleucinas IL-4 e IL-6 contribuem para a formação de cicatriz tecidual levando à fibrose, enquanto INF- γ tem efeito de inibição de fibroblastos e supressão na produção de proteínas da matriz extracelular, tais como colágeno e fibronectina (Lukacs et. al., 2001; Elias et. al., 1990). Este trabalho revelou níveis

menores de IL-4 e IL-6, sugerindo que a fibrose observada nos achados histológicos tem origem em outras citocinas pró-inflamatórias.

A forma aguda da PCM é caracterizada pela secreção de IL-4, IL-5 e IL-10, e a diminuição dos níveis INF- γ e da proliferação de linfócitos que resulta na depressão da resposta celular e consequente manifestação grave da doença. Indivíduos saudáveis infectados apresentam proliferação de linfócitos, níveis elevados de INF- γ e TNF- α e baixos níveis de IL-10. A forma crônica mostra um padrão intermediário da resposta imune com produção mista dessas citocinas. A IL-10 é uma citocina regulatória, que tem função imunomoduladora (Pinzan et al., 2010; Ferreira et al., 2006; Oliveira et al., 2002). Neste trabalho, os níveis de IL-10 nos tempos T1, T2 e T3 são expressivamente maiores, sugerindo um balanço na resposta imunológica uma vez que nestes mesmos tempos a aumento no nível de TNF- α

Os estudos realizados envolvendo animais imunossuprimidos com radiação gama revelaram que a imunossupressão dos animais antes da infecção não contribuiu para o aumento da expressão de unidades formadoras de colônias, entretanto estes animais apresentaram uma menor taxa de sobrevivência corroborando com os dados da literatura em que a taxa de letalidade da doença situa-se entre 2 e 23%, atingindo 30% se associada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Coutinho et al., 2002; Marques, 2003; Góes et al., 2014). Estudos mais aprofundados necessitam ser realizadas para comparar a imunossupressão e suas relações com o agravamento da condição cardíaca de camundongos infectados por *P. brasiliensis*. Avaliar também a imunossupressão após a infecção poderia permitir a obtenção de dados mais coerentes com os observados na literatura, onde se destacam as altas taxas de recidiva quando da imunossupressão de um paciente infectado previamente por *P. brasiliensis*.

7 CONCLUSÃO

A PCM, apesar de não estar na lista de doenças negligenciadas, apresenta-se como tal, pois recebe pouca atenção clínica e científica. Estes fatos por sua vez geram defasagem de informação, e isto prejudica no conhecimento clínico no que se refere à doença. Apesar de ser caracterizada como uma doença sistêmica, pouco se tem descrito sobre todos os órgãos que podem estar relacionados ao agravamento clínico do paciente infectado. Sabe-se que o pulmão é o principal órgão acometido e que por isso recebe muita atenção nas pesquisas, mas que pouco se tem estudado sobre o processo de disseminação a partir do mesmo. A disseminação da doença é um fator extremamente importante porque está intimamente relacionada com o seu controle, pois investigar com mais frequência os locais onde o fungo se aloja poderia permitir um tratamento mais adequado para evitar futuras recidivas. Correlacionando este processo à via de disseminação, sabe-se que o sistema cardiovascular apresenta grande probabilidade de infecção e que este está intimamente relacionado aos demais órgãos do corpo. Como foi possível observar, estudos relacionados com o acometimento do coração foram descritos em trabalhos bem antigos. Estes achados, apesar de permanecerem na literatura, atualmente recebem pouca atenção e provavelmente por isso o acometimento do coração é considerado ser de ocorrência rara na PCM. Os resultados obtidos neste trabalho revelam que o tecido cardíaco apresenta um perfil de infecção similar aos observados na literatura no tecido pulmonar, uma vez que o fungo tem a capacidade de disseminar pela via hematogênica até o tecido cardíaco, colonizar e gerar respostas inflamatórias características da doença, tais como a formação de granulomas ricos em fibras colágenas, que podem comprometer a função cardíaca e agravar o quadro clínico do paciente. Sendo assim, a caracterização da infecção do tecido cardíaco por *P. brasiliensis* pode direcionar melhor o diagnóstico de problemas cardíacos associado à PCM e indicar medidas terapêuticas mais adequadas para o controle e tratamento da doença.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSIO, A. V. A.; CAMELO, C. C. S.; BARBOSA, C. V. B.; TOMAZATTI, F. G.; BRAZÕES, F. A. S.; VELOSO, J. M. V.; RODRIGUES, G. V.; RODRIGUES, L. F. R.; OLIVEIRA, P. I. D.; AGUIAR, R. A. A.; SIQUEIRA, V. S. S.; JARDIM, V. B.; GONTIJO, V. A. C.; MOURA, A. C. L.; PAULA, I.; SANTOS, L. S. S.; SULMONETTI, N.; FREITAS, R. M.; CRUZ, S. G.; ARAUJO, S. A.; PEDROSO, V. S. P.; SIQUEIRA, W. C.; ROCHA-SILVA, F.; CALIGIORNE, R. B.; GÓES, A. M.; FERREIRA, C. S. F.; PEDROSO, E. R. P. Paracoccidiodomicose (doença de Lutz-Splendore-Almeida): propedêutica complementar, diagnóstico diferencial, controle de cura. **Revista Médica Minas Gerais**, v. 24(1), p. 81-92, 2014.

