

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

SÍLVIA MARIA CORDEIRO WERNECK

**A melanina exerce papel essencial na
interação entre fungo e célula do
hospedeiro em modelos de
paracoccidioidomicose experimental**

**Belo Horizonte
2014**

SÍLVIA MARIA CORDEIRO WERNECK

**A melanina exerce papel essencial na
interação entre fungo e célula do hospedeiro
em modelos de paracoccidioidomicose
experimental**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial à
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas com Ênfase em
Microbiologia

Orientadora: Daniele da Glória de Souza

**Belo Horizonte
2014**

043 Werneck, Sílvia Maria Cordeiro.
A melanina exerce papel essencial na interação entre fungo e célula do
hospedeiro em modelos de paracoccidiodomicose experimental [manuscrito] /
Sílvia Maria Cordeiro Werneck. – 2014.
79 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Daniele da Glória de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Paracoccidiodes. 3. Paracoccidiodomicose. 4. Melaninas.
I. Souza, Daniele da Glória de. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE SÍLVIA MARIA CORDEIRO WERNECK

Nº REGISTRO: 2012661852

Relator e Suplente: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

Suplente externo: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Às 14:00 horas do dia 26 de fevereiro de 2014, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pela Profa. Susana Johann (Departamento de Microbiologia/UFMG), pelo Dr. Flávio Almeida Amaral (Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG) e a Profa. Daniele da Glória de Souza - Orientadora, para julgar o trabalho final "A melanina exerce papel essencial na interação entre fungo e célula do hospedeiro em modelos de Paracoccidiodomicose experimental", da aluna **Sílvia Maria Cordeiro Werneck**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Cláudio Antônio Bonjardim - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2014.

Profa. Susana Johann

Dr. Flávio Almeida Amaral

Profa. Daniele da Glória de Souza (Orientadora)

Prof. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho contou com a colaboração de inúmeras pessoas e que eu gostaria de agradecer com todo carinho a todos que de alguma forma contribuíram para que ele acontecesse. De maneira especial gostaria de agradecer:

À minha orientadora Danielle que me apresentou o mundo da inflamação e me recebeu com muita paciência. Obrigada pela oportunidade de fazer perguntas e por poder ter a chance de tentar respondê-las. Pelo bom humor, convívio tão fácil e aberto, e por tornar o laboratório um ambiente leve e agradável. Obrigado por me ajudar a crescer pessoal e profissionalmente!

À Lud, amiga e companheira de experimentos, obrigada pela força e pela disponibilidade sempre que eu precisei, mesmo você estando de longe! Você me ajudou demais! Obrigada pelas conversas tão divertidas e produtivas, me incentivando na realização deste trabalho!

À Paty Campi (Super Paty!!), muito obrigada pela disponibilidade e por me ajudar sempre de maneira tão agradável! Sua ajuda foi essencial, principalmente nos momentos finais.

À professora Patrícia Cisalpino, pela disponibilidade e pela ótima convivência no laboratório. Obrigada pelo interesse e por incentivar meu trabalho.

Ao professor Daniel Assis, pela disponibilidade e pela grande ajuda em todos os momentos!

Às minhas queridas Mila e Rosana, por estarem sempre ao meu lado no laboratório! Obrigada pelo carinho e pela preocupação, e por me ajudarem sempre que precisei durante todos esses anos no laboratório. Vocês são especiais!

À Gil, pelo carinho, companhia e pelas boas risadas!! Obrigada pela boa vontade de ajudar sempre que precisei!

Aos amigos do LIMHO: Renata, Daniel, Luana, Raquel, Zélia, Livinha Resende, Carol, Livinha Tavares, Rebeca, Camila, Elisão, Lucas, Fernando, Mila, Paty, Lud, Rosana, Thalles, Celso, Vivian, Luciana, Diogo. Obrigada pela convivência e histórias maravilhosas. Meninas, obrigada pelas conversas, pelos cafés regados de muitas risadas e boa energia, pela força e por me ajudarem a acreditar que as coisas sempre vão melhorar! Vocês são ótimas amigas sempre!

