

Roberta Leste Motta

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL A ANTÍGENOS DE *LACAZIA LOBOI*
UTILIZANDO SOROS DE PACIENTES COM LACAZIOSE**

Belo Horizonte
Minas Gerais - Brasil
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Roberta Leste Motta

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL A ANTÍGENOS DE *LACAZIA LOBOI*
UTILIZANDO SOROS DE PACIENTES COM LACAZIOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde : Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientador:

Prof. José Roberto Lambertucci

Co-orientadores:

Prof. Leonel Mendoza

Prof. Raquel Virgínia Rocha Vilela

Belo Horizonte
Minas Gerais - Brasil
2008

M921a **Motta, Roberta Leste.**

Avaliação da resposta humoral a antígenos de *Lacazia loboi* utilizando soros de pacientes com lacaziose [manuscrito]. / Roberta Leste Motta. Belo Horizonte: 2008.

88 f.: il.

Orientador : José Roberto Lambertucci.

Co-orientador : Leonel Mendoza.

Co-orientador : Raquel Virgínia Rocha Vilela.

Área de concentração : Infectologia e Medicina Tropical.

Tese (doutorado) : Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Micoses/diagnóstico. 2. Micoses/imunologia. 3. Western blotting. 4. Experimentação animal. 5. Dissertações acadêmicas. I. Lambertucci, José Roberto. II. Mendoza, Leonel. III. Vilela, Raquel Virgínia Rocha. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM : WC 450

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Ronaldo Tadeu Pena

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Jaime Arturo Ramirez

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor da Faculdade de Medicina

Francisco José Penna

Chefe do Departamento de Clínica Médica

José Carlos Bruno da Silveira

Colegiado de Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha (Coordenador)

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Jr. (Subcoordenador)

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Carlos Maurício Figueiredo Antunes

Prof. José Roberto Lambertucci

Fátima Lúcia Guedes Silva (Rep. Discente)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu filho Marco Paulo pelo amor incondicional, pela compreensão e toda a paciência que teve para entender a imensa ausência dos últimos anos e à Cica por ser meu alicerce, pelo amor, companheirismo, cuidado e força.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador José Roberto Lambertucci, pelo incentivo, pela confiança, por ter entendido minha ausência, por ter acreditado em mim, pelos e-mails e telefonemas de cobrança, por suas sugestões sempre pertinentes e imenso conhecimento compartilhado.

À minha grande amiga Raquel, minha co-orientadora, companheira de um período difícil, que sempre me incentivou, que fez muito mais do que podia para me ajudar a crescer, para que a minha formação fosse a mais completa. Por todas as quartas-feiras, todas as revisões bibliográficas, todo o tempo em Michigan, meu muito obrigada.

Ao meu co-orientador Leonel Mendoza, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com o seu laboratório na Michigan State University, pelo excelente curso de biologia molecular, por ter entendido as minhas falhas, por ter me incentivado e cobrado, por ser um exemplo de dedicação à pesquisa.

Às Dra. Patrícia Rosa e Dra. Andréa Belone do Instituto Lauro de Souza Lima, de Bauru, pelo fornecimento dos soros e antígenos utilizados. Por terem permitido que se constituísse um grupo de trabalho sólido.

À minha grande amiga professora Mônica Cabral, que significou um feliz reencontro nesses dois últimos anos, sempre um exemplo a ser seguido.

Aos professores e funcionários da Michigan State University pela atenção, ajuda e colaboração para que esse trabalho fosse possível.

Ao professor Carlos Maurício Figueiredo Antunes por suas colocações sempre pertinentes.

À minha mãe e às minhas irmãs Anna e Lili, por sempre acreditarem em mim e estimularem a busca de conhecimentos.

À Tatá, meu anjo da guarda, pelo amor com que cuida de tudo, pela tranquilidade que me permite ter quando longe de casa.

Aos pacientes, provenientes do Acre, Minas Gerais e São Paulo e também aos voluntários do grupo controle, pois sem eles esse trabalho não existiria.

A todos aqueles que de diferentes formas contribuíram para que esse sonho se transformasse em realidade.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio têm qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

RESUMO

AValiação DA RESPOSTA HUMORAL A ANTÍGENOS DE *LACAZIA LOBOI* UTILIZANDO SOROS DE PACIENTES COM LACAZIOSE

A doença de Jorge Lobo é uma micose da pele e do tecido subcutâneo causada pelo fungo *Lacazia loboi* que apresenta muitas semelhanças fenotípicas com o *Paracoccidioides brasiliensis*. Pela dificuldade do cultivo de *L. loboi* em laboratório, torna-se problemática a caracterização de suas proteínas antigênicas e o isolamento de seu DNA-genômico. Por isso, a maior parte dos estudos sorológicos publicados até hoje foi feita utilizando antígenos de *P. brasiliensis*. O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta humoral a antígenos de células leveduriformes de *L. loboi* extraídos de camundongos experimentalmente infectados com o fungo. Neste estudo, antígenos de *L. loboi* foram obtidos a partir de infecção em modelo animal. Camundongos BALB/c foram inoculados com extratos de leveduras preparados a partir de fragmentos de biópsia retirados de lesões de pacientes infectados com *L. loboi*. Seis meses após o inóculo os camundongos desenvolveram lesões típicas no coxim traseiro. Fragmentos do coxim dos camundongos sacrificados, contendo fungos viáveis, foram macerados e filtrados em condições estéreis para eliminar detritos. Os antígenos de *L. loboi* foram extraídos e mantidos a -20°C. A glicoproteína gp43 de *P. brasiliensis* obtida com a utilização da cepa Pb18, foi purificada do concentrado de exantígeno e a solução final foi aplicada em coluna de CNBr-4B aderida a anticorpos monoclonais de gp43 17c por cromatografia de afinidade. Realizou-se análise por Western blotting em 24 soros de pacientes com lacaziose, cinco soros de pacientes com paracoccidioidomicose e em soros de cinco voluntários procedentes de área não endêmica. O mesmo procedimento foi feito com soros de seis camundongos infectados e nove camundongos saudáveis. Os anticorpos da classe IgG nos soros de todos os pacientes e camundongos com lacaziose reconheceram um antígeno de ~ 193kDa. A gp43 de *P. brasiliensis* purificada foi identificada pelos anticorpos IgG de todos os soros de doentes avaliados, mas estes anticorpos não revelaram a mesma molécula antigênica nos extratos protéicos de células leveduriformes de *L. loboi*. Os soros de voluntários saudáveis e de camundongos controle não reagiram com os antígenos utilizados neste estudo. A caracterização molecular dos antígenos identificados, especialmente a proteína de 193kDa, pode ser importante para o desenvolvimento de novos tratamentos, imunoterapia, vacinas e testes diagnósticos para a lacaziose.

Palavras chave: Lacaziose; Paracoccidioidomicose; gp43, *Lacazia loboi*, Resposta humoral; Western blotting.

ABSTRACT

EVALUATION OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO *LACAZIA LOBOI* ANTIGENS IN SERA FROM PATIENTS WITH LACAZIOSIS

Jorge Lobo's disease is a mycosis of the skin and subcutaneous tissue caused by *Lacazia loboi*, a fungus that presents phenotypic similarities to *Paracoccidioides brasiliensis*. Because it resists culture, research to characterize and isolate its DNA and antigenic proteins has been a problem. Thence, most previous serological studies have used antigens from *P. brasiliensis*. The objective of the present study is to evaluate the host humoral immune response to *L. loboi* yeast-like cells extracted from mice experimentally infected with the fungus. Herein, *L. loboi* antigens were obtained from an experimentally infected animal. BALB/c mice were inoculated with yeast-like cells extracts obtained from fragments of skin lesions of patients with lacaziosis. Six months after inoculation, the mice developed typical lesions in both foot pads. Mice were sacrificed and the lesions from the foot pads were excised, then macerated in a glass tissue grinder and the fungal suspension was filtered to eliminate debris. The extracted antigens were maintained at -20°C . *P. brasiliensis* gp43 glycoprotein was isolated from the Pb18 strain and purified from the concentrated crude exoantigen. The final solution was loaded onto a column of CNBr-4B coupled to monoclonal antibody gp43 17c for affinity chromatography. Western blotting analyses were carried out using sera from 24 patients with lacaziosis, five patients with paracoccidioidomycosis and sera from five healthy controls from a non endemic area. The same procedure was performed with sera from six infected and nine non infected mice. IgG antibodies from all patients and mice with lacaziosis detected a $\sim 193\text{kDa}$ antigen. The purified gp43 glycoprotein of *P. brasiliensis* was detected by the IgG of all evaluated sera, but the IgG in these sera failed to detect the same molecular antigen in the extracts from *L. loboi* yeast-like cells. Sera from healthy volunteers and control mice did not react with the antigens used. The molecular characterization of the detected antigens, particularly the $\sim 193\text{kDa}$ protein, may be important for the development of new treatments, immunotherapy, vaccine and diagnostic tests for lacaziosis.

Key-words: Lacaziosis; Paracoccidioidomycosis; gp43; *Lacazia loboi*; Humoral response; Western blotting.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Listagem de soros de 24 pacientes com lacaziose, de cinco com paracoccidioidomicose e cinco voluntários controles de área não endêmica.....	55
Tabela 2	Listagem de soros de seis camundongos BALB/c experimentalmente infectados com células leveduriformes de <i>L. loboi</i> e de nove camundongos controles.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Lesão em indicador E, nódulos endurecidos queloidiformes, com pequena área de ulceração.....	40
Figura 2	Forma disseminada da doença em membros inferiores.....	40
Figura 3	Lesões típicas queloidiformes em perna D.....	41
Figura 4	Forma localizada da doença em pavilhão e lobo de orelha.....	41
Figura 5	Lesão tipo placa infiltrada com 30 anos de evolução em panturrilha.....	42
Figura 6	Placa formada pela confluência de pápulas e nódulos queloidiformes em região anterior de perna D.....	42
Figura 7	Exame histopatológico de lesão queloidiforme de paciente com lacaziose. Coloração pelo HE. Aumento de 40X.....	43
Figura 8	Exame histopatológico de lesão queloidiforme de um paciente com lacaziose. Coloração pela prata. Aumento de 40X. Observa-se disposição das células leveduriformes em cadeias.....	43
Figura 9	Inoculação intradérmica de células leveduriformes de <i>L. loboi</i> em camundongos desenvolvida no Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, para a futura extração de antígenos em modelo animal.....	46

Figura 10	Camundongo BALB/c experimentalmente infectado com <i>Lacazia loboi</i> , seis meses após a inoculação.....	46
Figura 11	Detalhe do coxim traseiro do camundongo BALB/c infectado experimentalmente com formação de lesão queloidiforme similar a infecção humana.....	47
Figura 12	Lesões em ambas as patas traseiras em camundongo experimentalmente infectado com <i>Lacazia loboi</i>	47
Figura 13	Desenho esquemático do sanduíche utilizado para a transferência do gel para a membrana de PVDF (BioRad, Hercules, CA, USA).....	52
Figura 14	Mini PII Multiscrn Apparatus: aparelho utilizado para facilitar o imunoblotting com os soros dos pacientes após a transferência do gel para a membrana.....	53
Figura 15	Gel para eletroforese de proteínas corado por azul de Comassie, em forma triplicada. Visualizamos a gp43 de <i>P.brasiliensis</i> (A) e o perfil protéico do extrato de <i>L. loboi</i> (B). Além da proteína imunodominante de ~193kDa são visualizadas outras proteínas no extrato de <i>L. loboi</i> (B) indicadas pelas setas pretas. M = marcação de peso molecular.....	58
Figura 16	Reação de 17 soros de pacientes com lacaziose contra a gp43 purificada de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e um paciente com paracoccidioidomicose.....	60
Figura 17	Reação de 17 dos 24 soros de humanos com lacaziose testados e um controle (C) usando proteínas extraídas das leveduras de <i>Lacazia loboi</i> em análise por Western blot.....	61
Figura 18	Reação de sete dos 24 soros de humanos com lacaziose e quatro de cinco pacientes com paracoccidioidomicose testados usando proteínas extraídas das leveduras de <i>Lacazia loboi</i> em análise por Western blot	62
Figura 19	Reação de seis soros de camundongos experimentalmente inoculados com <i>Lacazia loboi</i> contra antígenos de <i>L. loboi</i> extraídos de células leveduriformes e analisados por Western blot (linha 1 a 6). A figura também mostra nove soros de camundongos saudáveis e cinco soros de humanos de zonas não endêmicas.....	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral	
3.2 Objetivos específicos	
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
5 RESULTADOS.....	57
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÕES.....	70
8 PROPOSIÇÕES.....	72
9 REFERÊNCIAS.....	74
10 ANEXOS.....	88

A doença de Jorge Lobo, também conhecida como lacaziose, é uma micose da pele e do tecido subcutâneo, de evolução crônica, causada pelo fungo *Lacazia loboi*. O Brasil é o país com maior prevalência (64% dos casos publicados), porém há referências de casos na Colômbia, Suriname, Guiana Francesa, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Peru, Equador, Bolívia, México e Europa (LACAZ et al., 1986). O agente etiológico dessa doença é um fungo não cultivável que, além de infectar humanos, foi isolado também em lesões de golfinhos.

Lacazia loboi pertence à ordem *Onygenales*, família *Ajellomycetaceae* e apresenta muitas semelhanças com o *Paracoccidioides brasiliensis*. A proximidade filogenética entre eles foi demonstrada em estudos por técnicas moleculares (HERR et al., 2001; VILELA et al., 2005). Os dois fungos são idênticos à microscopia eletrônica (FURTADO et al., 1967), têm paredes celulares com complexos de polissacarídeos e oligossacarídeos sugerindo estrutura química similar (MENDES et al., 1984) e apresentam antígenos comuns identificados em soro de coelho anti - *P. brasiliensis* (LANDMAN et al., 1988).

Por tratar-se de um fungo não cultivável, e pela proximidade filogenética em relação ao *P. brasiliensis*, várias hipóteses levantadas sobre o *L. loboi* foram formuladas a partir de respostas dadas em estudos realizados com o *P. brasiliensis*. A paracoccidioidomicose é uma doença de impacto em vários países da América do Sul, entre os quais o Brasil onde é considerada endêmica. Isso motivou precocemente a investigação de proteínas antigênicas com potencial para o diagnóstico desta enfermidade e para o desenvolvimento de vacinas protetoras.

Entre muitas frações antigênicas estudadas, a proteína imunodominante gp43 de *P. brasiliensis* foi alvo de muitas pesquisas e apresenta importante papel na imunologia e diagnóstico da paracoccidioidomicose (CISALPINO et al., 1996; PUCCIA et al., 1986; TABORDA et al., 1998). Desta forma, atribuiu-se à sua homóloga de *L. loboi* essa mesma importância (MENDOZA et al., 2001; MENDOZA & SILVA, 2004).