AMBROSIO, A. V. A.; CAMELO, C. C. S.; BARBOSA, C. V. B.; BRAZÕES, F. A. S.; VELOSO, J. M. V.; RODRIGUES, L. F. R.; AGUIAR, R. A. A.; SIQUEIRA, V. S. S.; JARDIM, V. B.; GONTIJO, V. A. C.; MOURA, A. C. L.; PAULA, I.; SANTOS, L. S. S.; CRUZ, S. G.; SIQUEIRA, W. C.; ROCHA-SILVA, F.; CALIGIORNE, R. B.; GÓES, A. M.; FERREIRA, C. S. F.; PEDROSO, E. R. P. Paracoccidiodomicose (doença de Lutz-SPLENDORE-almeida): tratamento, duração do tratamento, recidiva, reação paradoxal, prognóstico, profilaxia. **Revista Medica Minas Gerais**, v. 24(1), p. 74-80, 2014b.

AMEEN, M.; TALHARI, C.; TALHARI, S. Advances in paracoccidiodomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 35, p. 576-80, 2010.

ARAÚJO, S. de A. **Contribuição ao estudo anátomo-clínico da paracoccidiodomicose em Minas Gerais. Meio século de experiência - avaliação das necrópsias realizadas no período compreendido entre 1944 até 1999, no departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.** Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

ARRUDA, P. F. F. de; GATTI, M.; ARRUDA, J. G. F. de; AYRES, D. C.; NAVARES, E. M.; ARRUDA, L. F. de; GODOY, M. F. Prostatic paracoccidiodomycosis with a fatal outcome: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 7, p. 126, 2013.

BAILÃO, A. M. **Análises Transcricionais no estudo da expressão gênica de *Paracoccidioides brasiliensis* em condições que mimetizam nichos do hospedeiro.** Tese de Doutorado da Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

BALESTRINI, J. L.; ANDNIKLASON, L. E. Extracellular matrix as a driver for lung regeneration. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 43, p. 568–576, 2015.

BASTOS, K. P.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; FARIA, F. P.; FELIPE, M. S. S.; SILVA, M. G.; MARTINS, W. S.; FIÚZA, R. B.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. A. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC Microbiology**. v.7, p. 29, 2007.

BENAIM-PINTO H. La *Paracoccidioidosis brasiliensis* como enfermedad sistêmica. Comentarios a la casuística venezolana. **Mycopathologia**, v. 15, p. 90-114, 1961.

BENARD G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathology**. v. 165, p. 209-21, 2008.