Às minhas amigas Mika e Lili, sempre tão perto de mim, e com a amizade tornam os momentos difíceis em mais leves e divertidos! Obrigada pelo carinho e preocupação, pelo interesse no meu trabalho e por me incentivarem durante toda a realização dele.

Aos colegas do mestrado, que se tornaram amigos e cúmplices de várias histórias e aulas memoráveis.

À todos os meus amigos que me ajudaram e incentivaram na realização desse trabalho.

À todos que participaram, direta ou indiretamente, deste trabalho.

Enfim, aos meus pais e à dindinha, sempre presentes, torcendo, sofrendo junto. Obrigada por compreenderem minha ausência, por me incentivarem sempre, por confiarem em, lembrando-me sempre da minha capacidade. Amo vocês! Obrigada por estarem sempre junto a mim.

E aos meus irmãos, pela confiança, paciência e cumplicidade. Obrigada por me apoiarem sempre! Amo vocês!

LISTA DE ABREVIATURAS

µl microlitro

µm micrômetro

BHI Infusão de cérebro e coração

DAF metilamina - '2, 7' - difluorofluoresceína

DCDHF-DA diacetato diclodiidrofluoresceína

DHR dihidrorodamina

D.O densidade óptica

ELISA ensaio imunoenzimático

g grama

Gp glicoproteína

h hora

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

HTAB brometo de hexadeciltrimetilamônio

ID método de imunodifusão dupla

IF Índice fagocítico

Ig Imunoglobulina

IL interleucina

IFN-γ interferon gamma

iNOS óxido nítrico sintase induzida

i. pl. intra-plantar

kDa Kilodalton

L litro

L-DOPA 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina

LT leucotrieno

mg miligrama

ml mililitro

min minutos

M Molar

Mm milimolar

MPO mieloperoxidase

MR receptor de manose

NAG N- acetilglicosaminidase

NaCl Cloreto de Sódio

NaEDTA Ácido etilenodiaminotetracético sódico

NaPO₄ Fosfato de sódio

NK *natural killer*
nm nanômetro
NO óxido nítrico
ONOO⁻ peróxido nitrito
OPD ortofenildiamina
PAMPs padrões moleculares associados à patógenos
PBS Solução salina em tampão fosfato
PCM Paracoccidioidomicose
pH potencial hidrogeniônico
PRRs receptores de reconhecimento paadrão
RNS Espécies reativas de nitrogênio
ROS espécies reativas de oxigênio
rpm rotações por minuto
RPMI-C meio RPMI completo
SUS Sistema Único de Saúde
TGF- β *Transforming growth factor -beta* (Fator de Crescimento Tumoral beta)
Th linfócito T auxiliar
TLR *Toll like-receptor* (Receptores do tipo Toll)
TNF- α *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)
UFC unidades formadoras de colônia
YPD *Yeast Peptona Dextrose* (Meio a base de levedura, peptona e dextrose)
5-LO 5- lipoxigenase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Animais inoculados com leveduras melanizadas apresentam maior carga fúngica no pulmão, LBA e fígado.	29
Figura 2 - Infecção usando leveduras melanizadas induz alteração no infiltrado infamatório para o espaço alveolar..	32
Figura 3 - A presença da melanina em células fúngicas altera o acúmulo de leucócitos no parênquima pulmonar, fígado e baço de animais após infecção com <i>P. brasiliensis</i>	34
Figura 4 - A presença da melanina em células fúngicas altera o acúmulo de macrófagos no parênquima pulmonar, fígado e baço após infecção com <i>P. brasiliensis</i>	35
Figura 5 - A presença da melanina em células fúngicas altera a concentração de citocinas e quimiocinas no pulmão após infecção com <i>P. brasiliensis</i>	38
Figura 6 - A presença da melanina em células fúngicas altera a concentração de citocinas e quimiocinas no LBA após infecção com <i>P. brasiliensis</i>	39
Figura 7 - Células fúngicas melanizadas de <i>P. brasiliensis</i> são menos fagocitadas por macrófagos peritoneais.	41
Figura 8 - Células fúngicas melanizadas de <i>P. brasiliensis</i> apresentam maior capacidade de proliferação no interior de macrófagos.	42
Figura 9 - Células fúngicas melanizadas de <i>P. brasiliensis</i> induzem geração de menores níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio..	43
Figura 10 - Carga fúngica de animais infectados pela via intra-plantar.....	45
Figura 11 - Infiltrado de células inflamatórias na pata de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> pela via intra-plantar.	46
Figura 12 - Avaliação da carga fúngica em animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> pela via intra-plantar após diferentes tempos de infecção.)	47
Figura 13 - Edema na pata de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i>	48
Figura 14 - Infiltrados de células inflamatórias na pata de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> pela via intra-plantar em diferentes tempos.....	49
Figura 15 - Animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> melanizado apresentam maiores cargas fúngicas na pata e linfonodo..	50
Figura 16 - Edema na pata de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> nas condições de melanizado e não melanizado.....	51
Figura 17 - A presença da melanina induz uma alteração no acúmulo de células inflamatórias após infecção intra-plantar com <i>P. brasiliensis</i>	52