O pequeno número de casos de lacaziose, a presença de casos em áreas geográficas restritas e a dificuldade de isolamento de DNA-genômico de *L. loboi* contribuíram para que a maior parte dos estudos sorológicos até hoje publicados

fosse feita com antígenos de *P. brasiliensis*. Com exceção de quatro estudos prévios (BAHAWAN et al., 1976; MENDOZA et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 1984; VIDAL et al., 1997), nos últimos 40 anos, pesquisas dos aspectos imunológicos de *L. loboi* são feitas utilizando antígenos de *P. brasiliensis* (CAMARGO et al., 1998; FONSECA et al., 1971; LANDMAN et al., 1988; MENDES-GIANNINI et al., 1984; PUCCIA et al., 1991; RODRIGUEZ & LACAZ, 1984; SILVA et al., 1968; TABORDA & CAMARGO, 1993; TABORDA et al., 1994; WOODARD, 1972). Esses estudos mostraram que pacientes com lacaziose possuem anticorpos contra os maiores imunógenos de *P. brasiliensis*, incluindo a glicoproteína imunodominante gp43. Utilizando Western blotting, Camargo et al. (1998) encontraram oito antígenos de *P. brasiliensis* que vão de 29 kDa a 108 kDa, sendo detectados por anticorpos no soro de hospedeiros infectados com *L. loboi*. Estes e outros pesquisadores relataram que os anticorpos nestes soros também identificam o antígeno purificado gp43 em ELISA (BAHAWAN et al., 1976; CAMARGO et al., 1998; LANDMAN et al., 1988; MENDES-GIANNINI et al., 1984; PUCCIA et al., 1991).

Somente em 2008, Mendoza e colaboradores utilizaram antígenos de células leveduriformes de *L. loboi*. Utilizando Western blotting encontraram um antígeno de alto peso molecular, um imunógeno de ~193kDa, que foi detectado por anticorpos no soro de pacientes com lacaziose, de golfinhos e de camundongos infectados por *L. loboi*. Isso sugere que uma das proteínas antigênicas do *L. loboi* tem peso molecular bem mais alto que sua homóloga da gp43 de *P. brasiliensis*.

Pela importância dos dados encontrados e pelo fato de terem utilizado pequena amostragem (soro de apenas quatro pacientes), o presente estudo foi proposto utilizando-se soro de 24 pacientes na tentativa de comprovar os resultados anteriormente encontrados por Mendoza e colaboradores (MENDOZA et al., 2008).

Para uma melhor compreensão da imunologia da lacaziose são fundamentais estudos sorológicos. A caracterização molecular de outros antígenos imunogênicos pode significar novas perspectivas na prevenção, diagnóstico e tratamento desta enfermidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A doença de Jorge Lobo é uma micose de evolução crônica da pele e do tecido subcutâneo, caracterizada por lesões do tipo queloidiformes, verrucosas, nodulares e raramente por placas vegetanates, crostosas ou tumorais. Essa micose já foi descrita em brancos, negros e índios, não havendo evidências de maior suscetibilidade à infecção em determinado grupo étnico.

Foi descrita pela primeira vez em 1930, em um paciente oriundo da região Amazônica, que apresentava lesões queloidiformes na região sacral (LOBO, 1949). O professor Jorge de Oliveira Lobo (LOBO, 1930; LOBO, 1931), natural de Recife, Pernambuco, acreditou que o seringueiro apresentava uma nova enfermidade apesar da semelhança microscópica do agente com o *P. brasiliensis* e a denominou de blastomicose queloidiana.

Depois disso, diversos autores descreveram a doença e nomes diferentes foram dados. Em 1940, Fonseca Filho & Arêa Leão, pela primeira vez, a denominaram Doença de Jorge Lobo. Outros nomes como Lobomicose, Blastomicose queloidiforme, Granulomatose blastomicóide, Blastomicose da Amazônia e Miraip foram usados (FONSECA FILHO & ARÊA LEÃO, 1940; FONTAN, 1960; FRAGA & MIRANDA, 1968; MACHADO, 1962).

O agente desta doença é hoje denominado *Lacazia loboi*, binômio introduzido por Taborda et al., em 1999, como uma homenagem ao Professor Carlos da Silva Lacaz, um ícone da história da micologia brasileira. A criação deste nome tem sido apoiada, também, pelos estudos filogenéticos realizados por Herr et al. (2001). A classificação taxonômica deste fungo sempre foi um desafio para os pesquisadores. Inicialmente classificado no gênero *Glenosporella* espécie *loboi* por Fonseca Filho e Arêa Leão em 1940, posteriormente, recebeu a classificação de *Blastomyces brasiliensis* (CONANT & HOWELL, 1942), *Glenosporopsis amazonica* (FONSECA FILHO, 1943), *Blastomyces loboi* (LANGERON & VANBREUSEGHEM, 1952), *Loboa loboi* (CIFERRI et al., 1956), *Lobomyces loboi* (BORELLI, 1958) e *Paracoccidioides loboi* (ALMEIDA & LACAZ, 1948).

Essa micose é predominante na região Amazônica e afeta especialmente trabalhadores rurais que vivem em contato constante com a vegetação e o solo,

como é o caso dos seringueiros desta região. O estudo da distribuição geográfica da doença baseia-se, unicamente, na procedência dos pacientes acometidos por essa micose e que habitam, em sua maioria, áreas com clima quente e úmido, com temperatura média anual de 24°C e elevado índice pluviométrico (NERY-GUIMARÃES & MACEDO, 1950).

Por não se tratar de doença de notificação compulsória, a sua real prevalência é desconhecida. Estudo realizado no Instituto Lauro de Souza Lima, em Bauru, revelou 458 casos publicados no mundo, dos quais 295 ocorreram no Brasil (64%), especialmente na região Amazônica (OPROMOLLA et al., 1999). A elevada prevalência de casos nesta região está associada a condições climáticas e ambientais como altas temperaturas, taxa de umidade, índice pluviométrico que podem favorecer a instalação de um reservatório natural do agente (BORELLI, 1968).

Estudo realizado sobre o número de casos da doença na população indígena da tribo Caiabi determinou que os fatores ambientais e o risco de exposição ao agente eram importantes na disseminação da doença. Essa tribo estava situada em território entre os rios Arinos e Teles Pires, afluentes do Tapajós, no estado do Mato Grosso, onde havia alta prevalência da doença (57 casos diagnosticados em 560 indivíduos). Quando a tribo foi transferida para o Parque Nacional do Xingu, houve queda do número de casos devido à ausência da doença nos descendentes nascidos na nova área (BARUZZI et al., 1973; BARUZZI et al., 1979). A doença é mais comum no sexo masculino devido às atividades ocupacionais exercidas. Geralmente manifesta-se na faixa etária de 21 a 40 anos, coincidindo com a maior exposição natural ao agente, por ser época de maior atividade laborativa (NAZARÉ, 1976).

A lacaziose foi descrita por Migaki, em 1971, em um golfinho (delfim) na costa oeste da Flórida. Nesses animais, a doença já havia sido relatada em outras ocasiões (BOSSART, 1984; CALDWELL et al., 1975; DE VRIES & LAARMAN, 1973; POELMA et al., 1974; SIMÕES-LOPES, 1993; SYMMERS, 1983; WOODWARD, 1972). Ocorre sob a forma de lesões geralmente úlcero-crostosas, localizadas mais comumente na cauda ou dorso desses animais, não sendo descritas lesões

viscerais. É difícil conhecer a história natural da doença entre esses animais e a forma de infecção, mas as evidências levam a crer que um dos reservatórios do fungo na natureza seja a água ou coleções líquidas (LACAZ et al., 1986). Um fato que reforça essa hipótese foi o aparecimento da doença em paciente na Geórgia, Estados Unidos, que havia viajado para a Venezuela anos atrás e se banhado numa cachoeira onde foi exposto a altas pressões de água, desenvolvendo pequena escoriação no tórax que evoluiu para lesão queloidiforme (BURNS et al., 2000).

A porta de entrada do *L. loboi* no organismo não se encontra totalmente esclarecida. Acredita-se que o agente penetre após pequenos traumatismos cutâneos. Parte dos pacientes relata aparecimento das lesões após ferimentos provocados por traumatismo ou picada de insetos, fato muito comum em regiões de mata de áreas tropicais (MORAES, 1962).

Quadros de infecção subclínica não podem ser confirmados devido à ausência de um antígeno específico que possa ser empregado em inquéritos epidemiológicos. Desta forma, não é determinado se todos os indivíduos que entram em contato com o fungo desenvolverão manifestações clínicas da doença (BARUZZI et al., 1979). O período de incubação da doença é desconhecido, e acredita-se variar de um a dois anos. A micose apresenta evolução lenta, sendo que as lesões iniciais podem ser tão pequenas que o paciente, muitas vezes, não procura a assistência médica (LACAZ et al., 1986).

O diagnóstico precoce desta doença pode significar melhor prognóstico, pois não existe tratamento medicamentoso eficaz, sendo a remoção cirúrgica o tratamento mais utilizado, embora em muitos casos ocorra o aparecimento de novas lesões (BRÉS, 1978). O acompanhamento dos pacientes submetidos à exérese cirúrgica se faz necessário por longos períodos, antes de serem considerados como curados da micose.

Na literatura existem casos de inoculação experimental em humanos (BORELLI, 1961) e inoculação acidental (AZULAY et al., 1970), com aparecimento de lesões da doença na região do trauma. Há relato de acidente envolvendo um atendente de aquário e um golfinho portador da doença, com posterior aparecimento de lesão no

dorso da mão (SYMMERS, 1983). Apesar disso, não existe comprovação de transmissão inter-humana da lacaziose, principalmente conjugal e familiar (BARUZZI et al., 1973; LACAZ et al., 1986).

Como quadro clínico, a doença apresenta lesões cutâneas polimórficas, sendo o diagnóstico baseado, fundamentalmente, no quadro histológico e no encontro do *L. loboi* nos tecidos do paciente (MICHALANY, 1963). As lesões são exclusivamente cutâneas e predominantemente queloidiformes (SILVA,1972), mas podem ser papulosas, nodulares, infiltrativas, verrucosas, gomosas, ulcerosas e tuberosas, não ocorrendo comprometimento visceral. As formas infiltrativas são consideradas formas iniciais e as formas ulceradas são freqüentemente secundárias a traumatismos e não ulceração espontânea (OPROMOLLA et al., 1999; SILVA, 1972).

Embora pouco freqüente, pode ocorrer comprometimento de gânglios linfáticos regionais (AZULAY et al., 1976; LEITE, 1967). Normalmente os pacientes com lesões não apresentam sintomas, mas podem queixar-se de ligeiro ardor e prurido, principalmente nas fases iniciais e, mais tardiamente, sensação de anestesia local . O pavilhão auricular é atingido freqüentemente pela doença. Isso pode ser explicado pelo hábito das populações do interior de carregar palha, madeira para construção e outros objetos nos ombros, o que levaria a pequenos traumas na região (MORAES, 1962). Sendo assim, a penetração do fungo dependeria de prévio traumatismo cutâneo.

Em 1972, Silva, utilizando-se do aspecto morfológico das lesões cutâneas, propôs a classificação da doença em cinco formas clínicas, a saber: infiltrativa, queloidiforme, gomosa, ulcerada e verruciforme. Essa classificação tem suas restrições, pois, nem sempre é possível individualizar as formas descritas, podendo ocorrer associação de dois tipos de lesão no mesmo indivíduo.

Em 2000, Opromolla e Belone descreveram 40 casos da doença no estado do Acre, classificando as lesões em monomórficas e polimórficas, de acordo com a predominância de um só tipo de lesão ou a concomitância de vários tipos no mesmo paciente. De acordo com a distribuição das lesões, os autores classificaram-nas como: lesões localizadas (aquelas restritas a uma única área), lesões multifocais

(aquelas localizadas em um membro ou segmento de membro) e lesões multicêntricas (aquelas que envolvem várias regiões anatómicas distintas).

Existe uma variabilidade na resposta do hospedeiro à infecção causada pelo *L. loboi*, sendo que alguns pacientes manifestam precocemente a forma multicêntrica da doença. Já outros apresentam apenas lesão localizada, assim permanecendo por longos períodos, ou mesmo indefinidamente. Entre essas duas situações haveria uma ampla variação no comportamento e na evolução da doença (LACAZ et al., 1986). Há relato de regressão espontânea de lesões maculosas observadas entre os índios Caiabi (MACHADO, 1962).

A forma de disseminação da infecção ainda não é completamente compreendida. Acredita-se ocorrer por via hematogênica, mas como o agente apresenta tropismo pela pele, não acomete órgãos internos (BARUZZI et al., 1981; FRAGA & MIRANDA, 1968). Apesar disso, existe relato de um caso com comprometimento testicular 47 anos após o início da doença em paciente que apresentava também comprometimento de gânglios linfáticos (AZULAY et al., 1976).

No exame direto da biópsia do primeiro caso de lacaziose, o Professor Jorge Lobo observou a presença de um grande número de parasitos com aspectos micromorfológicos semelhantes ao de *P. brasiliensis* (LACAZ et al., 1986). Nas lesões cutâneas, em exame a fresco, o fungo apresenta-se sob forma de células globosas, com paredes duplas, birrefringentes e citoplasma com aspecto homogêneo ou granular, medindo 6,0-13,0 X 5,0-11,0 µm. Sua reprodução se faz por brotamento simples ou múltiplo e, deste modo, ele pode se apresentar sob formas catenuladas com duas a oito células, unidas umas às outras por pequenas pontes citoplasmáticas, formando estrutura em rosário ou, ainda, apresentar-se sob formas triangulares. A microscopia eletrônica demonstrou que não existe distinção entre *P. brasiliensis* e *P. loboi*, com relação às suas organelas, porém esses apresentam diferenças no modo de brotamento (LACAZ et al., 1991; SESSO & BARUZZI, 1988). A parede celular de *L. loboi* possui duas camadas, sendo que a mais externa freqüentemente aparece espessada e de sua porção exterior emergem expansões lameliformes irregulares que, em corte, aparecem como projeções da parede celular com disposição raiada (LACAZ et al., 1991). O estudo da ultra-estrutura celular de *L. loboi* buscava explicar

porque não se conseguia um modelo de cultivo *in vitro* para este microrganismo. Em trabalho realizado por Vilani-Moreno & Opromolla (1997) foram coletadas biópsias de tecido de 15 pacientes, sendo os fragmentos submetidos à coloração com DF-BE (Diacetato de Fluoresceína-Brometo de Etídio). A viabilidade do *L. loboi* no tempo zero variou de 21% a 46% medida pelo método de coloração de DF-BE.

O exame histopatológico das lesões é bastante típico, podendo ser vista reação histiocitária difusa nos tecidos do hospedeiro com grande número de células gigantes tipo corpo estranho e Langhans, com ou sem a presença de granulomas. Numerosos fungos livres ou no interior de células gigantes podem estar presentes (LEITE, 1954). A ausência de inflamação aguda ou necrose, o caráter permanentemente produtivo das lesões e sua localização indicam que esta doença é produzida por parasito de baixa virulência (GADELHA & BANDEIRA, 1983; OPROMOLLA & NOGUEIRA, 2000).

Já foram relatadas alterações epidérmicas como áreas focais de atrofia, hipertrofia, ou mesmo de normalidade. Podem ser visualizadas hiperqueratose e parakeratose (BARUZZI et al., 1979; OPROMOLLA & NOGUEIRA, 2000; WIERSEMA, 1971;). Estudo imunohistoquímico de lesões de três pacientes com doença de Jorge Lobo revelou predominância de macrófagos, poucos linfócitos T com fenótipo CD4, ausência de linfócitos B e neutrófilos (ESTERRE et al., 1991). Na descrição histopatológica da doença, vários autores relatam que os macrófagos apresentam citoplasma com aspecto espumoso (DESTOMBES, 1964; WIERSEMA, 1971). Estudos ultra-estruturais revelam que este aspecto é resultante de restos da parede celular do fungo que são endocitados pelos macrófagos (SESSO & BARUZZI, 1988).

A associação entre doenças infecciosas e padrão de resposta Th1/Th2, relacionado à proteção/suscetibilidade, foi relatada por alguns autores. Na doença de Jorge Lobo, os estudos abordando os aspectos imunológicos são ainda escassos, possivelmente pelo fato de seu agente etiológico não ter sido cultivado até o momento.