BERTINI, S.; COLOMBO, A. L., TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H. Expression of antibodies directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of paracoccidioidomycosis treatment. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, p. 150-6, 2007.

BIALEK, R., IBRICEVIC, A., FOTHERGIL, A. & BEGEROW, D. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3190-3193, 2000.

BLOTTA, M. H.; MAMONI, R. L.; OLIVEIRA, S. J.; NOUER, S. A.; PAPAORDANOU, P. M.; GOVEIRA, A.; CAMARGO, Z. P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 390-4, 1999.

BOCCA, A. L.; AMARAL, A.C.; TEIXEIRA, M.M.; SATO, P.K.; SHIKANAI-YASUDA, M. A; SOARES FELIPE, M.S. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiology**, v. 8(9), p. 1177–1191, 2013.

BONFIM, C. V., MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 47, p. 722-33, 2009.

BORGES-WALMSLEY, M. I. CHEN, D. SHU, X. & WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiology**, v. 10(2), p. 80-87, 2002.

BOULOS, M. I. C.; SHIROMA, M.; DUARTE, M. I. S.; SILVEIRA, M. I. & AMATO NETO, V. **Endocardite paracoccidioidomicótica**. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical XVI, Natal (RN), 1980.

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.

BRASIL. M. da S. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso – 5º edição. Brasília: **Ministério da Saúde**, p. 233-235, 2005.

BRASS, K. Observations on the pathologic anatomy, pathogenesis, and evolution of paracoccidioidomycosis. **Mycopathology Mycology Applications**, 37, p. 119-38, 1969.

BRITO, T; FRANCO, M. F. Granulomatous inflammation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, p. 185-92, 1994.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E. & RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6(2), p. 89–117, 1993.

BURGHARDT, C. **ECG interpretation made incredibly easy**. 5ªed. Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

CALICH, V. L.; VAZ, C. A.; BURGER, E. Burger. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Research in Immunology**, v. 149, p. 407-17; discussion 499-500, 2008.

CAMARGO, Z. P. d. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, p. 289-302, 2008.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 17, p. 41-8, 2000.

CAMPOS, E.P.; PADOVANI, C. R.; CATANEO, A. M. et al. Paracoccidioidomycose: estudo radiológico e pulmonar de 58 casos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, p. 267-276, 1991.

CASADEVALL, A., AND PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 3703– 3713, 1996.

CHAGNOT, C.; LISTRAT, A.; ASTRUC, T.; DESVAUX, M. Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. **Cellular Microbiology**. v. 14, p1687–1696, 2012.

CORREA, M. M.; BEDOYA, A. M.; GUERRERO, M. P.; MÉNDEZ J.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. **Mycoses**, v. 50, p. 41-47, 2007.

CARRERO, L. L.; NINO-VEGA, G.; TEIXEIRA, M. M.; CARVALHO, M. J.; SOARES, C. M.; PEREIRA, M.; JESUINO, R. S.; MCEWEN, J. G.; MENDOZA, L. TAYLOR, J. W.; FELIPE, M. S.; & SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45(5), 605-6, 2008.

COCK, A. M.; CANO, L. E.; VELEZ, D.; ARISTIZABAL, B. H.; TRUJILLO, J.; RESTREPO, A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. **Revista Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 42, p. 59-66, 2000.

COITINHO, J. B. **Cristalização, estrutura e atividade de duas proteínas com apelo biotecnológico: Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis* e salicilaldeído desidrogenase (NahF) de *Pseudomonas putida***. Tese de Doutorado da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

COLOMBO AL, Q.-T. F. Paracoccidioidomycosis. **In: Atlas of Fungal Infections**. Philadelphia: Springer, 2007.

COSTA, M. A. B.; CARVALHO, T. N.; ARAUJO JUNIOR, C. R.; BORBA, A. O. C.; VELOSO, G. A.; TEIXEIRA, K. S. Manifestações Extrapulmonares da Paracoccidioidomicose. **Radiologia Brasileira**, v. 38(1), p. 45-52, 2005.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M. PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.