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um dos agentes etiológicos da paracoccidioidomise, micose sistêmica endêmica da América Latina e de maior prevalência no Brasil. A patogênese da PCM é dependente de múltiplos fatores, sendo estes relacionados tanto ao fungo quanto ao hospedeiro. Além disso, uma importante participação da resposta inflamatória na patogênese da PCM tem sido bem descrita. A melanina é sabidamente um fator de virulência encontrado em diversos patógenos de plantas e animais e já foi demonstrado que *P. brasiliensis* a produz. Sendo assim, torna-se importante entender quais os fatores associados ao fungo são responsáveis pela interação com o hospedeiro. Neste estudo, foram investigadas alterações na resposta imunológica da PCM experimental induzida por de *P. brasiliensis*. Os dados obtidos mostraram que após a infecção intratraqueal com leveduras de *P. brasiliensis* melanizadas houve alterações no recrutamento de leucócitos, na produção de mediadores inflamatórios e na proliferação fúngica presente no pulmão, em relação à infecção com leveduras não melanizadas. Além disso, houve disseminação do fungo melanizado para o fígado. Ensaios *in vitro* mostraram uma redução da atividade fagocítica de macrófagos infectados com leveduras melanizadas, assim como uma menor produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Provavelmente, a redução de ROS e RNS possibilitou o aumento no índice de proliferação no interior de macrófagos, visualizado após a infecção com *P. brasiliensis* melanizado. Objetivando um estudo mais profundo da influência da melanização do fungo no reconhecimento e recrutamento celular, foi padronizado um modelo de infecção intra-plantar com *P. brasiliensis*. Os resultados mostraram uma maior carga fúngica associada ao aumento no edema na pata e ao maior recrutamento de células inflamatórias. Assim, esse trabalho mostrou que a melanização do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é um importante fator de virulência, conferindo uma proteção para o fungo e desencadeando alterações na resposta imune do hospedeiro, o que influencia de maneira significativa os sinais de progressão da PCM.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is an etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis endemic in Latin America and most prevalent in Brazil. PCM pathogenesis is dependent on multiple factors which are related to both the fungus and the host. Moreover, an important contribution of the inflammatory response to PCM pathogenesis has been described. Melanin is known as a virulence factor of some pathogens of plants and animals; melanin production by *P. brasiliensis* has been demonstrated. Thus, it is important to understand which factors related to the fungus are responsible for the immune response related to experimental PCM induced by *P. brasiliensis*. In this study, immunological changes caused by the fungus *P. brasiliensis* in experimental PCM were investigated. Our data show that the infection by melanized yeast of *P. brasiliensis* was associated to changes in the recruitment of inflammatory leukocytes, production of inflammatory mediators and fungal proliferation in the lungs, when compared to non-melanized yeast. Moreover, it was observed dissemination of the melanized fungus to the liver. *In vitro* assays showed a reduction in the phagocytic activity of macrophages infected with melanized yeasts, and lower production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species. Probably this reduction in ROS and RNS contributed to the increase proliferation of the yeasts inside macrophages, visualized after infection with melanized *P. brasiliensis*. In order to focus on the influence of the fungus melanization in the recognition and cell recruitment, an intra-plantar infection model with *P. brasiliensis* was standardized. The results showed an increased fungal burden associated with increase paw edema and recruitment of inflammatory cells. Thus, this study showed that melanin in *Paracoccidioides brasiliensis* is an important virulence factor being protective for the fungus besides altering the host immune response, which influence significantly the symptoms and progression of PCM.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	III
LISTA DE FIGURAS	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VII
SUMÁRIO	VIII
1- Introdução.....	1
1.1 - <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	1
1.1.2 - Fatores de virulência de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	3
1.3 - Resposta imune na Paracoccidioidomicose.....	10
1.3.1 - Reconhecimento do patógeno	10
1.3.2 - Resposta celular do hospedeiro na infecção por <i>P. brasiliensis</i>	12
2. Justificativa	16
3. Objetivos	17
3.1. Objetivo principal.....	17
3.2 - Objetivos Específicos.....	17
4. Materiais e Métodos.....	19
4.1 - Cultivo e manutenção das amostras fúngicas	19
4.2 - Cultivo das amostras fúngicas na presença de L-DOPA.....	19
4.3 - Animais.....	19
4.4 - Padronização e preparo do inóculo	20
4.5 - Infecção pulmonar por inoculação intratraqueal (i.t) por <i>P. brasiliensis</i>	20
4.6 - Lavado broncoalveolar (LBA)	21
4.7 - Contagem total e diferencial das células do lavado broncoalveolar	21
4.8 - Determinações de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos tecidos coletados e LBA de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i>	21
4.9 - Quantificação da mieloperoxidase (MPO)	22
4.10 - Detecções dos níveis de N- acetilglicosaminidase (NAG) nos tecidos infectados.....	23
4.11 - Quantificações de citocinas e quimiocinas.....	23
4.12 - Isolamento e cultivo de macrófagos murinos.....	24
4.13 - Ensaio de fagocitose.....	25
4.14 - Ensaio de proliferação intracelular	25
4.15 - Quantificações da produção de ROS e RNS pelos macrófagos no ensaio de fagocitose	26