Na paracoccidiodomicose experimental murina, Calich e Kastino, em 1998, sugeriram que a resistência ou suscetibilidade à doença estaria baseada no tipo de resposta imune predominante, Th1 ou Th2, do hospedeiro frente ao *P. brasiliensis*. Deste modo, animais resistentes (A/SN) mostraram padrão de resposta do tipo Th1 com

hipersensibilidade tardia, ativação macrofágica e baixos níveis de anticorpos específicos; enquanto animais suscetíveis (B10.A) desenvolveram padrão de resposta predominante do tipo Th2 com altos títulos de anticorpos específicos, ausência de hipersensibilidade tardia e ativação deficiente de macrófagos (CALICH & KASTINO, 1998).

Dosagens de imunoglobulinas e proteínas séricas em pacientes com lacaziose foram feitas em trabalho realizado por Pecher e colaboradores, em 1979. A maioria dos pacientes apresentava níveis normais de proteínas e de IgG, IgA e IgM. Resultados similares foram encontrados em 17 índios Caiabi portadores da micose (BARUZZI et al., 1979).

A imunidade celular na doença foi avaliada em alguns estudos. Azulay e colaboradores, em 1970, avaliaram a imunidade celular em 20 indivíduos com doenças diversas sendo que um apresentava lacaziose e um paracoccidiodomicose, empregando vários tipos de "lobina" mas este estudo não foi muito útil por ter sido realizado com apenas um paciente com a doença. Petcher e colaboradores, em 1979, estudaram 14 pacientes e observaram que todos foram reatores a pelo menos dois dos antígenos testados (PPD, histoplasmina, tricofitina e candidina), enquanto o teste de contato com dinitroclorobenzeno (DNCB) mostrou-se negativo em 83,3% dos casos.

Estudo realizado por Musatti e colaboradores, em 1980, revelou que quatro índios Caiabi portadores da doença eram incapazes de se sensibilizar ao DNCB, porém respondiam aos testes intradérmicos, inclusive à paracoccidiodina. Em 1988, novo estudo da resposta imune celular foi feito com 12 pacientes, dos quais grande parte não reagiu aos testes realizados, exceto ao PPD, que foi positivo em todos. Este estudo sugeriu que os pacientes com lacaziose sofriam de uma deficiência imune celular parcial (PECHER & FUCHS, 1988).

Em 2002, trabalho realizado por Vilani-Moreno mostrou que pacientes com lacaziose apresentam alterações no perfil de citocinas, com predomínio do perfil Th2, o que poderia modificar a capacidade de regulação dos mecanismos responsáveis pela contenção do patógeno. Apesar desses dados, até o momento não se tem

conhecimento completo de como o sistema imune participa no controle ou no desenvolvimento da doença de Jorge Lobo. Sabe-se que a micose se restringe à pele, sendo as lesões cutâneas caracterizadas por granulomas macrofágicos ricos em parasitas, mas a resposta do hospedeiro frente ao *L. loboi* parece ser variável, uma vez que alguns pacientes exibem a forma localizada da doença, enquanto outros a forma disseminada.

O fungo *L. loboi* apresenta muitas semelhanças com o *P. brasiliensis*. São idênticos à microscopia eletrônica (FURTADO et al., 1967). As paredes celulares de ambos apresentam complexos de polissacarídeos e oligossacarídeos sugerindo estrutura química similar (MENDES et al., 1984). Apresentam antígenos comuns que podem ser detectados em soro de coelho anti - *P. brasiliensis*. (LANDMAN et al., 1988). Foi verificado também que anticorpos fixadores do complemento são capazes de reagir com antígeno do *P. brasiliensis* em alguns soros de pacientes com lacaziose. Outra semelhança é percebida com técnica de imunofluorescência demonstrando que antigenicamente ambos estão relacionados em suas formas leveduriformes. Com estudos utilizando biologia molecular, a proximidade filogenética entre estes dois fungos pôde ser demonstrada, sendo que ambos pertencem à Ordem *Onygenales* (HERR et al., 2001).

Os estudos de frações antigênicas na paracoccidiodomicose estão mais avançados que na lacaziose. Entre muitas frações antigênicas estudadas, a proteína imunodominante gp43 de *P. brasiliensis* foi alvo de muitas pesquisas. Em 1984, Mendes-Gianinni e colaboradores descreveram reação antigênica cruzada de *L. loboi* com *P. brasiliensis*, através da utilização de reação de imunoprecipitação. Os autores perceberam que utilizando antígeno purificado de *P. brasiliensis* e a glicoproteína gp43 obtinham reações cruzadas com soros de pacientes com lacaziose, mas, com maiores diluições, o teste tornava-se mais específico, sendo reativo apenas nos soros de pacientes com paracoccidiodomicose. Resultados similares foram publicados por Puccia e colaboradores, em 1991, onde foram feitas também reações de ELISA com soros de pacientes com paracoccidiodomicose, histoplasmose e doença de Jorge Lobo, demonstrando que esta molécula tem epítipo específico para sua ação antigênica.

Visando o encontro de antígenos com função imunológica em *P. brasiliensis*, um trabalho de grande importância utilizou análise por eletroforese em gel de poliacrilamida, onde foram selecionadas glicoproteínas de pesos moleculares distintos, 43 kDa (gp43), 55kDa (gp55) e outras frações menos antigênicas, se concentrando na busca de frações moleculares regularmente expressas. Estes conjugados glicoprotéicos foram testados com soro de pacientes com paracoccidiodomicose, demonstrando que a fração gp43 foi identificada em 100% dos soros estudados (PUCCIA et al., 1986). Este antígeno já havia sido previamente descrito em 1971, por Yarzabal (TRAVASSOS et al., 1995).

A gp43 é amplamente utilizada em provas de imunodifusão, pois se mostrou bom marcador no controle do tratamento da doença. Devido aos bons resultados em pacientes com paracoccidiodomicose, a gp43 purificada vem sendo utilizada desde então com finalidade de diagnóstico da paracoccidiodomicose em reações de imunoprecipitação, imunodifusão e hemaglutinação passiva, com bons resultados (CAMARGO et al., 1998; PUCCIA & TRAVASSOS, 1991; TRAVASSOS et al., 1995).

A gp43 foi caracterizada do ponto de vista molecular, sendo encontrada em região de 1329 pares de bases e também teve seu epítipo peptídico que apresenta ação imunológica identificado (CISALPINO et al., 1996). Este epítipo, quando bloqueado com periodato, inibe as reações cruzadas com soros de pacientes com a doença de Jorge Lobo e histoplasmose (ORTIZ et al., 1998). Em outro estudo, através de provas imunoquímicas foi demonstrada a presença de gp43 em extratos de lesões cutâneas da doença de Jorge Lobo (VIDAL et al., 1997).

O insucesso no cultivo de *L. loboi* em laboratório explica porque os estudos da imunopatologia, taxonomia e imunologia do mesmo têm sido tão difíceis. O objetivo inicial dos primeiros pesquisadores foi a reprodução da doença em cobaias visando facilitar o estudo desta enfermidade. A primeira tentativa, que não logrou êxito, foi realizada pelo próprio Jorge Lobo inoculando extratos triturados de pele de paciente parasitada em cobaias, ratos e macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) (LOBO, 1938). Tentativa similar, com ratos brancos, foi realizada por Azulay em 1970, também sem sucesso (AZULAY, 1970).

Outros investigadores se empenharam na busca de modelo experimental ideal para a reprodução da doença: Cerruti e Zamith (1948), Arêa Leão e colaboradores (1948), Nery-Guimarães (1964), Carneiro e colaboradores (1968), Sampaio & Dias (1970). Entretanto, somente em 1971, Sampaio e colaboradores conseguiram reproduzir a doença em hamsters. Posteriormente, em 1977, este grupo de pesquisadores também reproduziu a doença em tatus (*Eupharactus sexcintus*), que desenvolveram lesões cutâneas 11 meses após a inoculação.

Grande contribuição para o estudo da enfermidade ocorreu em 1999, quando no Instituto Lauro de Souza Lima, em Bauru, um grupo de pesquisadores conseguiu a manutenção da doença em camundongos BALB/c (OPROMOLLA et al., 1999); estas cobaias apresentavam alterações histopatológicas semelhantes às da doença humana. Nas lesões dos camundongos foram observadas estruturas fúngicas viáveis, comprovadas pela técnica de acetato de fluoresceína e brometo de etídio, o que facilitou o estudo desta doença (BELONE et al., 2001).

Pela ausência de cultivo de *L. loboi*, até o momento, os aspectos imunológicos envolvidos nesta doença são ainda obscuros. Pesquisas sobre sorologia da doença têm sido realizadas na maioria dos casos, com antígenos do *P. brasiliensis* (FAVA NETTO & RAPHAEL, 1961). Alguns estudos, citados acima, demonstraram que soros de pacientes com lacaziose reagem positivamente em reações de fixação de complemento face ao antígeno polissacarídeo do *P. brasiliensis*, sugerindo, então, a presença de antígenos comuns entre *P. brasiliensis* e *L. loboi*.

Apesar disso, os estudos sobre os mecanismos imunológicos atuantes nesta enfermidade ainda não esclareceram o mecanismo de participação do sistema imune no controle ou no desenvolvimento da doença de Jorge Lobo. Com o aprimoramento das técnicas moleculares a dificuldade causada pelo fato de ser um fungo não cultivável pôde ser parcialmente superada uma vez que já é possível isolar o DNA do mesmo diretamente do tecido acometido.

A busca pelas moléculas com atividade antigênica mantém-se um desafio e o estudo realizado por Vilela e colaboradores, em 2005, foi de grande valia, pois possibilitou o desenvolvimento de um modelo molecular simples para o estudo de genes que

codificam proteínas potencialmente importantes. Estes investigadores descobriram que devido proximidade filogenética de *L. loboi* com *P. brasiliensis*, é possível amplificar regiões do DNA não conhecidas em *L. loboi*, pela criação de novos “primers”, amplificando com êxito a proteína homóloga gp43-símile do DNA genômico de *L. loboi* extraído de camundongos experimentalmente inoculados.

Considerando que, na paracoccidioidomicose, a proteína imunodominante gp43 de *P. brasiliensis* apresenta importante papel na imunologia e diagnóstico da doença, atribuiu-se à sua homóloga de *L. loboi* essa mesma importância (MENDOZA et al., 2001; MENDOZA & SILVA, 2004). A gp43 de *P. brasiliensis* é uma glicoproteína de 43k Da (gp43) que foi, como mencionado, estudada e caracterizada nas últimas duas décadas (CISALPINO et al., 1996; PUCCIA et al., 1986; TABORDA et al., 1998). Quando testada com soros de pacientes com lacaziose apresenta reações cruzadas, o que sugere a presença de seqüências comuns de aminoácidos entre essa fração antigênica e sua homóloga de *L. loboi* (LANDMAN et al., 1988; PUCCIA et al., 1991; VIDAL et al., 1997).

Pela dificuldade até o momento do cultivo de *L. loboi*, tornou-se problemático o isolamento de suas proteínas imunogênicas e de seu DNA-genômico. Portanto, a maior parte dos estudos sorológicos foi feita com antígenos de *P. brasiliensis* (CAMARGO et al., 1998; FONSECA et al., 1971; GIANNINI et al., 1984; LANDMAN et al., 1988; MENDES- RODRIGUEZ et al., 1984; PUCCIA et al., 1991; SILVA et al., 1968; TABORDA et al., 1993; TABORDA et al., 1994; WOODARD, 1972). Estes estudos mostraram que pacientes com lacaziose possuem anticorpos contra vários imunógenos de *P. brasiliensis*, entre eles, a glicoproteína imunodominante gp43. Alguns pesquisadores utilizaram essa informação para agrupar taxonomicamente o *L. loboi* dentro do gênero *Paracoccidiodes* (BAHAWAN et al., 1976; RODRIGUEZ et al., 1984; PUCCIA et al., 1991; TABORDA et al., 1993; TABORDA et al., 1994; VIDAL et al., 1997) e estudar a resposta humoral estimulada por *L. loboi* nos pacientes infectados. Apesar de vários antígenos de *P. brasiliensis* serem detectados por anticorpos em soros de pacientes com *L. loboi*, apenas o trabalho realizado por Mendoza e colaboradores utilizou antígenos específicos de *L. loboi* (MENDOZA et al., 2008).

Neste estudo, os pesquisadores utilizaram antígenos de *L. loboi* extraídos de camundongos, além de soro de pacientes com lacaziose, de camundongos e golfinhos infectados. Foi importante por caracterizar proteínas imunogênicas expressadas em análises por Western blot. Mostraram que um antígeno imunodominante de alto peso molecular de ~193kDa foi reconhecido por anticorpos no soro de pacientes e camundongos com lacaziose. Isso sugere que, diferente do que se pensava, uma das proteínas antigênicas de *L. loboi* tem peso molecular bem mais alto que a homóloga da gp43 de *P. brasiliensis*. Diferente da paracoccidioomicose, na lacaziose a proteína homóloga da gp43 parece ter menor importância imunológica.

O estudo realizado por Mendoza e colaboradores (MENDOZA et al., 2008) foi o primeiro a avaliar proteínas imunogênicas expressadas por células leveduriformes de *L. loboi*. Os dados encontrados por estes pesquisadores podem modificar a importância anteriormente atribuída a algumas proteínas.

Entretanto, o trabalho destes autores foi realizado com amostra pequena de pacientes. A importância dos resultados encontrados, i.e., o fato de existir uma proteína de alto peso molecular que pode ser mais imunogênica, nos levou a desenhar o presente estudo visando validar estes achados, utilizando-se os soros de 24 pacientes com lacaziose.

3.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta humoral a antígenos de *Lacazia loboi* utilizando soros de pacientes com lacaziose e soros de camundongos experimentalmente infectados pelo mesmo fungo.

3.2 Objetivos específicos

1. Confirmar a presença de proteínas potencialmente imunogênicas expressadas por células leveduriformes de *L. loboi*, especialmente o imunógeno de 193kDa pelo seu reconhecimento por anticorpos nos soros utilizados.
2. Confirmar a presença da proteína homóloga da gp43 de *P. brasiliensis*, expressada por células leveduriformes de *L. loboi*, pela sua detecção por anticorpos em soros de pacientes e camundongos com lacaziose.
3. Identificar frações antigênicas comuns entre *P. brasiliensis* e *L. loboi* detectadas pelos soros de pacientes com paracoccidiodomicose ou lacaziose.

Pacientes

Foram utilizados neste estudo soros de 24 pacientes com lacaziose, coletados e armazenados a uma temperatura de -80 graus, cedidos pelo Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru. Os pacientes eram provenientes do estado do Acre, Brasil. O diagnóstico dos doentes baseou-se nos aspectos clínicos das lesões cutâneas e no diagnóstico histopatológico das mesmas. Os pacientes com lacaziose apresentavam lesões típicas queloidiformes em diferentes áreas do corpo (figuras 1 a 6) há mais de dois anos. Alguns desses pacientes foram tratados posteriormente com remoção cirúrgica das lesões.

Participaram ainda deste estudo cinco pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de paracoccidioidomicose examinados pelo corpo clínico do Instituto Superior de Medicina e Dermatologia, Minas Gerais, sendo dois procedentes de São Paulo e três de Minas Gerais. Todos do sexo masculino com média de idade de 48 anos.

Como grupo controle participaram cinco adultos saudáveis, funcionários do Instituto Superior de Medicina e Dermatologia, com média de idade semelhante à dos pacientes.

O Comitê de Ética em pesquisa médica da Universidade Federal de Minas Gerais emitiu parecer favorável à realização deste estudo e a inclusão dos pacientes e do grupo controle nele esteve vinculada a consentimento prévio dos mesmos.