DA SILVA, J. E. F., DE OLIVEIRA, H. C., MARCOS, C. M., DA SILVA, R. A., DA COSTA, T. A., CALICH, V. L., et al. *Paracoccidioides brasiliensis* 30 kDa adhesin: identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. **PLoS ONE**, v. 8, e62533, 2013.

DUNSMORE, S. E.; RANNELS, D. E. Extracellular matrix biology in the lung. **American Journal of Physiology**, v. 270, p3–27, 1996.

DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. da S.; FIORILLO, A. M. In: **Paracoccidioidomicose: Blastomicose sul-americana**. São Paulo, Sarvier-EDUSP, p. 229-244, 1982.

DEL NEGRO. **Localização supra-renal da blastomicose sul-americana**. Tese de livre-docência. 1961.

DÍEZ, S.; GARCIA, E. A.; PINO, P.A.; BOTERO, S.; CORREDOR, G. G.; PERALTA, L.A.; CASTAÑO, J.H.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, p. 351-358, 1999.

DILLON, N.L. **Tratamento da paracoccidioidomicose pela Anfotericina B. Avaliação de 119 doentes num período de 14 anos**. Tese de doutoramento. São Paulo, 1972.

EDWARDS, M.R.; SALAZAR, M.E.; SAMSONOFF, W.A.; CANO, L.E.; OSTRANDER, G.A.; & RESTREPO, A. Electron microscopy study of conidia produced by the mycelium of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 114, p. 169-177, 1991.

EISELE, R. C.; JULIANI, L. C.; BELITARDO, D. R.; ITANO, E. N.; ESTEVÃO, D.; BRACARENSE, A. P. F. L.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Immune response in dogs experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical MycologyOxford**, v.42, p.549-53, 2004.

ELIAS, J. A.; FREUNDLICH, B; KERN, J. A.; ROSENBLORN, J. Cytokine Networks in the Regulation of Inflammation and Fibrosis in the Lung. **American College of Chest Physicians publications**, 1990.

ENDO, S.; KOMORI, T.; RICCI, G. SANO, A.; YOKOYAMA, K.; OHORI, A.; KAMEI, K.; FRANCO, M.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. **FEMS Microbiology letters**, Amsterdam, v. 234, n.1, p. 93-97, 2004.

FAGUNDES-PEREYRA, W. J.; CARVALHO, G. T. C.; GÓES, A. M.; LIMA E SILVA, F. C.; SOUSA, A. A. Paracoccidioidomicose do sistema nervoso central: análise de 13 casos. **Arquivo de Neuro-Psiquiatria**, v. 64, p. 269-276, 2006.

FELIPE, M. S. S.; ANDRADE, R. V.; ARRAES, F.B.; NICOLA, A.M.; MARANHÃO, A. Q.; TORRES, F. A.; SILVA-PEREIRA, I.; POÇAS-FONSECA, M. J.; CAMPOS, E. G.; MORAES, L. M.; ANDRADE, P. A.; TAVARES, A. H.; SILVA, S. S.; KYAW, C. M.; SOUZA, D.P.; PEREIRA, M.; JESUÍNO, R. S.; ANDRADE, E. V.; PARENTE, J. Á.; OLIVEIRA, G. S.; BARBOSA, M. S.; MARTINS, N. F.; FACHIN, A.L.; CARDOSO, R. S.; PASSOS, G. A.; ALMEIDA, N. F.; WALTER, M. E.; SOARES, C. M. A.; CARVALHO, M. J.; BRÍGIDO, M.M. Pangenome Network. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 24706-24714, 2005.

FERNANDES, V. C. COITINHO, J. B. VELOSO, J. M. ARAUJO, S. A. PEDROSO, E. P. & GOES, A. M. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Immunological Methods**, 2011a.

FERNANDES, V. C. MARTINS, E. M. BOELONI, J. N. COITINHO, J. B. SERAKIDES, R. & GOES, A. M. Additive Effect of rPb27 Immunization and Chemotherapy in Experimental Paracoccidioidomycosis. **PLoS One**, v. 6(3), e17885, 2011b.