4.16 - Modelo de infecção intra-plantar com <i>P. brasiliensis</i>	26
4.17 - Avaliação de edema na pata	26
4.18 - Análise estatística.....	27
5. Resultados.....	28
5.1 - Presença da melanina em células fúngicas durante a infecção pulmonar experimental	28
5.2 - A influência da presença da melanina na capacidade fagocítica de macrófagos	40
5.3 - Padronização do modelo experimental de infecção intra-plantar com <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	44
6. Discussão	53
7. Conclusão.....	62
8. Perspectivas.....	63
9. Referências Bibliográficas	64

1- Introdução

1.1 - *Paracoccidioides brasiliensis*

Paracoccidioides brasiliensis é um dos agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), micose crônica sistêmica de natureza granulomatosa. Este fungo apresenta dimorfismo térmico reversível, apresentando-se na forma de micélio quando cultivado a temperatura ambiente (25 - 28°C) e leveduriforme durante o parasitismo no hospedeiro ou quando cultivado a temperatura de 35 a 37°C. Seu crescimento micelial é lento, com colônias brancas que se aderem firmemente ao meio. Vistas ao microscópio observam-se filamentos delgados, septados, com clamidósporos terminais ou intercalares e artroconídeos laterais. Na fase leveduriforme observam-se colônias de aspecto rugoso (cerebriforme), maleável, de coloração creme. Ao microscópio, observam-se células esféricas, de tamanho variável entre 2 a 30 µm, com parede espessa, birrefringente e múltiplos brotamentos; as células-filhas permanecem aderidas à superfície da célula-mãe, conferindo a *P. brasiliensis* um aspecto característico de “roda-de-leme”. Essa característica é determinante para o diagnóstico da PCM, tanto em exames diretos como em exame histopatológico (BRUMMER et al. 1993; LACAZ, 1994; BORGES-WALMSLEY et al., 2002; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Análises morfológicas em associação com análises moleculares determinaram que *P. brasiliensis* pertence, dentro do Reino Fungi, ao filo Ascomycota, ordem Onygenales e família Onygenaceae, grupo que também abriga outros fungos dimórficos patogênicos, como *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum* (BAGAGLI et al., 2006). Novas tecnologias moleculares aplicadas para o estabelecimento de filogenias vêm contribuindo para melhor compreensão da taxonomia de *P. brasiliensis*, sendo hoje admitido mais de uma espécie do gênero *Paracoccidioides*. Estudos realizados por Matute e colaboradores (2006) definiram a existência de três espécies filogenéticas diferentes: a espécie chamada S1 encontrada no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela; a espécie PS2 proveniente do Brasil e Venezuela; e a PS3, grupo restrito a Colômbia. Entretanto, novas análises filogenéticas demonstraram que a amostra