FIGURA 1 - Lesão em indicador E, nódulos endurecidos queloidiformes, com pequena área de ulceração.



FIGURA 2 - Forma disseminada da doença em membros inferiores



Foto cedida pelo Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo.

FIGURA 3 - Lesões típicas queloidiformes em perna D



Foto cedida pelo Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo.

FIGURA 4 - Forma localizada da doença em pavilhão e lobo de orelha.



Foto cedida pelo Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo.

FIGURA 5 - Lesão tipo placa infiltrada com 30 anos de evolução em panturrilha.



Foto cedida pelo Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo.

FIGURA 6 - Placa formada pela confluência de pápulas e nódulos queloidiformes em região anterior de perna D.



Foto cedida pelo Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo.

Histopatologicamente as lesões dos pacientes com lacaziose mostravam infiltrado granulomatoso multifocal com reação histiocitária difusa e grande número de células gigantes tipo corpo estranho e Langhans, com a presença de células leveduriformes compatíveis com *L. loboi* livres ou no interior destas células gigantes (figura 7). A coloração pela prata confirmou a presença de células leveduriformes de *L. loboi* dispostas em cadeias (figura 8).

FIGURA 7 - Exame histopatológico de lesão queloidiforme de paciente com lacaziose. Coloração pelo HE. Aumento de 40X.

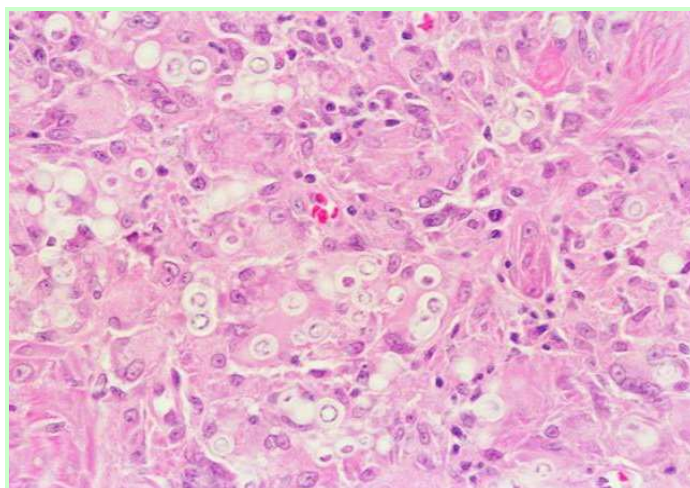


Foto cedida pelo Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo.

FIGURA 8 - Exame histopatológico de lesão queloidiforme de um paciente com lacaziose. Coloração pela prata. Aumento de 40X. Observa-se disposição das células leveduriformes em cadeias.

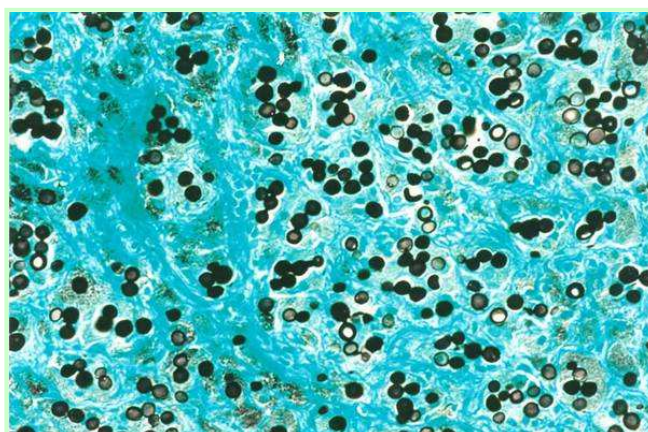


Foto cedida pelo Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo.

Camundongos

Os soros de seis camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *L. loboi* foram coletados após seis meses da inoculação e armazenados a uma temperatura de -80 graus. Soros de nove camundongos não infectados foram utilizados como controles. O diagnóstico da lacaziose nos camundongos também se baseou nos aspectos clínicos das lesões cutâneas e no diagnóstico histopatológico das mesmas.

Antígenos

Células leveduriformes de *L. loboi* foram obtidas dos coxins traseiros de camundongos previamente infectados após seis meses de inoculação, como realizado por Belone e colaboradores, em 2001. A lacaziose reproduzida em camundongos BALB/c foi a fonte de antígenos utilizada neste estudo, em uma cooperação com o Instituto Lauro de Souza Lima de Bauru, São Paulo.

O tecido subcutâneo do coxim traseiro destes animais é o sítio preferencial de inoculação de extrato de leveduras, preparados a partir de fragmentos de biópsia retirados de lesões de pacientes infectados com *L. loboi* (essa fase experimental realizou-se nas instalações do Instituto Lauro de Souza Lima, em Bauru, pela equipe responsável pelo biotério). No local da inoculação pôde-se observar multiplicação do parasito.

A morfologia, assim como a resposta inflamatória, a viabilidade do fungo e sua proliferação foram avaliadas antes de se utilizar essas lesões como fonte de antígenos, pois, foi necessário constatar a viabilidade das leveduras isoladas neste local. As células fúngicas viáveis podem ser detectadas a partir de 60 dias após a inoculação.

Essa técnica consistiu na obtenção de lesões de pacientes infectados com lacaziose, com diagnósticos comprovados laboratorialmente. Fragmentos destas lesões foram macerados e homogeneizados com solução salina esterilizada a 0,85%. Avaliou-se a

concentração de células fúngicas com o auxílio de câmara de Neubauer. Determinou-se a viabilidade das células fúngicas pela técnica de acetato de fluoresceína e brometo de etídio, de acordo com a técnica proposta por Vilani-Moreno & Opromolla (1997).

A amostra fresca da suspensão foi homogeneizada, contada na câmara de Neubauer e quantitativamente ajustada para que a contagem de células adquirisse $1,8 \times 10^6$ células/ml. O inóculo utilizado na infecção experimental dos camundongos contava com 30% de viabilidade de suas células. Os camundongos utilizados tinham oito semanas de vida e pertenciam ao laboratório do Instituto Lauro de Souza Lima. Inoculou-se na derme de ambas as patas traseiras $7,8 \times 10^4$ células fúngicas o que corresponde a 0,03ml da suspensão fúngica preparada anteriormente (figura 9). Os animais foram mantidos entre 22 a 25°C; eles receberam água e alimentos adequados.

Após seis meses de inoculação a maioria dos animais apresentou lesões exuberantes (figuras 10 a 12), com infiltrado constituído por histiócitos, células gigantes, do tipo corpo estranho e tipo Langhans e grande quantidade de fungos, na sua maior parte, viáveis.

Uma vez sacrificados os camundongos, as lesões de ambos os coxins traseiros foram retiradas cirurgicamente, divididas em pequenos pedaços e maceradas em macerador de vidro com 5ml de solução salina estéril. Todas as suspensões foram preparadas em condições estéreis. Filtrou-se a suspensão fúngica em gaze para eliminar os detritos.

FIGURA 9 - Inoculação intradérmica de células leveduriformes de *L. lobo* em camundongos desenvolvida no Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, para a futura extração de antígenos em modelo animal.



Foto cedida pelo Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo.

FIGURA 10 - Camundongo BALB/c experimentalmente infectado com *Lacazia lobo*, seis meses após a inoculação.



Foto cedida pelo Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo.

FIGURA 11 - Detalhe do coxim traseiro do camundongo BALB/c infectado experimentalmente com formação de lesão queloidiforme similar a infecção humana.



Foto cedida pelo Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo.

FIGURA 12 - Lesões em ambas as patas traseiras em camundongo experimentalmente infectado com *Lacazia loboi*.



Foto cedida pelo Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo.

Preparação da extração da proteína de *Lacazia loboi*

Obteve-se a suspensão de células leveduriformes de *L. loboi* conforme descrição prévia (BELONE et al., 2001). Centrifugaram-se as células de *L. loboi* por dez minutos a 3000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Lavaram-se as células, duas vezes, com solução salina e finalmente o pellet foi ressuspenso com 1ml de salina estéril. As células fúngicas, congeladas com nitrogênio líquido, foram maceradas até virarem um pó fino com auxílio de um gral. Transferiu-se o material estéril para tubo de 15ml que depois foi ressuspenso com 2ml de tampão estéril de fosfato. Determinou-se o conteúdo protéico total e dividiram-se os antígenos que foram mantidos a -20°C.

Purificação da proteína gp43 de *P. brasiliensis*

Para isolar a proteína gp43 de *P. brasiliensis* utilizou-se o Pb18. O crescimento das células leveduriformes ocorreu em Sabouraud - Dextrose (Sanofi, France) mantido entre 35 a 37°C. Após cinco dias as colônias foram então transferidas para Erlenmeyer com 50ml de UBA (6,1g extrato de levedura [Oxoid, England], 16,1g dextrose, 15g caseína peptona [Oxoid], 0,31g K₂HPO₄, 0,12g MgSO₄.7H₂O, 0,006g MnSO₄.H₂O, 0,006g NaCl, 0,006g FeSO₄, para um litro de água destilada). Incubadas a 37°C por três dias em agitação. Transferiu-se a cultura para o Fernblach flash com 500ml de UBA e as células leveduriformes permaneceram em crescimento por 7 a 10 dias em agitação. Inativaram-se as leveduras com 0,2g/l de timerosal (Sigma, St. Louis) e coletou-se posteriormente o fluido sobrenadante (concentrado de exoantígeno) com papel de filtro. Concentrou-se o exoantígeno em Amicon com jato de nitrogênio utilizando membrana Y-10 (Millipore). Avaliou-se o conteúdo protéico da solução final por SDS-PAGE e tintura de prata.

A glicoproteína gp43 de *P. brasiliensis* foi purificada do concentrado de exoantígeno, depois de ser centrifugada por 10.000 rpm por 20 minutos. Aplicou-se a solução final em uma coluna de CNBr-4B aderida a anticorpos monoclonais de gp43 17c (doada por L.Travassos, UNIFESP) por cromatografia de afinidade.

A solução foi aplicada lentamente e depois que se colocou todo o volume, lavou-se a coluna dez vezes com salina fosfatada tamponada (pH 7.4). Eluiu-se a gp43 com

cinco vezes o volume da coluna com uma solução de 0,1 M HCL-glicina, pH 2.8 e uma fração de 1ml foi coletada e imediatamente neutralizada com 100 μ l de solução de 1 M Tris, pH 9. Examinaram-se as frações em comprimento de onda de 280nm e aquelas superiores a esta absorbância foram homogeneizadas. Dializou-se a solução contra 0,15 M PBS (pH 7,4) e concentrou-se em Amicon a 4°C em jato de nitrogênio utilizando membrana Y-10. Avaliaram-se a pureza da gp43 por SDS-PAGE e tintura de prata.

Western blotting

1. Preparo do gel de poliacrilamida

Gel 1: Preparado na concentração de 12%

Reagentes:

1.5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5ml
10% de SDS	100ml
30% de Acrilamida/Bis-Stock	4ml
10% de APS (Persulfato de Amônio)	50 μ l
TEMED (para polimerizar da Bio-Rad)	5 μ l
Água destilada	3,35ml

Gel 2 . Para aplicar o marcador e a proteína.

Preparado na concentração de 4%

Reagentes:

0.5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5ml
10% de SDS	100ml
30% de Acrilamida/Bis-Stock	1,3ml
10% de APS (Persulfato de Amônio)	50 μ l
TEMED (para polimerizar da Bio-Rad)	10 μ l
Água destilada	6,1ml

Esperar 1 hora para que o gel polimerize.

Montar o aparelho (com o vidro e os espaçadores espessos). Encher com o gel com auxílio de um tubo de 50ml, lentamente, evitando a formação de bolhas. Colocar com pipeta de Pasteur o isopropanol e esperar polimerizar por uma hora.

2. Tampão para a corrida (concentrado 5 vezes)

Tris base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
Água destilada	1 ml pH 8,3 diluir 1x

3. Loemmlis 1X Tampão (Bio Rad)

Tris- Hcl, pH 6.8	2ml
10% (W/v) SDS	4ml
Glicerol	2ml
0,1% (W/V) azul de bromofenol	0,3 ml
2-mercaptanol	0,7 ml
Água destilada	1ml

Procedimentos:

1. Retirar do congelador 100 μ l de antígeno de *Lacazia* (colocar em Eperdoff em água fervendo por cinco minutos) para desfazer a estrutura primária e terciária da proteína.
2. No tubo tipo Eperdoff colocar 100 μ l do antígeno e 100 μ l de Loemmlis 1X
3. Centrifugar por cinco minutos para precipitar proteínas de alto peso
4. Retirar o pente e aplicar por trás: 5 μ l de marcador Bio - Rad 193kDa à 10kDa e a proteína (BioRad) e 100 μ l de antígeno e aplicar no espaço de pente entre o pente grande por trás, sem deixar bolhas.
5. Correr a 120V por 1 hora
6. Transferir o gel para a membrana de polifluoreto de vinilideno (PVDF) (BioRad, Hercules, CA, USA) conforme detalhamento a seguir:

Preparo do Tampão: (Transfer Buffer pH 8,3)

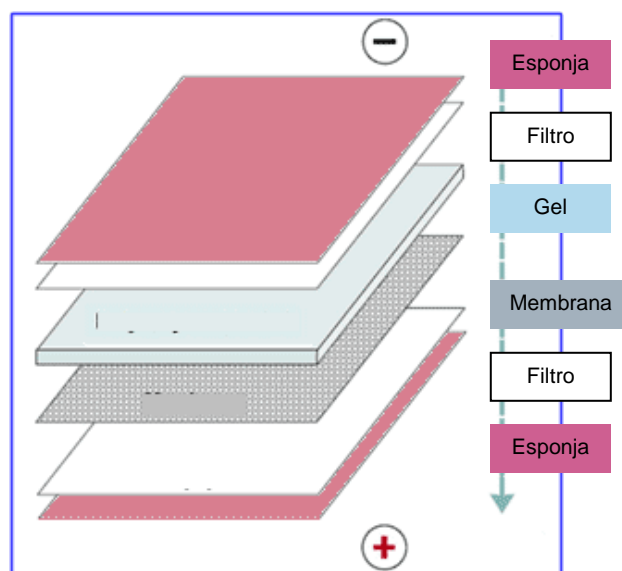
Tris base	9,075g
Glicina	3,2g
Metanol	600ml
Água destilada	2400ml

6.1 Em uma cuba de vidro colocar o tampão de transferência e um molde para preparação do “sanduíche”. Seguindo as seguintes camadas:

- a. Colocar sobre o molde a primeira esponja
- b. Colocar o papel de filtro
- c. Colocar o gel
- d. Colocar a membrana de Immun-Blot PVDF membranes (0,2 μ m) (BioRad, Hercules, CA, USA)
- e. Colocar novo papel de filtro (retirar as bolhas com auxílio de bastão de vidro)
- f. Colocar nova esponja
- g. Fechar o molde como um sanduíche (ver figura 13)

6.2 Transferir o molde para uma cuba de eletroforese e deixar durante a noite a 50V juntamente com um ímã; tomando o cuidado para que o gel fique no eletrodo negativo e a membrana no eletrodo positivo para facilitar a transferência da proteína para a membrana. Depois colocar a cuba em recipiente que contenha gelo de forma que esteja a cuba completamente circundada pelo gelo. Todo este conjunto deverá permanecer em uma placa imantanda que promova a agitação do ímã por toda a noite.

FIGURA 13 - Desenho esquemático do sanduíche utilizado para a transferência do gel para a membrana de PVDF (BioRad, Hercules, CA, USA) conforme detalhamento citado acima.