FERNANDES, V. C. MARTINS, E. M. BOELONI, J. N. COITINHO, J. B. SERAKIDES, R. & GOES, A. M. (2011c). The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 1062-1072, 2011c.

FERREIRA, S. F., ALMEIDA, S. R. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cell induce an increase of pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Immunology letters**, v. 103, p. 121-126, 2006.

FERREIRA, M. S. FREITAS, L. H. LACAZ CDA, S. DEL NEGRO, G. M. DE MELO, N. T. GARCIA, N. M. DE ASSIS, C. M. SALEBIAN, A. & HEINS-VACCARI, E. M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 28(3), p. 253-256, 1990.

FORTES, M. R.; MIOT, H. A.; KUROKAWA, C. S.; MARQUES, M. E.; MARQUES S. A. Immunology of paracoccidioidomycosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 516-24, 2011.

FRANÇA, D. C. C.; SANTOS, A. P. S. S.; REIS, G. S. da S.; MONTEIRO, A. D.; SILVA, A. S.; ABURAD, A. T. T. Paracoccidioidomicose: Relato de Caso. **Revista Inpeo de Odontologia**, Cuiabá, MT, v.2(2), p. 1-56, 2008

FRANCO, M., PERACOLI, M. T., SOARES, A., MONTENEGRO, R., MENDES, R. P. AND MEIRA, D. A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Current Medical Mycology**, v. 5, p. 115-149, 1993.

FRANCO, L., NAJVAR, L; GOMEZ, B. L.; RESTREPO, S.; GRAYBILL, J. R.; RESTREPO, A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, p. 424-3, 1998.

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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, p. 129, 1987.

GARCIA BLANCO, S., MUNOZ, J.F., TORRES, I., DIEZ POSADA, S., GOMEZ, B.L., MCEWEN, J.G., RESTREPO, S. AND GARCIA, A.M. Differential PbP27 expression in the yeast and mycelial forms of the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p.1087-1095, 2011.

GREER, D. L.; RESTREPO, A.; La epidemiologia de la Paracoccidioidomicoses. **Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 83, p. 428-445, 1977.

GÓES, A. M. de; SILVA, L. da S. S.; ARAÚJO, S. de A.; CRUZ, S. G. da; SIQUEIRA, W. C.; PEDROSO, E. R. P. Paracoccidioidomicose (doença de Lutz-Splendore-Almeida): etiologia, epidemiologia e patogênese. **Revista Medica de Minas Gerais**, v. 24(1), p. 61-66, 2014.

GOMES, G. M.; CISALPINO, P. S.; TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z.P. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3478–3480, 2000.

GONZALES, A.; GREGORI, W. de; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 2546-52, 2000.

HAMDAN, J. S.; ROCHA, R. I. Epidemiologia da Paracoccidioidomicose. **Faculdade de Medicina da UFMG**. v. 36, p. 52-61, 1987.

HOGAN, L. H., KLEIN, B. S. & LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 469-488, 1996.

IGAMI, T. Z.; SOLANO, F.; PRETI, R. C.; PAGLIARI, C.; TAKAHASHI, W. Y.; HIDA, R. Y. Retinal involvement of Paracoccidioidomycosis: A Case Report. **Tropical Medicine and Health**, v. 40(4), p. 149-153, 2012.

KANETSUNA, F. CARBONELL, L. M. AZUMA, I. & YAMAMURA, Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 110(1), p. 208-218, 1972.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M.; MORENO, R. E.; RODRIGUEZ, J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 97, p. 1036-1041, 1969.

LACAZ, C.S. *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, p. 11-21, 1982.

LACAZ, C.S. Paracoccidioidomicose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. **Micologia Médica**, 8ª ed., São Paulo, Sarvier, Cap 13, p. 248-297, 1991.