Pb01 de *P. brasiliensis* se mostrou claramente distinta das três diferentes espécies filogenéticas já descritas anteriormente (CARRERO et al., 2008). Estudos envolvendo características morfológicas de Pb01, como células leveduriformes maiores e brotamento abundante, além de análises moleculares possibilitaram o agrupamento dessa e outras 17 amostras de *P. brasiliensis* de perfil semelhante à primeira em um grupo chamado “Pb01 like” (TEXEIRA et al., 2009). Esse conjunto de análises permitiu aos autores proporem que o grupo descrito como “Pb01 like” possam ser consideradas uma nova espécie denominada *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem a Adolph Lutz, quem descreveu o fungo pela primeira vez (TEXEIRA et al., 2009). Assim, *Paracoccidioides lutzii*, juntamente com *P. brasiliensis*, é agente etiológico da paracoccidioidomicose, sendo essa nova espécie endêmica da região Centro-Oeste brasileira (THEODORO et al., 2012).

Pouco se sabe sobre a ecologia do gênero *Paracoccidioides*. Acredita-se que o habitat natural do fungo é exógeno ao ser humano, contudo os elos que permitiriam relacionar o fungo ao homem permanecem pouco esclarecidos. Evidências indicam que o fungo habita solos de regiões úmidas como florestas tropicais ou subtropicais, entretanto, poucas amostras foram isoladas a partir dessa fonte. Nessas condições o fungo produziria conídios, estruturas de reprodução e responsáveis pela propagação no ambiente, e que, quando inaladas atingiriam o pulmão onde se inicia a transformação em leveduras (MONTENEGRO et al., 1996, SILVA-VERGARA et al., 1998, BARROZO et al., 2009). Diversos foram os relatos de isolamentos a partir de tecidos de tatus de nove bandas (*Dasyurus novemcinctus*), sendo este considerado um hospedeiro não humano de *P. brasiliensis* devido à alta incidência de infecções nesses animais (CORREDOR et al., 1999; BAGAGLI et al., 2003; RICHINI-PEREIRA et al., 2009). A paracoccidioidomicose também foi descrita em cães, como uma fêmea da raça Dobermann que apresentava quadro de linfadenomegalia (RICCI et al., 2004), e mais recentemente, num felino que apresentava quadro de PCM urinária e encefálica e num bicho-preguiça (doença disseminada) (GONZALES et al., 2010; TREJO-CHÁVEZ et al., 2010). Porém, o estudo da natureza do fungo e da presença deste em animais e humanos ainda necessita de maior elucidação.

1.1.2 - Fatores de virulência de *Paracoccidioides brasiliensis*

Alguns componentes estruturais e funcionais, chamados de fatores de virulência, podem contribuir na patogênese das infecções fúngicas, permitindo a sobrevivência, persistência e multiplicação do fungo no hospedeiro (KUROKAWA et al., 1998). Alguns componentes da parede celular, como α -glucanas, moléculas de adesão e enzimas (proteínases, lípases e fosfolípases), consideradas importantes para nutrição, invasão e colonização de tecidos animais por fungos, além do dimorfismo e produção de melanina são observados em *P. brasiliensis* (BAGAGLI et al., 2008).

A adesão dos patógenos aos componentes do hospedeiro é um importante passo para a infecção e disseminação de micro-organismos. Há evidências de que a enzima glicolítica enolase, capaz de se ligar a fibronectina, ativa a conversão de plasminogênio em plasmina, uma serina protease que facilita a disseminação de *P. brasiliensis* (PUCCIA, 2011). Estudos apontam uma redução na adesão de *P. brasiliensis* a células epiteliais após o tratamento do fungo com anticorpo monoclonal contra uma enolase presente na parede celular do fungo (MARCOS et al., 2012).