7. Após a transferência durante a noite, abrir o molde em uma cuba com tampão de transferência.

8. Utilizar um lápis para marcar na membrana as bordas do gel

9. Colocar o gel na solução de coloração Azul de Coomassie (BioRad, Hercules, CA, USA). Este procedimento visa a verificação da transferência protéica do gel para a membrana.

Coloração Azul de Coomassie (BioRad)

Coomassie Blue	0,1g
Metanol	40ml
Ácido acético	10ml
Água destilada	50ml

10. Enrolar a membrana em uma tela e deixar a 37°C por 1 hora e meia em agitação juntamente com uma solução PBS 10% de gelatina de (w/v) Tween 20 para bloquear

a membrana e evitar reações inespecíficas (472,5ml de PBS, pH 7.2; 20,25ml 10% Tween 20, 25ml de gelatina)

11. Lavar a membrana em três etapas

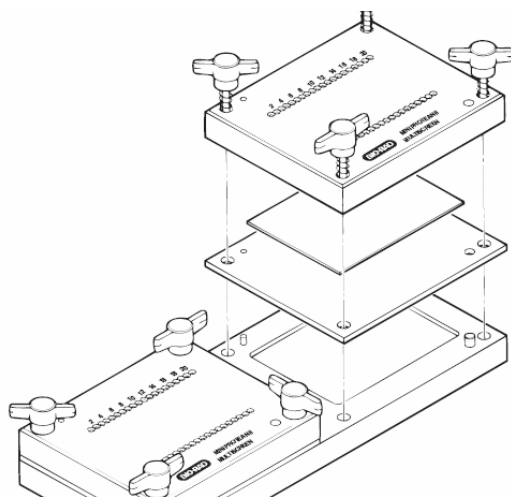
11.1. Solução A: Lavar uma vez. PBS - Tween (2,5ml 10%Tween 20, 500ml PBS, pH 7.2) Sendo que utilizamos 500ml da solução B para prepará-la.

11.2 Solução B: Lavar duas vezes. 0,01 M PBS, pH 7.2 (8,5g de NaCl; 1,07g de Na_2HPO_4 anidro; 0,39g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 1 litro de água destilada)

11.3 Solução C: Lavar duas vezes. 0,1 M Tris, pH 9.2 (6,05g Tris base; 500ml de água ajustada com 10NHCL para obter pH 9,2)

12. Colocar a membrana no aplicador de acrílico individualizado, Mini PII Multiscrn Apparatus (figura 14).

FIGURA 14 - Mini PII Multiscrn Apparatus: aparelho utilizado para facilitar o imunoblotting com os soros dos pacientes após a transferência do gel para a membrana.



13. Diluir o soro dos pacientes na proporção 1:250 (4 μ l + 1ml de 5% de gel block solução)

14. Aplicar em cada orifício soro de cada paciente e soro dos camundongos infectados subsequentemente. Deixar em agitação por 1 hora a 37°C (Lista de soros utilizados nas tabelas 1 e 2).

15. Lavar em três etapas: Cada orifício lavar como realizado na etapa 11 (1xA, 2xB e 2xC)

16. Colocar o soro conjugado com peroxidase (BioRad, Hercules, CA, USA). Conforme concentração a seguir:

16.1 75 μ l IgG antihumano marcado com peroxidase (IgG_(H+L)-HRP) (BioRad, Hercules, CA, USA) com 30ml de gelatina (50 μ l de Ac em 20ml de 5% gelatina solução de bloqueio)

16.2 25 μ l IgG antimouse marcado com peroxidase (IgG_(H+L)-HRP) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., USA) com 10ml de gelatina (50 μ l de Ac em 20ml de 5% gelatina solução de bloqueio)

17. Em cada orifício colocar a solução correspondente (humano ou camundongo), deixar por uma hora a temperatura ambiente.

18. Lavar cada orifício com solução A e solução B

19. Revelar a membrana utilizando kit BioRAD (BioRad, Hercules, CA, USA) da seguinte forma:

19.1 Transferir a membrana para uma cuba de vidro com 10ml do reagente A que está a -20°C

19.2 Transferir para outro recipiente com 45ml de água destilada e 5ml da solução de tampão concentrada 10X. Agitar lentamente.

19.3 Adicionar 300 μ l do reagente B

20. Registrar através de fotos ou por scanner de alta resolução.

Tabela 1. Listagem de soros de 24 pacientes com lacaziose, de cinco com paracoccidiodomicose e cinco voluntários controles de área não endêmica.

Soro de pacientes	Código no gel	Tipo de paciente	Procedência
LAOM	1	lacaziose	Acre, Brasil
MSB	2	lacaziose	Acre, Brasil
JSS	3	lacaziose	Acre, Brasil
MCM	4	lacaziose	Acre, Brasil
MCS	5	lacaziose	Acre, Brasil
MAS	6	lacaziose	Acre, Brasil
AMO	7	lacaziose	Acre, Brasil
FMS	8	lacaziose	Acre, Brasil
FAZ	9	lacaziose	Acre, Brasil
SFC	10	lacaziose	Acre, Brasil
DJS	11	lacaziose	Acre, Brasil
MCOS	12	lacaziose	Acre, Brasil
EAS	13	lacaziose	Acre, Brasil
FAM	14	lacaziose	Acre, Brasil
FFS	15	lacaziose	Acre, Brasil
MVS	16	lacaziose	Acre, Brasil
RFS	17	lacaziose	Acre, Brasil
MS	18	lacaziose	Acre, Brasil
RMS	19	lacaziose	Acre, Brasil
SGS	20	lacaziose	Acre, Brasil
VPB	21	lacaziose	Acre, Brasil
SPS	22	lacaziose	Acre, Brasil
FTS	23	lacaziose	Acre, Brasil
MJS	24	lacaziose	Acre, Brasil
FMM	Pb	Paracoccidiodomicose	Minas Gerais, Brasil
WLS	Pb2	Paracoccidiodomicose	Minas Gerais, Brasil
VBC	Pb3	Paracoccidiodomicose	Minas Gerais, Brasil
JCS	Pb4	Paracoccidiodomicose	São Paulo, Brasil
ACS	Pb5	Paracoccidiodomicose	São Paulo, Brasil
RLM	30	Controle	Minas Gerais, Brasil
RV	31	Controle	Minas Gerais, Brasil
ALLM	32	Controle	Minas Gerais, Brasil
RVRV	33	Controle	Minas Gerais, Brasil
SCM	34	Controle	Minas Gerais, Brasil

Tabela 2. Listagem de soros de seis camundongos BALB/c experimentalmente infectados com células leveduriformes de *L. loboi* e de nove camundongos controles.

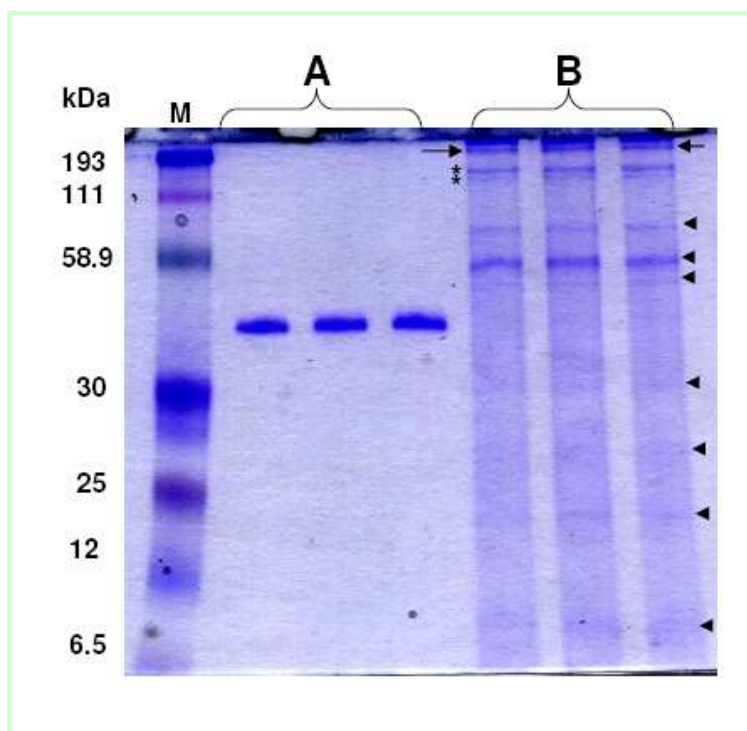
Soro de camundongos	Código no gel	Tipo de paciente	Procedência
P2	1	Lacaziose experimental	São Paulo, Brasil
A	2	Lacaziose experimental	São Paulo, Brasil
FAV	3	Lacaziose experimental	São Paulo, Brasil
S2	4	Lacaziose experimental	São Paulo, Brasil
V	5	Lacaziose experimental	São Paulo, Brasil
JLP	6	Lacaziose experimental	São Paulo, Brasil
C1	7	Controle	São Paulo, Brasil
C2	8	Controle	São Paulo, Brasil
C3	9	Controle	São Paulo, Brasil
C4	10	Controle	São Paulo, Brasil
C5	11	Controle	São Paulo, Brasil
C6	12	Controle	São Paulo, Brasil
C7	13	Controle	São Paulo, Brasil
C8	14	Controle	São Paulo, Brasil
C9	15	Controle	São Paulo, Brasil

Perfil protéico do extrato de células leveduriformes de *L. loboi* e da proteína gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio para eletroforese de proteínas (SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

A concentração de proteínas identificadas no extrato de *L. loboi* e da gp43 de *P. brasiliensis* foi determinada através de eletroforese de proteínas com utilização de SDS-PAGE (ver figura 15).

Quando o extrato de *L. loboi* obtido de camundongos experimentalmente infectados foi submetido à eletroforese de proteínas observou-se pelo menos dez bandas proeminentes que vão de ~9 a ~193 kDa de peso molecular (figura 15 B). Este extrato protéico não mostra uma banda visível em 43kDa de peso molecular. Já a proteína purificada gp43 de *P. brasiliensis* mostra uma banda forte na altura do peso molecular esperado e não contém outras proteínas (figura 15 A).

FIGURA 15 – Gel de poliacrilamida para eletroforese de proteína com coloração Azul de Coomassie em forma triplicada. Visualizamos a gp43 de *P.brasiliensis* (A) e o perfil protéico do extrato de *L. loboi* (B). Além da proteína imunodominante de ~193kDa são visualizadas outras proteínas no extrato de *L. loboi* (B) indicadas pelas setas pretas. M = marcação de peso molecular.



Análise por imunoblotting

As membranas com as proteínas, após a reação com os soros dos pacientes, foram reveladas seguindo as recomendações dos fabricantes e então lavadas em tempos diferentes.

As membranas que reagiram com soros de pacientes com lacaziose e de camundongos experimentalmente infectados levaram de 20 segundos a seis minutos para terem imunógenos detectados.

Os anticorpos IgG no soro de todos os 24 pacientes com lacaziose identificaram a proteína gp43 de *P. brasiliensis* (figura 16). Os soros dos pacientes com paracoccidiodomicose também identificaram claramente essa proteína, mas os soros de números 3, 6, 7, 13, 15, 16 e Pbs foram os que detectaram mais fortemente a proteína gp43 de *P. brasiliensis*. Todos os soros de pacientes (com lacaziose ou paracoccidiodomicose) apresentavam anticorpos que detectaram um antígeno imunodominante de ~193kDa no extrato protéico de *L. loboi* (figuras 17 e 18). Com o extrato protéico de *L. loboi* foram visualizadas também reações mais fracas com outros antígenos imunogênicos que vão de 12 a 175kDa de peso molecular (figura 17).

A banda imunodominante de ~193kDa foi visível na membrana em menos de 40 segundos, enquanto outras proteínas de baixo peso molecular de antígenos de *L. loboi*, incluindo as de 108kDa, 57kDa, 50kDa, e a gp43 de *P. brasiliensis*, demoraram pelo menos três minutos para aparecerem.

A IgG em seis soros dos camundongos experimentalmente infectados detectaram fracamente a proteína gp43 de *P. brasiliensis* (dado não mostrado). Os anticorpos dos camundongos detectaram fortemente antígenos de alto peso molecular que vão de 120kDa a 193kDa no extrato protéico de *L. loboi*, incluindo forte reação contra o antígeno imunodominante de ~193kDa, o que formou banda compactada na imagem (figura 19). Estes antígenos de maior peso molecular foram detectados em menos de 40 segundos. Os outros antígenos foram detectados dois ou três minutos após, incluindo os que vão de 17kDa a 118kDa de peso molecular.

Os anticorpos do soro 15 detectaram fracamente cinco outros imunógenos (marcados com asteriscos) incluindo um de ~48kDa não detectado por outro soro (figura 17). Os soros dos cinco voluntários controles e dos nove camundongos controles não reagiram com os antígenos utilizados neste estudo (figura 19).

FIGURA 16 - Reação de 17 soros de pacientes com lacaziose contra a gp43 purificada de *Paracoccidioides brasiliensis* e de um paciente com paracoccidioidomicose. As setas sobre cada um dos soros testados mostram que alguns pacientes detectam essa proteína com maior intensidade do que outros pacientes. Interessante é observar que estes mesmos soros reconheceram além da fração imunodominante de ~193kDa outros antígenos não detectados pela maioria dos soros (figura 17).

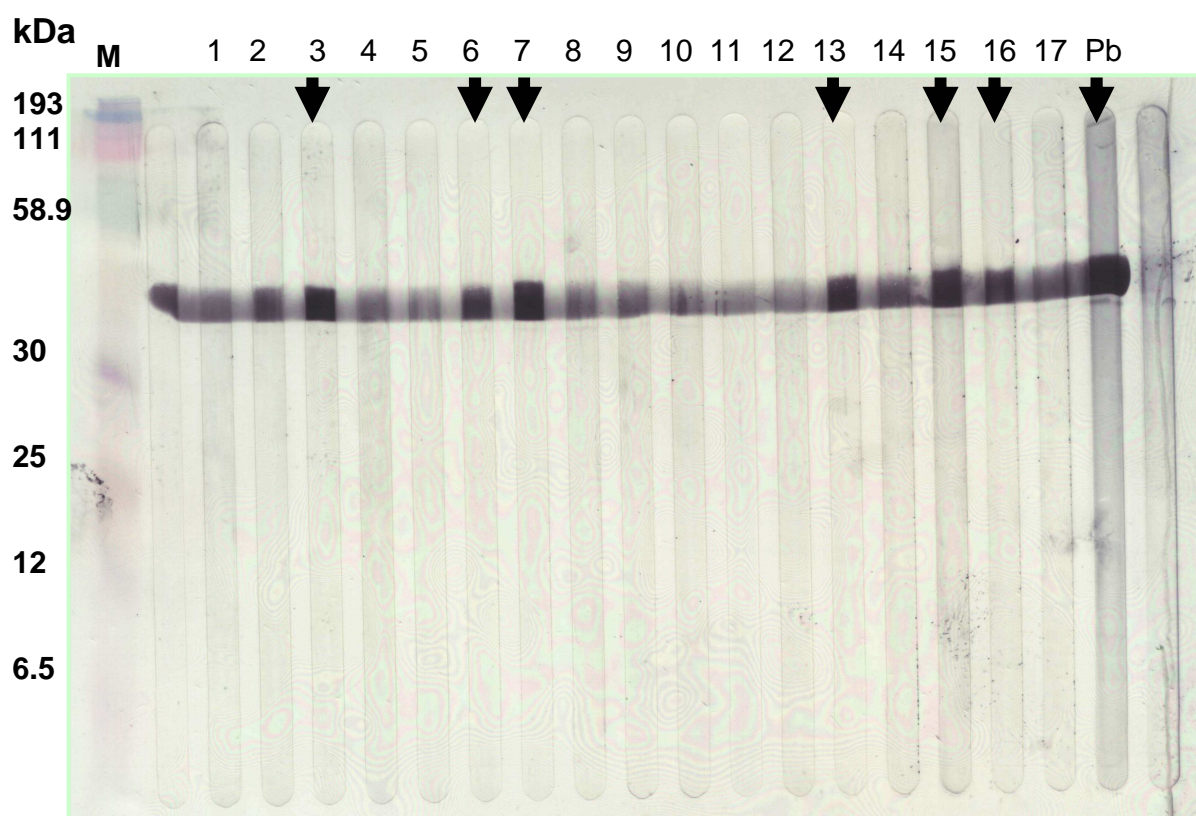


FIGURA 17 –Reação de 17 dos 24 soros de humanos com lacaziose testados e um controle (C) usando proteínas extraídas das leveduras de *Lacazia loboi* em análise por Western blot. O antígeno imunodominante de ~193kDa está marcado com uma seta vermelha. Outros antígenos menos proeminentes também foram reconhecidos por alguns dos soros testados. Estes antígenos estão sinalizados com asteriscos do lado direito dos mesmos. A linha pontilhada mostra a localização da molécula da gp43. Nota-se que está ausente em todos os soros com lacaziose. Pb: soro de paciente com paracoccidioidomicose.