LACAZ, C. S. Paracoccidioidomicose. In: Lacaz CS; Porto E; Martins JEC; Heins-Vaccari EM; Melo NT. **Micologia Médica**, 27ª ed., São Paulo, Sarvier, Cap 13, p. 639-714, 2002.

LONDERO, A. T. Epidemiologia. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; FIORILLO, A. M. **Paracoccidioidomicose**. São Paulo: Sarvier – EDUSP, 1982. cap. 7, p. 85-90.

LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M. ARAUJO, E. F.; LEITE KR, CALICH, V. L. G. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 1078–1088, 2010.

LUKACS, N. W.; HOGABOAM, C; CHENSUE, S. W.; BLEASE, K; KUNKEL, S. L. Type 1/Type 2 Cytokine Paradigm and the Progression of Pulmonary Fibrosis. **American College of Chest Physicians publications**, 2001.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brazil. contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. **Brasil Medico**, v. 22, p. 121–124, 1908.

MACHADO-FILHO, J.; LISBOA, R. M.; MATOS, A.D.; JANUZZI, A.; MIRANDA, J. L. Considerações relativas à blastomicose sul-americana. Da participação laringéa e brônquica em 104 casos – **Resultados endoscópicos**. Hospital Rio de Janeiro, v. 58, p. 645-58, 1960.

MARTINEZ, R.; FERREIRA, M. S; FILHO, F. Q. T.; MENDES, R. P; BORGES, A. S.; NEGRO, G. B. D. Paracoccidioidomicose (Blastomicose Sul-Americana). In: Veronesi R, Focaccia R, editores. **Tratado de infectologia**. 3 ed., 2 v. São Paulo: Atheneu; p. 1371-401, 2005.

MARTINEZ, J. E; ATRA, E.; CUNHA, M. F. L.; PEREIRA, C. A. P.; SATO, E. I. Blastomicose sul-americana com vasculite: relato de caso. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 25, p. 211-3, 1985.

MARQUES, S. A.; CORTEZ, D. B.; LASTÓRIA, J. C.; CAMARGO, R. M. P.; MARQUES, M. E. A. Paracoccidioidomicose: frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 4, p. 411-417, 2007.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 2, p. 135-148, 2003

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 73, n. 5, p. 455-469, 1998

MATOS GROSSO, D.; ALMEIDA, S. R.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in Paracoccidioides brasiliensis pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6534-6542, 2003.

MATUTE, D. R.; MCEWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NINO-VEGA, G.; & TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23(1), p. 65-73, 2006.

MATTAR-FILHO, R.; AZEVEDO, M. O.; PEREIRA, M.; JESUINO, R. S.; SALEM-IZACC, S. M.; BRITO, W. A.; GESZTESI, J. L.; SOARES, R. B.; FELIPE, M. S.; SOARES, C. M. Expression of glycoprotein gp43 in stage-specific forms and during dimorphic differentiation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 35(5), p. 341-5, 1997.

MCEWEN, J. G.; ORTIZ, B. L.; GARCIA, A. M.; FLOREZ, A. M.; BOTERO, S. & RESTREPO, A. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kda antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 20, p. 125–131, 1996.

MCEWEN, J. G., BEDOYA, V., PATINO, M. M., SALAZAR, M. E. & RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, p. 165-75, 1987.

MENDES, R. P. Antifungal drugs and therapeutic schedules – Is a consensus possible? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, suppl. 14, p. 8, 2005.

MENEZES, V. M.; SOARES, B. G.; FONTES, C. J. Drugs for treating paracoccidioidomycosis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**. v.1, p.4967, 2006.

MENDES, V. L. N.; CORDEIRO, S. L.; FILHO, A. A.; CAMPOS, E. P.; FRANCO, M. F. Poliarterite nodosa com insuficiência renal crônica em paciente com paracoccidioidomicose. **Revista do Hospital das Clínicas**, v.35, p.35-, 1980.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MELHEM, M. S. C. Infecções fúngicas. In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 33, p. 334-403, 2001.