A glicoproteína de 43 kDa (Gp43) é o antígeno exocelular mais importante em *P. brasiliensis*, e tem sido apontado como fator de virulência considerando as amplas demonstrações de suas propriedades adesivas a matriz extracelular, facilitando a adesão do fungo às células do hospedeiro (VICENTINI et al., 1994; GESZTESI et al., 1996; HANNA et al., 2000). Hanna e colaboradores (2000) mostraram em experimentos *in vitro* que a utilização de soro anti-gp43 reduz de maneira significativa a adesão de *P. brasiliensis* em células Vero. Além disso, a presença da proteína Gp-43 inibiu a fagocitose do fungo por macrófagos e reduziu a morte fúngica por essas células (POPI et al., 2002). Estudos apontam que essas moléculas proteicas apresentam características de vacinas devido à presença de epítomos de células T que estimulam respostas Th1 protetoras (TABORDA et al., 1998; TRAVASSOS et al., 2008), mas aparentemente pode estimular a imunidade inata (NAKAIRA-TAKAHAGI et al., 2011).

A habilidade de crescer a 37°C é uma condição que permite *P. brasiliensis* suportar os mecanismos de defesa do hospedeiro possibilitando a invasão de tecidos, além de ser um importante fator na diferenciação da forma micelial para a forma parasitária, considerada essencial para a patogênese do fungo (GOLDANI et al., 1994). O dimorfismo apresentado por alguns patógenos fúngicos envolve reorganização dos lipídeos de membrana, alterações em componentes da parede celular, com aumento na quantidade de quitina e mudança do polímero glucana predominante. Em *P. brasiliensis* a conversão térmica determina a produção de α -(1, 3)- glucanas como principal componente da parede celular da fase leveduriforme, um componente que em outros fungos patogênicos dimórficos, como *Histoplasma capsulatum*, é comprovadamente um fator de virulência uma vez que inibe o reconhecimento pelo receptor Dectina-1 evitando o desencadeamento de uma resposta imune contra o fungo (RAPPEYE et al., 2004, 2007). Estudos relatam que os polissacarídeos α -(1,3)-glucanas funcionam como uma proteção contra a ação de leucócitos, já que estes não possuem α -glucanases, sendo um mecanismo de escape da fase leveduriforme. Foi demonstrado que amostras virulentas, após cultivo sucessivo, apresentam redução nas quantidades de α -(1,3)- glucanas nas paredes celulares, redução da espessura da parede e perda de virulência (HOGAN et al., 1996; BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

Foi demonstrado que *P. brasiliensis* produz melanina na presença de L-DOPA (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina) (GÓMEZ et al., 2001; SILVA et al., 2006). A melanina é sabidamente um fator de virulência encontrado em diversos patógenos de plantas e animais. É um polímero multifuncional ubíquo na natureza, carregado negativamente, hidrofóbico, com alto peso molecular e insolúvel em solvente aquosos e orgânicos, o que dificulta seu estudo por técnicas bioquímicas convencionais (HILL, 1992; BUTLER et al, 1998; JACOBSON, 2000). Sua formação ocorre a partir da polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ ou indólicos e são usualmente marrons ou pretos, havendo, contudo, relatos da ocorrência da melanina de outras cores (NOSACHUCK et al., 2003). Embora em mamíferos a produção de melanina seja catalisada pelo tirosinase, os micro-organismos sintetizam melanina pela via da

poliquetídeo-sintetase e/ ou pela via das fenoloxidasas, como a lacase. As lacases tem a capacidade de catalisar a polimerização de diversos substratos fenólicos, como a L-DOPA, em melanina (TABORDA et al., 2008). Sabe-se que além dos fungos patogênicos *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*, também *Paracoccidioides brasiliensis* sintetiza DOPA-melanina pela via da lacase (GÓMEZ et al., 2001; NOSANCHUK et al., 2002; DA SILVA et al., 2006). GÓMEZ et al. (2001) foram os primeiros a relatar a melanização de leveduras e conídeos de amostras de *P. brasiliensis in vitro* e durante a infecção em camundongos. Pouco se sabe sobre a localização da melanina em fungos patogênicos, mas já foi descrito a ocorrência em espaços intra e/ ou extracelulares. Em *P. brasiliensis*, microscopia eletrônica de transmissão revelou grânulos de melanina distribuídos no citoplasma e na parede celular (DA SILVA et al., 2006).