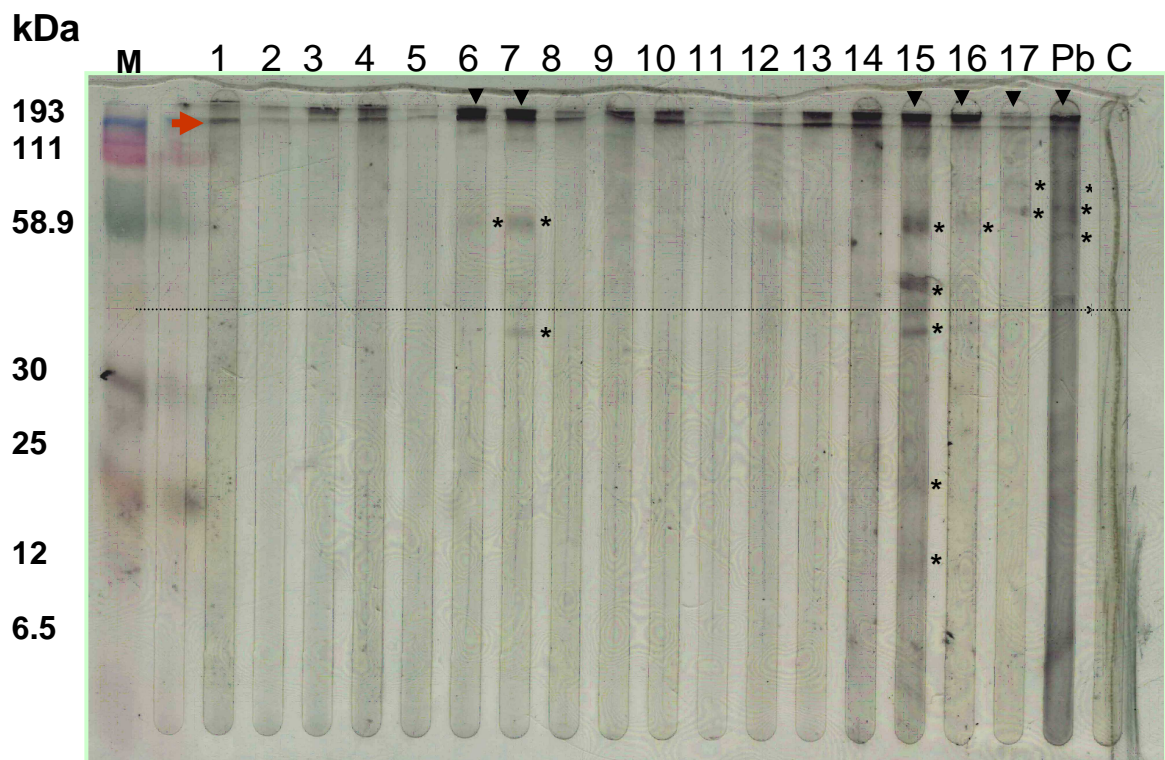


FIGURA 18 – Reação de sete dos 24 soros de humanos com lacaziose testados usando proteínas extraídas das leveduras de *Lacazia loboi* em análise por Western blot e de quatro dos cinco pacientes com paracoccidioidomicose. O antígeno imunodominante de ~193kDa está presente em todos os soros. Observa-se a pequena importância da gp43 quando comparada com o antígeno de ~193kDa nos soros de pacientes com lacaziose, sendo detectada apenas nos soros de pacientes com paracoccidioidomicose.

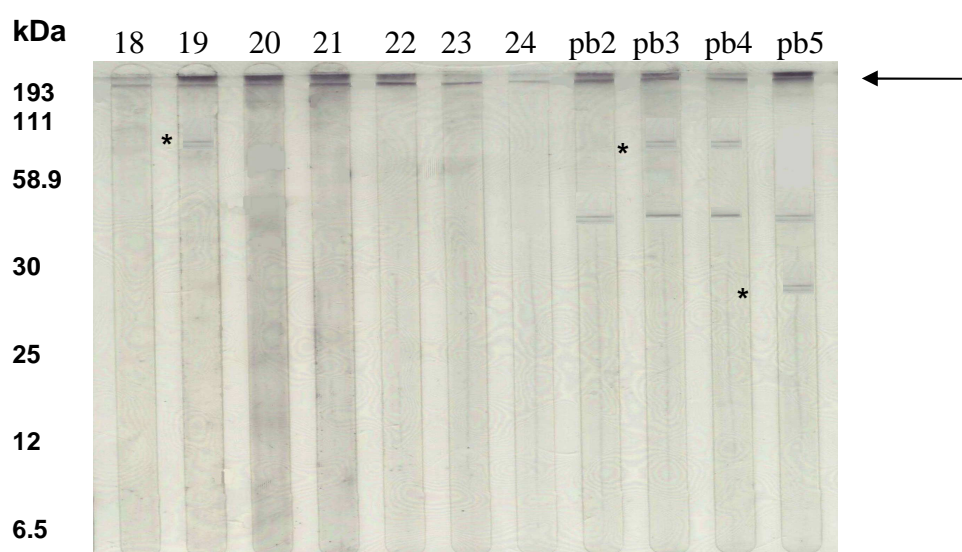
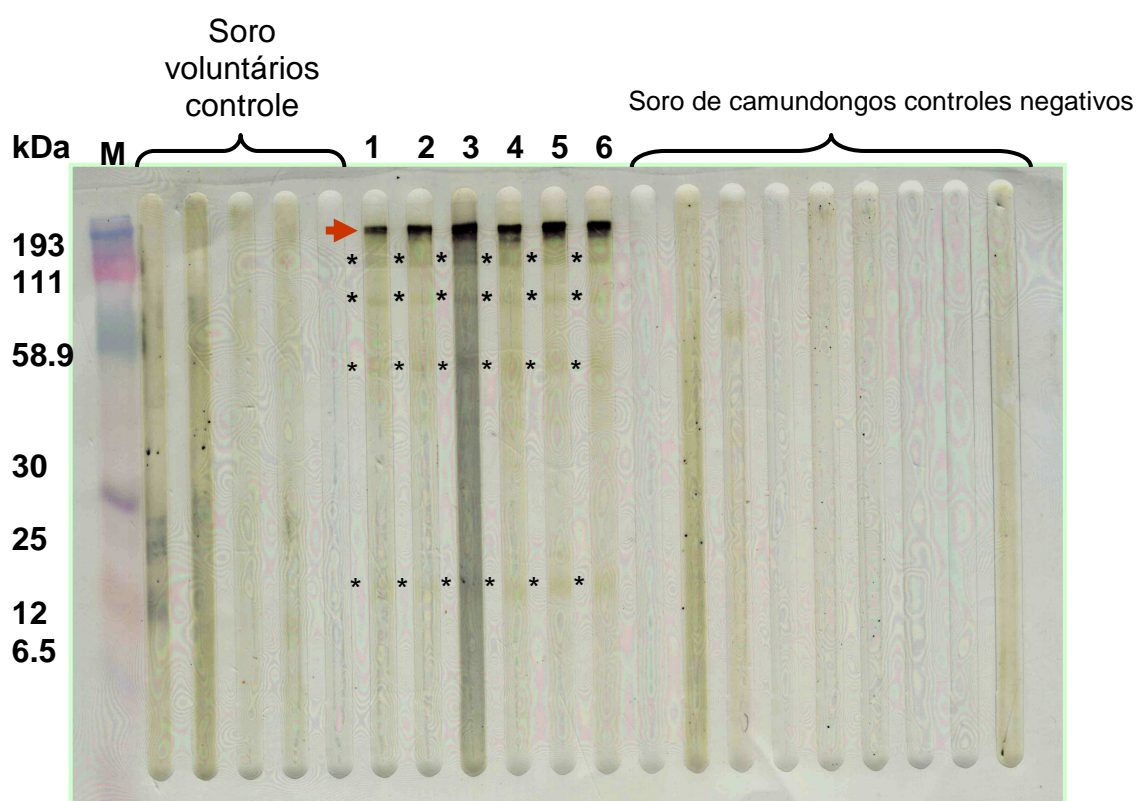


FIGURA 19 – Reação de seis soros de camundongos experimentalmente inoculados com *Lacazia loboi* contra antígenos de *L. loboi* extraídos de células leveduriformes e analisados por Western blot (linha 1 a 6). A figura também mostra nove soros de camundongos saudáveis e cinco soros de humanos de zonas não endêmicas. Os soros de camundongos reconhecem fortemente o antígeno imunodominante de ~193kDa, assim como outros antígenos detectados menos intensamente (asteriscos).



Um antígeno de alto peso molecular (~193kDa) foi identificado por anticorpos em 100% dos soros de pacientes com lacaziose e de camundongos infectados experimentalmente com células leveduriformes de *L. loboi*. A gp43 de *P. brasiliensis* purificada foi identificada por anticorpos nos soros dos pacientes com lacaziose e dos pacientes com paracoccidioidomicose, sendo a reação mais intensa em alguns soros que em outros. A proteína de *L. loboi* homóloga da gp43 de *P. brasiliensis* não foi identificada com a utilização de extratos antigênicos de *L. loboi* nos soros de pacientes com lacaziose, mas, apenas nos soros dos pacientes com paracoccidioidomicose. Os antígenos de 193kDa, 108kDa e a gp43 foram reconhecidos por anticorpos nos soros dos pacientes com paracoccidioidomicose e dos pacientes com lacaziose, sendo comuns às duas doenças. Existe diferença de resultados nos trabalhos que utilizaram antígenos de *P. brasiliensis* frente aos que utilizaram antígenos próprios de *L. loboi* na avaliação da resposta humoral de pacientes com lacaziose.

Este estudo revelou que o antígeno que parece ser mais regularmente expressado nas células leveduriformes de *L. loboi* durante a infecção não é a gp43 como na paracoccidioidomicose, mas um imunógeno de ~193kDa. Essa proteína imunodominante de alto peso molecular foi fortemente e igualmente detectada no soro de todos os pacientes com lacaziose e paracoccidioidomicose testados e no soro de camundongos infectados experimentalmente com *L. loboi*. Tal fato confirma os achados de Mendonza e colaboradores (MENDOZA et al., 2008) que também já haviam identificado essa proteína em número menor de casos.

Observou-se a identificação da gp43 de *P. brasiliensis* purificada no Western blot de todos os soros de pacientes com lacaziose testados, bem como nos soros dos pacientes com paracoccidioidomicose. Isso está de acordo com os resultados de estudos prévios não só por Western Blot, mas também por ELISA (BAHAWAN et al, 1976; CAMARGO et al, 1998; LANDMAN et al, 1988; MENDES-GIANNINI et al, 1984; PUCCIA et al, 1991).

Entretanto, quando utilizados antígenos de *L. loboi* extraídos do macerado das lesões das patas dos camundongos a proteína homóloga gp43-símile não foi identificada

pelos anticorpos nos soros dos pacientes com lacaziose. Isso sugere que a homóloga da proteína imunodominante gp43 de *P. brasiliensis* em *L. loboi* não seja tão imunogênica como a de *P. brasiliensis* propriamente dita, contrariando a importância a ela atribuída anteriormente (MENDOZA et al., 2001; MENDOZA & SILVA, 2004). Outra possibilidade é que essa proteína seja, na verdade, um exoantígeno, sendo frequentemente excretada e não presente durante todo o tempo. Como o fungo *L. loboi* não é cultivável, no trabalho utilizamos macerado de antígeno, o que, por limitação da técnica, pode ter dificultado a identificação do antígeno.

Como visto acima, a homóloga da gp43-símile foi identificada, mesmo que fracamente, quando utilizamos os soros dos pacientes com paracoccidiodomicose. Dado similar foi encontrado no trabalho de Mendoza e colaboradores (MENDOZA et al., 2008), onde a banda visualizada no Western blot foi até mais intensa que no presente estudo. Existe a possibilidade de esta proteína ser um exoantígeno expressado na passagem do retículo endoplasmático para o exterior das células de *L. loboi* e presente em apenas menores quantidades no interior das células leveduriformes. Desta forma, é possível que pequenas quantidades deste exoantígeno presentes no material fossem detectadas pela grande quantidade de anticorpos séricos nos pacientes com paracoccidiodomicose. Por outro lado, nos pacientes com lacaziose a quantidade de anticorpos anti-gp43-símile deve ser menor, pois não conseguimos encontrá-los no Western blot. Os anticorpos séricos dos pacientes com paracoccidiodomicose podem reconhecer essa proteína e produzir reação cruzada com sua homóloga (gp43), cuja importância já foi bem estabelecida nesta doença por outros autores (CAMARGO et al., 1998; MENDES-GIANNINI et al., 1984; PUCCIA et al., 1986; PUCCIA & TRAVASSOS, 1991; TRAVASSOS et al., 1995). Já os anticorpos séricos dos pacientes com lacaziose e também anticorpos nos soros dos camundongos infectados não reagem a sua presença, sugerindo que na lacaziose outros antígenos são mais imunogênicos.

Em alguns soros de pacientes com lacaziose estudados, houve reações mais fortes à gp43 purificada de *P. brasiliensis* que em outros (soros 3, 6, 7, 13, 15 e 16). Isso pode sugerir a possibilidade de estes pacientes terem tido contato no passado com *P. brasiliensis*, sem a manifestação de doença. Apesar de nenhum paciente ter diagnóstico de paracoccidiodomicose e também não ser de área endêmica dessa

doença, não se pode descartar a possibilidade de um contato prévio com esse patógeno, em viagem para área endêmica de paracoccidioomicose, ou mesmo infecção subclínica.