MILAZZO, L. A.; DUARTE, C. M.; AFONSO, C. C.; ALBUQUER, J. W.; SILVA, S. T. D.; FLORES, A. P. & BARBOSA, E. T. Blastomicose sul-americana ou doença de Lutz. Comprometimento cardíaco. **Arquivos brasileiros de Cardiologia**, v, 22 (supl. 1), p. 70, 1970.

MORAIS, E. A.; MARTINS, E. M. do N.; FERNANDES, Viviane C.; SANTOS, Í. G. D. dos; SILVA, G. A. B.; GOMES, D. A.; and GÓES, A. M. de. Immunization with rPb27 Protects Mice from the Disruption of VEGF Signaling in *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **Journal of Life Sciences**, v. 7, No. 9, p. 913-927, 2013.

MORAIS, E. A. **Estudo da resposta inflamatória em pulmões de camundongos imunizados com pb27r submetidos à infecção desafio por *Paracoccidioides brasiliensis***. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

MOREIRA, A. P. V. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 5, p. 51, 2008

MOSCARDI-BACCHI, M.; SOARES, A.; MENDES, R.; MARQUES, S.; FRANCO, M. "In situ" localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 27, p. 149-158, 1989.

MUNK, M. E.; KAJDACSZY-BALLA, A.; DEL NEGRO, G.; CUCE, L. C.; & DA SILVA, W. D. Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, p. 317-321, 1992.

NEVES, S. M. P.; MANCINI-FILHO, J.; MENEZES, E. W. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo, 2013.

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. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, p. 826-830, 1998.

PALMEIRO, M; CHERUBINI; K. YURGEL, L. S. Paracoccidioidomicose: revisão da literatura. **Scientia Medica**, v. 15, p. 234-7, 2005.

PRADO, A. A. Blastomicose dos pulmões e das suprarrenais. Síndrome de cardíaco negro. **Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo**. v. 20, p. 215, 1944.

PEREIRA, M; & VIANNA, G.O. A propósito de um caso de blastomicose (Píohemia blastomycótica). **Arquivo Brasileiro de Medicina**, v.1, p. 63-83, 1911.

PEDROSO, V. S. P.; VILELA, M. C.; PEDROSO, E. R. P.; TEIXEIRA, A. L. Paracoccidioidomycose com comprometimento do sistema nervoso central: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 44, n. 3, p. 33-40, 2008

PINZAN, C. F.; RUAS, L. P.; CASABONA-FORTUNATO, A. S.; CARVALHO, F. C. & ROQUE-BARREIRA, M. C. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS One**, v.5, e10757, 2010.

PITARCH, A.; NOMBELA, C.; GIL, C. Cell Wall Fractionation for Yeast and Fungal Proteomics. **Methods in Molecular Biology**, v. 425, p 217-239, 2008.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. Laboratory methods in histotechnology. **Armed Forces Institute of Pathology**. 1992.

RAMOS-E-SILVA, M.; SARAIVA, L. E. S. Paracoccidioidomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 26, n. 2, p. 257-269, 2008.

REIS, B. S. C. **Estudos bioquímicos e imunológicos das proteínas Pb28 e Pb27r do fungo *Paracoccidioides brasiliensis***. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2007.

REIS, B. S.; FERNANDES, V. C.; MARTINS, E. M. N.; SERAKIDES, R.; GÓES, A. M. Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v. 26, p. 5461-5469, 2008.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; & CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis* : how far from solving the riddle? **Medical Mycology**, v. 39, p. 232-241, 2001.

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. **Infection and Immunity**, v. 46, p. 346-353, 1984.

RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis. **Acta Médica Colombiana**, v. 3, p. 33-36, 1978.

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.

REZENDE, T. C. V.; BORGES, C.L.; MAGALHÃES, A.D.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M.A. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. **Journal of Proteomics**, v.75, p. 572-587, 2011.

RIBEIRO, O.D. Nova terapêutica para blastomicose. **Publ. Méd.**, v. 12, p. 36- 54, 1940.