O imunógeno de ~ 193kDa, a gp43 purificada e uma proteína de 108kDa foram reconhecidos por anticorpos no soro de pacientes com paracoccidioomicose e lacaziose sendo comuns às duas doenças. A presença de reação cruzada frente a alguns antígenos no soro de pacientes com lacaziose e paracoccidioomicose já foi descrita anteriormente em relação à gp43 e outros antígenos, mas não em relação ao antígeno de alto peso molecular identificado aqui (~193kDa) (BAHAWAN et al., 1976; CAMARGO et al., 1998; LANDMAN et al., 1988; PUCCIA et al., 1991; SILVA et al., 1968; TABORDA et al., 1993; VIDAL et al., 1997). Ela é esperada, uma vez que estes fungos estão filogeneticamente próximos e, portanto, apresentam ancestral comum (HERR et al., 2001; MENDOZA et al., 2005; VILELA et al., 2005). Os soros dos pacientes com paracoccidioomicose identificaram não apenas a homóloga da gp43 de *P. brasiliensis* em *L. loboi*, mas também seis outros antígenos dos 12 já relatados por Camargo e colaboradores, em 1998, e por e Vidal e colaboradores (1997) em estudos anteriores. Já os soros dos pacientes e camundongos com lacaziose, no presente estudo, não identificaram os antígenos de diferentes pesos moleculares descritos por Camargo e colaboradores (1998), mas, apenas o antígeno de 108kDa. Este pode ser o mesmo descrito por Camargo e colaboradores, o que sugere, ser este antígeno expressado tanto na paracoccidioomicose quanto na lacaziose.

Outros antígenos identificados neste trabalho (de 12 a 175kDa) foram similares aos encontrados no trabalho de Mendoza e colaboradores (MENDOZA et al., 2008) e diferentes dos encontrados no trabalho de Camargo e colaboradores (1998). Isso reforça a importância, sugerida anteriormente, sobre a utilização de antígenos do próprio agente da lacaziose nos estudos sobre imunologia desta doença. Este estudo indica que o uso de proteínas do *P. brasiliensis* pode resultar na identificação de imunógenos que não correspondem à realidade antigênica do *L. loboi*.

Desta forma, estudos com antígenos de *P. brasiliensis* são válidos na determinação de possíveis reações cruzadas entre fungos filogeneticamente próximos, mas pertencentes a gêneros diferentes. Entretanto, podem levar a falhas na interpretação

do estímulo imunológico verdadeiro que os antígenos próprios de *L. loboi* causam em pacientes com esta enfermidade.

Os resultados do presente estudo são similares aos encontrados por Mendoza e colaboradores (2008) e mostraram que durante a infecção, *L. loboi* expressa tipos diferentes de imunógenos em relação aos pacientes com paracoccidiodomicose. Diferente dos estudos sorológicos prévios que utilizaram antígenos de *P. brasiliensis* (BAHAWAN et al., 1976; RODRIGUEZ et al., 1984; VIDAL et al., 1997).

A descoberta da expressão de diferentes imunógenos na infecção por *L. loboi* em comparação a infecção por *P. brasiliensis* fornece subsídios para estudos anteriores (HERR et al., 2001; TABORDA et al., 1999; VILELA et al., 2005) mostrando que o agente da lacaziose pertence a um gênero diferente de fungo.

No presente estudo, não se testou soros de voluntários saudáveis de áreas endêmicas de lacaziose por não ser objetivo do mesmo. Isso seria importante para avaliar se a exposição prévia a estes fungos, mesmo sem infecção, é capaz de produzir reações cruzadas na análise por Western blotting; o que é muito provável. Mendoza e colaboradores (2008) demonstraram essa possibilidade em golfinhos. Uma vez que há alguns relatos de lacaziose em golfinhos (BOSSART, 1984; CALDWELL et al., 1975; DE VRIES & LAARMAN, 1973; HEEL, 1977; MIGAKI et al., 1971; REIF et al., 2006; SYMMERS, 1983; WOODARD, 1972), estes pesquisadores analisaram soros destes mamíferos que apresentavam lesões cutâneas clinicamente e histopatologicamente sugestivas de lacaziose e verificaram que eles apresentavam anticorpos contra os mesmos antígenos encontrados em soros humanos e de camundongos infectados. Um dos soros de controles negativos dos golfinhos reagiu positivamente à gp43 purificada de *P. brasiliensis* e também à proteína de ~193kDa encontrada nos antígenos de *L. loboi*. Esses achados indicam que a exposição prévia a esses fungos, mesmo sem desenvolvimento de doença, deve produzir reações cruzadas, fato também observado em infecções com outros fungos dimórficos (LANDMAN et al., 1988; MENDES-GIANNINI et al., 1984; NORTON, 2006). Se encontrássemos o mesmo padrão nos soros de pacientes saudáveis de áreas endêmicas poderíamos usar a reação de Western blot como importante ferramenta nos estudos epidemiológicos sobre *L. loboi*.

É possível ponderar, ainda, que a proteína imonodominante gp43 de *P. brasiliensis* pode apresentar homologias com a proteína de alto peso molecular de ~193kDa de *L. loboi* relatada aqui. A caracterização molecular dos antígenos identificados, especialmente a proteína de ~193kDa, pode ser importante para o desenvolvimento de novos tratamentos, imunoterapia e testes diagnósticos para lacaziose.

1. Um antígeno de alto peso molecular (~193kDa) foi consistentemente identificado por anticorpos nos soros dos pacientes com lacaziose e também dos camundongos infectados experimentalmente com células leveduriformes de *L. loboi*.
2. A gp43 de *P. brasiliensis* purificada foi reconhecida pelos anticorpos nos soros de todos os pacientes com lacaziose, o que sugere a possibilidade de ocorrerem reações cruzadas com *L. loboi* pela proximidade filogenética dos dois fungos e homologias entre proteínas similares.
3. Na utilização de frações antigênicas de *L. loboi*, a proteína de *L. loboi* homóloga da gp43 de *P. brasiliensis* não foi reconhecida pelos anticorpos séricos de pacientes com lacaziose. Este achado nos induz a concluir que na lacaziose, ao contrário do que ocorre na paracoccidioomicose, essa proteína apresenta menor importância imunológica *in vivo*.
4. Alguns soros de pacientes com lacaziose reagiram fortemente à gp43 de *P. brasiliensis* purificada, o que pode indicar a presença de co-infecção paracoccidioomicose/lacaziose em alguns pacientes ou diferença de cepas infectantes.
5. A utilização de antígenos próprios de *L. loboi* para avaliação da resposta imune humoral dos pacientes com lacaziose mostrou-se importante, pois existem diferenças entre as proteínas imunodominantes identificadas em *L. loboi*.
6. A diferença de resposta nos soros de pacientes com lacaziose e paracoccidioomicose reforça mais uma vez o conceito de que este agente possui características filogenéticas próprias que permitem que este fungo seja classificado em seu próprio gênero.
7. A concentração do gel utilizada neste trabalho e a técnica realizada não permitiram a identificação de proteínas antigênicas com peso molecular mais alto que ~193kDa.

1. Realizar o mesmo estudo utilizando soro de voluntários aparentemente saudáveis das áreas endêmicas de leishmaniose e soros de pacientes com outras doenças endêmicas como outras infecções fúngicas, esquistossomose, hanseníase, tuberculose e malária.
2. Realizar novo estudo com modificação na concentração do gel de acrilamida e técnica utilizada permitindo a identificação de outras proteínas imunogênicas com pesos moleculares mais altos que podem estar comprimidas em uma banda única de ~193kDa identificada neste trabalho.
3. A caracterização molecular da proteína de ~193kDa deve ser o próximo passo. A clonagem, o sequenciamento e a purificação da proteína de ~193kDa pode contribuir para um novo entendimento da epidemiologia, imunologia, e outros aspectos da infecção causada por *L. loboi* em humanos e golfinhos.

ALMEIDA, F. P. Blastomyces e Paracoccidioides. **An. Fac. Méd. S. Paulo.**, v. 22, p. 61-71, 1946.

ALMEIDA, F. P.; LACAZ, C.S. Blastomicíase. "Tipo Jorge Lobo". **Rev. Paul. Med.**, v. 24, p. 5-37, 1948/49.

ARÊA LEÃO, A. E.; GOTO, M.; CURY, A. Infecção experimental de animais pela "*Glenosporella lobo*" Fonseca & Leão, 1940. **Hospital (Rio de Janeiro)**, v. 33, p. 273-278, 1948.

AZULAY, R.D. Classification of cutaneous micoses. **An. Bras. Dermatol.**, v. 39, p. 1-9, 1964.

AZULAY R.D.; CARNEIRO, J.A.; ANDRADE, L.M.C. Blastomicose de Jorge Lobo. Contribuição ao estudo da etiologia, inoculação experimental, imunologia e patologia da doença. **An. Bras. Dermatol.**, v. 45, p. 47-66, 1970.

AZULAY R.D.; CARNEIRO, J.A.; ANDRADE, L.M.C. Lobo's blastomycosis: new experiments on culture, immunology and inoculation. **Dermatol. Int.** v. 8, p. 33-35, 1969.

AZULAY R.D.; CARNEIRO, J.A.; CUNHA, M.G.S.; REIS, L.T. Keloidal blastomycosis (Lobo's disease) with lymphatic involvement: a case report. **Int. J. Dermatol.**, v. 15, p. 40-42, 1976.

BAHAWAN, J., R.W. BAIN, D.T. PURTILO, N. GOMEZ, C. DEWAN, C.F. WHELAN, M. DOLORUM, L. EDELSTEIN. Lobomycosis. An electronmicroscopic, histochemical and immunologic study. **J. Cut. Pathol.**, v. 3, p. 5-16, 1976.

BARUZZI, R. G.; CASTRO, R. M.; D' ANDRETTA Jr., C.; CARVALHAI, S.; RAMOS, O. L.; PONTES, P. L. Occurrence of Lobos blastomycosis among "Caibi" Brazilians indians. **Int. J. Derm.**, v. 12, p. 95-98, 1973.

BARUZZI, R.G.; LACAZ, C.S.; SOUZA, F.A. História natural da doença de Jorge Lobo. Ocorrência entre os índios Caiabi (Brasil Central). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 21, n. 6, p. 303-338, 1979.

BARUZZI, R.G.; MARCOPITO, L. F.; MICHALANY, N. S.; LIVIANU, J.; PINTO, N. R. S. Early diagnosis and prompt treatment by surgery in Jorge Lobo is disease (Keloidal blastomycosis). **Mycopathologia.**, v. 74, p. 51-54, 1981.

BELONE, A.F.F., S. MADEIRA, P.S. ROSA, AND D.V.A. OPRMOLLA. Experimental reproduction of the Jorge Lobo's disease in BALB/c mice inoculated with *Lacazia loboi* obtained from a previously infected mouse. **Mycopathologia** v. 155, p. 191-194, 2001.

BORELLI, D. *Aspergillus*, sorpresas en micopatologia. **Bol. Venez. Lab. Clin.**, v. 3, n. 1, p. 47-48, 1958.

BORELLI, D. Lobomycosis experimental. **Dermatol Venez**, v.3, n.1, p. 72-82, 1961.

BORELLI, D. Lobomycosis nomenclatura de su agente (revisión crítica). **Med. Cutanea**, v.3, n.2, p. 151-156, 1968.

BOSSART, G.D. Suspected acquired immunodeficiency in an Atlantic bottle-nosed dolphin with chronic-active hepatitis and lobomycosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 185, n. 11, p. 1413-1414, 1984.

BOWMAN, B. J. W.; TAYLOR, J.W. Molecular evolution of the fungi: human pathogens. **Mol. Biol. Evol.**, v. 98, p. 519-523, 1992.

BOWMAN, B. J. W.; TAYLOR, J. W. Molecular phylogeny of pathogenic and non-pathogenic Onygenales, p. 169-178. In: D. R. Reynolds and J.W. Taylor (ed.), The fungal holomorf: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematic. **CAB International**, Wallingford, United Kingdom, 1993.

BRÉS, J.P. **La lobomycose** (a propos de 12 casos observées en Guyane Française) (Tese). Bordeaux: Unités d'Enseignement et de Recherche des Sciences Médicales de l'Université de Bourdeaux, 1978.

BURNS, R.A. Report of the first humam case of Lobomycosis in the United States. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p. 1283-1285, 2000.

CALDWELL, D.K.; CALDWELL, M.C.; WOODARD, J.C.; AJELLO, L.; KAPLAN, W.; McCLURE, H.M. Lobomycosis as a disease of the. Atlantic bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus Montagu*, 1821). **Amer. J. trop. Med. Hyg.**, v. 24, n. 1, p. 105-114, 1975.

CALICH, V.L.G.; KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course or *Paracoccidioidis brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 615-623, 1998.

CAMARGO, Z.P.; BARUZZI, R.G.; MAEDA, S.M.; FLORINO, M.C. Antigenic relationship between *Loboa lobo* and *Paracoccidioides brasiliensis* by serological methods. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 413-417, 1998.

CARNEIRO, J. A.; AZULAY, R. D.; ANDRADE, L. C. Micose de Jorge Lobo. Isolamento do parasito em cultura artificial. **Hospital (Rio de Janeiro)**, v. 73, p. 1151-1163, 1968.

CERRUTTI, H.; ZAMITH, V. A. Doença de Jorge Lobo. (Comunicação à Sociedade Paulista de Medicina em 1948)

CIFERRI, R.; AZEVEDO, P.C.; CAMPOS, S.; CARNEIRO, L.S. Taxonomy of Jorge Lobo's disease fungus. **Inst. Micol. Univ. Recife**, v. 53, p. 1-21, 1956.

CISALPINO, P.S.; PUCCIA, R.; YAMAUCHI, L.M.; CANO, M.I.N.; SILVEIRA, J.F.; TRAVASSOS, L.R. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Biol. Chem.** 271, p. 4553-4560, 1996.

CONANT, N. F.; HOWELL Jr., A. The similarity of the fungi causing South-American blastomycosis (paracoccidioidal granuloma) and North-American blastomycosis (Gilchrist's disease). **J. Invest. Derm.**, v. 5, p. 353-370, 1942.

CUSHION, M.T. *Pneumocystis*. In: Murray P.R, Baron, E.J., Jorgenesen J.H., Pfaller, M.A., and Tenover F.C. (eds), *Manual of Clinical Microbiology* (8th ed). **ASM Press**, Washington, D.C. pp.1712-1725, 2003.

DESTOMBES, P.; RAVISSE, P. Étude histologique de 2 cas guyanais de blastomycose chéloidienne (maladie de J. Lobo). **Bull. Soc. Path. Exot.** v. 57, p. 1018-1024, 1964.

DE VRIES, G.A.; LAARMAN, J.J. A case of Lobo's disease in the dolphin *Sotalia guianensis*. **J. Aquat. Mammals.**, v. 1, n. 1, p. 26-33, 1973.

ESTERRE, P. et al. Étude immunohistochimique de la lésion cutanée de lobomycose. **J. Mycol. Méd.** v.1, p. 276-283, 1991.

FAVA NETTO, C.; RAPHAEL, A. A reação intradérmica com polissacáride do *Paracoccidioides brasiliensis*, na Blastomicose Sul-Americana. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 3, n. 4, p. 161-165, 1961.

FONSECA FILHO, O. *Glenosporella lobo*. In: FONSECA FILHO, O. **Parasitologia Médica**. Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. v. 1, p. 703-725, 1943.

FONSECA FILHO, O.; ARÊA LEÃO, A.E. Contribuição para o conhecimento das granulomatoses blastomycoides. O agente etiológico da doença de Jorge Lobo. **Rev. méd. Cirug. Brasil.**, v. 48, p.147-158, 1940.

FONSECA, O.J., C. DAS. AND LACAZ. Estudo de culturas isoladas de blastomycosis queloidiforme (doença de Jorge Lobo). Denominação ao seu agente etiológico. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v.13, p. 225-251, 1971.

FONTAN, R. Premier cas de maladie de Lobo (blastomycose chéloïdienne) observe em Guyane Française. **Arch. Inst. Pasteur Guyane franç.**, v.461, p. 1-12, 1960.

FRAGA, S.; MIRANDA, J.L. Keloidal blastomycosis (Jorge Lobo disease). In: CONGRESS INTERNATIONALIS DERMATOLOGIAE, 13.th. , 1968. **Anais**, p. 830-831.

FREDERICKS, D.N.; RELMAN, D.A. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. **Clin Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 18-33, 1996.

FURTADO, J.S. Structure and reproduction of *Paracoccidioides lobo*. **Mycologia**, v. 59, p. 286-294, 1967.

GADELHA, A. Dos. R.; BANDEIRA, V. Micoses profundas. In: SILVA, I. M. Da. **Dermatopatologia**. Rio de Janeiro, Atheneu, p. 125-134, 1983.

HAUBOLD, E.M.; ARONSON, J.F.; COWAN, D.F.; MCGINNIS, M.R.; COOPER, C.R. Jr. Isolation of fungal rDNA from bottlenose dolphin skin infected with *Loboa lobo*. **Med Mycol.**, v. 36, p. 263-267, 1998.

HEEL, W.H.D. Successful treatment in a case of lobomycosis (Lobo's disease) in *Tursiops truncatus* (Mont.) at the Dolphinarium, Harderwijk. **Aquat. Mammals**, v. 5, p. 8-15, 1977.

HERR, R.A.; TARCHA, E.J.; TABORDA, P.R.; TAYLOR, J.W.; AJELLO, L.; MENDOZA, L. Phylogenetic analysis of *Lacazia lobo* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 309-314, 2001.

LACAZ, C. S.; BARUZZI, R.G.; ROSA, M. do C.B. **Doença de Jorge Lôbo**. São Paulo, Brasil: IPSIS, p. 1-92, 1986.

LACAZ, C. S. Novos dados em relação à blastomicose sul-americana e seu agente etiológico. **Rev. Méd. Cirurg. S.Paulo.**, v. 9, p. 303-340, 1949.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides lobo* (Fonseca Filho et Área Leão, 1940) Almeida et Lacaz, 1948-1949. Description of the fungus in latin. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 229-231, 1996.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS .J. E. C. Micologia Médica: fungos; actinomicetos e algas de interesse médico. 8ed. São Paulo, Savier, 1991.

LANDMAN, G.; VELLUDO, M.A.; LOPES, J.A.; MENDES, F. Crossed- antigenicity between the etiologic agent of lobomycosis and paracoccidioidomycosis evidence by an immunoenzymatic method (PAP). **Allergol. Immunopathol.** (Madr.), v. 16, p. 215-218, 1988.

LANGERON, M.; VANBREUSEGHEM, R. La blastomyose chéloidienne ou maladie de Lobo. In: LANGERON, M.; VANBREUSEGHEM, R. **Précis de Mycologie**. 2. ed. Paris: Masson, p. 490-491, 1952.

LEITE, J.M. Doença de Jorge Lobo. **Contribuição ao seu Estudo anátomo-patológico**. (Tese). Belém: Faculdade de Medicina e Cirurgia do Pará, 1954.

LEITE, J. M. Doença de Jorge Lobo. (Estudo clínico patológico, com apresentação de cinco casos). **Atlas do Simpósio sobre a bióta Amazônica.**, v. 6, p. 161-176, 1967.

LOBO, J. Blastomicoses Estudo especial da “Doença de Jorge Lobo”. **Arq. Méd. Cirurg. Pernambuco.**, v. 1, n. 1, p. 3-36, 1949.

LOBO, J. Contribuição ao estudo das blastomicoses. **An. Fac. Méd. Recife.**, v. 4-5, p. 39-51, 1937/1938.

LOBO, J. Nova especie de blastomyose. **Brasil. Med.**, v. 44, p. 1227, 1930.

LOBO, J. Um caso de Blastomicose, produzido por uma espécie nova, encontrada em Recife. **Rev. Méd. Pernambuco.**, v. 1, p. 763-775, 1931.

MACHADO, D. V. Apropos of a case of regression and its treatment. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo.**, v.17, p. 128-131, 1962.

MADEIRA, S.; OPROMOLLA, D.V.A.; BELONES, A. de F.F. Inoculation of BALB/C mice with *Lacazia loboi*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 42, p. 239-243, 2000.

MENDES-GIANNINI, M.J.; CAMARGO, M.E.; LACAZ, C.S.; FERREIRA, A.W. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 20, p. 103-108, 1984.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; TAYLOR, J.W. The taxonomic status of *Lacazia loboi* and *Rhinosporidium seeberi* has been finally resolved with the use of molecular tools. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 18, p. 95-98, 2001.

MENDOZA, L.; BELONE, A.F.F.; VILELA, R.; REHTANZ, M.; BOSSAR, G.D., REIF, J.S.; FAIR, P. A.; DURDEN, W. N.; LEGER, J.S.; TRAVASSOS, L.R. AND ROSA, P. S. Western blotting analyses of the humoral immune response to *Lacazia loboi* antigens using sera from humans and dolphins with lacaziosis and sera from experimentally infected mice. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, p. 164-167, 2008.

MENDOZA, L.; VILELA, R.; ROSA P.R.; BELONE A.F.F. *Lacazia loboi* and *Rhinosporidium seeberi*: A genomic Perspective. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, p. 213-216, 2005.

MENDOZA, L.; SILVA, V. The use of Phylogenetic analysis to investigate uncultivated microbes in medical mycology, p. 276-298. In: SAN-BLAS, G.; CALDERONE, R.A. (Ed.). **Pathogenic Fungi**. Structural Biology and Taxonomy. Norfolk, England: Caister Academic Press. 2004.

MICHALANY, J. Corpos asteroides nas lesões granulomatosas, com especial referência à blastomicose ou doença de Jorge Lobo. **Ver. Ass. méd. bras.**, v. 2, p. 61-68, 1963.

MIGAKI, G.; VALERIO, M.G.; IRVINE, B.; GARNER, F.M. Lobo's disease in an Atlantic Bottle-nose dolphin. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 159, p. 578-582, 1971.

MORAES, M.A.P. Blastomicose tipo Jorge Lobo. Seis casos novos encontrados no Estado do Amazonas, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 4, p. 187-197, 1962.

MORAIS, F.V.; BARROS, T.F.; FUKADA, M.K.; CISALPINO, P.S.; PUCCIA, R. Polymorphism in the Gene Coding for the Immunodominant Antigen gp43 from the Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 11, p. 3960-3966, 2000.

MUSATTI, C.C.; LOPES, R.M.E.; BARUZZI, R.J.; MENDES, N.F. Doença de Jorge Lobo em índios Caiabis. **Rev. Bras. Alergia Immunopatol.**, v. 2, p. 160-161, 1980.

NAZARÉ, I.P. Micose de Lobo. Belém, GRAFISA, 1976.

NERY-GUIMARÃES, F.; MACEDO, D.G. Contribuição ao estudo das blastomicoses na Amazônia (blastomicose queloidiana e blastomicose sul-americana). **Hospital (Rio de Janeiro)**, v. 38, p. 223-253, 1950.

NERY-GUIMARÃES, F. Inoculações em hamsters da blastomicose sul-americana (doença de Lutz) da blastomicose queiloideana (doença de Lobo) e da blastomicose dos índios do Tapajós-Xingu. **Hospital (Rio de Janeiro)**, v. 66, p. 581-593, 1964.

NETTO, F.C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (Blastomicose Sul-Americana). São Paulo, 1960. (Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.21, p.99-194, 1961.

NORTON, S.A. Dolphin-to-human transmission of lobomycosis? **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.55, p.723-724, 2006.

OPROMOLLA, D.V.A.; BELONE, A.F.F.; TABORDA, P.R.O.; TABORDA, V.B.A. Correlação Clínico patológica em 40 casos novos de blastomicose. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 75, p. 425-434, 2000.

OPROMOLLA, D.V.A.; MADEIRA, S.; BELONE, A.F.F.; VILANI-MORENO, F.R. Jorge Lobo's disease: Experimental inoculation in Swiss mice. **Rev. Inst. Med. S. Paulo**, v. 41, p. 359-364, 1999.

OPROMOLLA, D.V.A.; NOGUEIRA, M.E. Inoculation of *Lacazia loboi* into the subcutaneous tissue of the hamster cheek pouch. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 42, n. 3, p. 119-123, 2000.

OPROMOLLA, D.V.A.; VILANI-MORENO, F.R.; BELONE, A.F.F. A doença de Jorge Lobo e a coloração pela prata metanamina. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 4, p. 345-349, 1999.

ORTIZ, B. L.; DÍES, S.; URÁN, M. E.; RIVAS, J.M.; ROMERO, M.; CAICEDO, V.; RESTREPO, A.; McEWEN, J. G. Use of the 27K Daltons recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis paracoccidioidomycosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 5, p. 826-830, 1998.

PECHER, S.A.; CROCE, J.; FERRI, R.G. Study of humoral and cellular immunity in lobomycosis. **Allergol. Immunopathol.**, v. 7, p. 439-444, 1979.

PECHER, S.A.; FUCHS, J. Cellular immunity in Lobomycosis (Keloidal blastomycosis). **Allergol. Immunopathol.**, v. 16, p. 413-415, 1988.

PINTO, A.R.; PUCCIA, R.; DINIZ, S.N.; FRANCO, M.F.; TRAVASSOS, L.R. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v. 18, p. 3050-3058, 2000.

POELMA, F.G.; DE VRIES, G.A.; BLYTHE-RUSSELL, E. A.; LUVKX, M. H. F. Lobomycosis in an Athantic bottenosed dolphin in the Dolfinarium. **Handerwijk. Aq. Mam.**, v.2, 1974.

PUCCIA, R. Componentes solúveis de *Paracoccidioides brasiliensis* liberados no meio de cultura. Isolamento e caracterização de um antígeno específico. São Paulo, 1985. (Dissertação de Mestrado. Escola Paulista de Medicina).

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P.A.J.; TRAVASSOS, L.R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, v. 53, p. 199-206, 1986.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. The 43-kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 289. n. 2, p. 298-302, 1991a.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 1610-1615, 1991b.

REIF, J.S.; MAZZOIL, M.S.; MCCULLOCH, S.D.; VARELA, R.A., GOLDSTEIN, J.D.; FAIR, P.A. AND BOSSART, G.D. Lobomycosis in Atlantic bottlenose dolphins from the Indian River Lagoon, Florida. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 228, p. 104-8, 2006.

RIPPON, J.W. **Medical mycology.**, 3rd ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pa, p. 353-432, 1988.

RODRIGUEZ M.C. AND C.DAS. LACAZ. Provas de contrainmunoelctroforese na doença de Jorge Lôbo. In: **Doença de Jorge Lôbo**, Lacaz, C.daS., Baruzzi, R.G., & Rosa M.doC.B. Editora da Universidade de São Pablo. p. 62, 1984.

SAMPAIO, M. M.; DIAS, L. B. Experimental infection golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Rev. Trop. Med. São Paulo.**, v. 12, p. 115-120, 1970.

SAMPAIO, M.M.; DIAS, L. B.; SCAFF, L. Staining of pathogenic fungi with trypan blue. **Rev. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 13, p. 223-224, 1971.

SAMPAIO, M.M.; DIAS, L.B. The armadillo. *Euphractus sexcinctus* as a suitable animal for experimental studies of Jorge Lobo's disease. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 19, p. 215-220, 1977.

SANDOVAL, M. P; DEL NEGRO, GMV; MENDES, GIANNINI, M.J.S; DE BRITO, T. Distribution of exoantigens and a 43 kDa glycoprotein gp43 in the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Mycol. Méd.**, v.6, p. 1-6, 1996.

SANGER, F; NITCKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA. Sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.12, p. 5463-7, 1977.

SESSO, A; BARUZZI, R.G. Interaction between macrophage and parasite cells in lobomycosis. The thickened cell wall of *Paracoccidioides loboii* exhibits apertures of the extracellular milieu. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 20, p. 537-548, 1988.

SILVA, D. Micose de lobo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 6, p. 85-98, 1972.

SILVA, M.E., W. KAPLAN, AND J.L. MIRANDA. Antigenic relationships between *Paracoccidioides loboii* and other pathogenic fungi determined by immunofluorescence. **Mycopathologia**, v. 36, p.97-106, 1968.

SIMÕES-LOPES, P.C. First case of lobomycosis in a bottlenose dolphin from southern Brazil. **Mar. Mamm. Sci.**, v. 9, n. 3, p. 329-331, 1993.

SIMÕES-LOPES, P.C.; PAULA, G.S.; BOTH, M.C.; XANVIER, F.M.; SCARAMELLO, A.C. First case of lobomycosis in a bottlenose dolphin from southern Brazil. **Mar. Mammal Sci.**, v. 9, p. 329-331, 1993.

STEVENSON, B.S.; EICHORST, S.A.; WERTZ, J.T.; SCHMIDT, T.M.; BREZNAK, J.A.. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 4748-4755, 2004.

SYMMERS, W. St. C. A possible case of Lôbo's disease acquired in Europe from a bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*). **Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales**, v. 76, n. 5 Pt 2 p. 777-784, 1983.

TABORDA, C.P.; CAMARGO, Z.P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 2, p. 554-556, 1994.

TABORDA, CP.; CAMARGO, Z. P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen-gp43. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 155-60, 1993.

TABORDA, C.P.; JULIANO, M.A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L.R. Mapping of the T-cell epitop in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 786-793, 1998.

TABORDA, P.R.; TABORDA, V.A.; MCGINNIS; M.R. *Lacazia loboi* gen nov., comb. Nov., the etiologic agent of lobomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2031-2033, 1999.

TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R.; CISALPINO. P.; TABORDA, C.; RODRIGUES, M.; SILVEIRA, J. F.; ALMEIDA, I. C. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.**, v.3, p. 297-304, 1995.

VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; FRANCO, M.L.; SOUZA, W. de; MORAES, J.Z. de; TRAVASSOS, L.R.; LOPES, J.D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1465-1469, 1994.

VIDAL, M.S.; PALACIOS, S.A.; DE MELO, N.T.; LACAZ, C. da S. Reactivity of anti-gp43 antibodies from *Paracoccidioides brasiliensis* antiserum with extracts from cutaneous lesions of Lobo's disease. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 39, n. 1, p. 35-37, 1997. Preliminary note.

VILANI-MORENO, F.R.; OPROMOLLA, D.V.A.. Imunopatologia da doença de Jorge Lobo: composição celular do infiltrado inflamatório e quantificação de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares e soro sanguíneo. São Paulo, 2002 (Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade estadual paulista).

VILANI-MORENO, P.O.; OPROMOLLA, D.V.A.. Determinação da viabilidade do *Paracoccidioides lobo* em biópsias de pacientes portadores de doença de Jorge Lobo. **Ann. Bras. Dermatol.**, (Rio de Janeiro), v. 72, p. 433-437, 1997.

VILELA, R.; MENDOZA, L.; ROSA, P.R.; BELONE, A.F.F.; MADEIRA, S.; OPROMOLLA, D.V.A.; RESENDE, M.A. de. A molecular model for studying the uncultivated fungal pathogen *Lacazia lobo*. **J. Clin. Microbiol.**, 2005. .

WOODWARD, J.C. Electron microscopic study of lobomycosis (*Loboa lobo*). **Lab. Invest.**, v. 27, n. 6, p. 606-612, 1972.

WIERSEMA, J.P. Lobo's disease (Keloidal blastomycosis). p. 577-588. In: BAKER, R. (Ed.). **The Pathologic Anatomy of Mycoses**. Human Infection with Fungi, Actinomycetes and Algae. Berlin: Springer Verlag. 1971.

YARZABAL, L.A. Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomycosis sudamericana revelados por inmunoelectroferosis. **Ver. Inst. Méd. trop. São Paulo.**, V. 13, P. 320-327, 1971.