SAFE, I. P.; VALLE, F. F. do; MAIA, D. C. C.; AGONIA, B.; MONTE, R. L.; ARAÚJO, J. de R.; CORDEIRO-SANTO, M. Extra-pulmonary manifestations of paracoccidioidomycosis associated with acquired immunodeficiency syndrome: a case report. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89(1), p. 150-3, 2014.

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.

SANTOS, V. C. F. de; **Clonagem, Expressão e Caracterização Imunológica da Proteína Pb40r Presente na Fração Protetora F0 de *Paracoccidioides brasiliensis***. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; & ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v. 40(3), p. 225-242, 2002.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications** (Ed C. R. Cihlar RL), New York: Marcel Dekker, 2001.

SAN-BLAS, G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationship. **Mycopathologia**, v. 79, p. 159-184, 1982.

SAN-BLAS, G.; & SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. **Mycopathologia**, v.62(2), p. 77-86, 1977.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Consenso em Paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 297-310, 2006.

SILVA- VERGARA, M. L.; MARTINEZ,R.; CAMARGO, Z. P.; MALTA, M. H.; MAFFEI, C. M.; CHADU, J. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**, v. 38, p. 193–199, 2000.

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

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. **American Journal of Pathology**, v. 156, p. 1811-1820, 2000.

SPLENDORE A. Zymonematosi con localizzazione nella cavità della bocca, osservata in Brasile. **Bulletin de la Société de pathologie exotique Journal**, v. 5. p. 313-9, 1912.

SPÓSITO, P. A. **Nanocápsulas e Nanoemulsões contendo antifúngico: desenvolvimento farmacocinético, caracterização e avaliação biológica em modelo de candidíase sistêmica**. Dissertação de Mestrado. Escola de Farmácia da Universidade de Ouro Preto, Ouro Preto. 2008.

THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. D. E. M.; FELIPE, M. S.; PADUAN, K, D. O. S.; RIBOLLA, P. M.; SAN- BLAS, G.; BAGAGLI, E. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS One**, v.7(5), e37694, 2012.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª ed. Artmed, Porto Alegre, cap 12, p. 305-334, 2008.

VALLE, A. C. F.; COSTA, R. L. B; MONTEIRO, P. C. F.; VON HELDER, J.; MUNIZ, M. M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 39, p.373-377, 2001.

VIERA E SILVA, C. R.; MATTOS, M. C.; FUJIMORE, K. Scanning electron microscopy of *Paracoccidioides brasiliensis*. Study with and without pre-treatment

with pooled sera from patients with 'South American blastomycosis'. **Mycopathology Mycoloy Application**, 54: 235-51, 1974.

VIEIRA E SILVA, C.R; SPADARO, J.; UEDA, A.K.; CAMPOS, E. P. DE. Lesões do pericárdio e miocárdio em um caso de blastomicose sul-americana generalizada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.15, p. 165-170, 1973.

VISBAL, G.; SAN-BLAS, G.; MURGICH, J.; & FRANCO, H. Paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. **Current Drug Targets - Infectious Disorders**, v. 5, p. 211-226, 2005.

WANKE, B.; AIDE, M. A. Chapter 6 - Paracoccidioidomycosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, p.1245-1249, 2009.

9 ANEXO

De: CEUA <ceua@prpq.ufmg.br>
Data: 25 de fevereiro de 2016 10:32
Assunto: Certificado CEUA
Para: goes@icb.ufmg.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º 321 / 2012, relativo ao projeto intitulado "Avaliação do acometimento cardíaco em camundongos Balb/C infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*", que tem como responsável Alfredo Miranda Góes, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 25/02/2016. Este certificado expira-se em 25/02/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol n.º 321 / 2012, related to the Project entitled "Evaluation of cardiac involvement in Balb / C infected with *P. brasiliensis*", under the supervision of Alfredo Miranda Góes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 25/02/2016. This certificate expires in 25/02/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 25/02/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br