Propriedades únicas da melanina sugerem potenciais aplicações ambientais e na saúde. Uma propriedade interessante da melanina é proteger os organismos contra radiação ionizante. Por exemplo, fungos melanizados resistentes à radiação podem sobreviver a climas severos, incluindo a Antártica e reatores nucleares contaminados (ROSA, et al., 2010) Sugere-se que as propriedades de radioproteção são devido à eliminação dos radicais livres gerados pela radiação. A capacidade dos fungos melanizados em sobreviver na presença de níveis elevados de radiação, em conjunto com a grande área de superfície das hifas fúngicas no solo, sugere que estes organismos podem ser utilizados para a absorção e descontaminação de ambientes (CASADEVALL et al., 2012).

Uma das principais razões para o estudo de melanina dos fungos é a contribuição desse pigmento à virulência de micro-organismos. Foi observada uma redução significativa na taxa de fagocitose de células melanizadas desse fungo, e é normalizada após a adição de anticorpos específicos anti-melanina ao meio onde se encontra o fungo. Além disso, células melanizadas são também menos susceptíveis à fagocitose mediada pelo complemento e aos efeitos danosos mediados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (DA SILVA et al., 2006; TABORDA et al., 2008). WANG et al. (1995) demonstraram que pequena quantidade de melanina protege *C neoformans* de

ROS e RNS, protegendo contra a morte por macrófagos. Em *Sporothrix schenckii*, estudos mostraram que mutantes albinos são mais susceptíveis à morte por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e que a melanização aumenta a resistência à fagocitose (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000). A melanina é imunologicamente ativa, mas pouco se sabe sobre sua relação com o sistema imune. Alguns autores mostraram que a melanina afeta macrófagos e reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias (NOSANCHUK et al., 1998; DA SILVA et al., 2006). Estudos recentes relataram a detecção de anticorpos IgG reativos à melanina de conídeos e leveduras de *P. brasiliensis* em soro e lavados broncoalveolar de camundongos infectados, assim como em soros de pacientes humanos, reforçando a possibilidade de melanização durante a PCM (URÁN et al., 2011).

A habilidade da melanina em proteger micro-organismos dos mecanismos de defesa do hospedeiro também é relevante para a terapia antimicrobiana, uma vez que a eficiência clínica de alguns antimicrobianos são complementadas pelas defesas do hospedeiro. A melanização de *P. brasiliensis* pode reduzir drasticamente a eficácia do tratamento da PCM, sendo por isso, a melanina um importante alvo para intervenção terapêutica. Estudos da análise da microestrutura da parede celular de *C. neoformans* mostram que a presença de grânulos de melanina podem prevenir ou reduzir a velocidade de entrada de drogas antifúngicas nas células do fungo (NOSANCHUK et al., 2006). O caráter protetor da melanina a antifúngicos não está relacionado com bombas de efluxo de drogas ou em alterações na síntese de ergosterol ou glucanas na parede celular fúngica (IKEDA et al., 2003; NOSANCHUK et al., 2006). Leveduras melanizadas de *P. brasiliensis* também são menos susceptíveis a potentes drogas antifúngicas, como Anfotericina B e derivados azólicos (DA SILVA et al., 2006). Estudos realizados em nosso laboratório mostraram uma redução na sensibilidade de 17 amostras de *P. brasiliensis* à Anfotericina B e Itraconazol (BALTAZAR et al, em preparação). Apesar das dificuldades inerentes ao estudo de melanina, é claro que um progresso considerável tem sido feito nos últimos anos na compreensão de suas propriedades, que são úteis, principalmente, no desenvolvimento de estratégias terapêuticas e no entendimento de mecanismos

de durante uma infecção por micro-organismos produtores do pigmento (CASADEVALL, et al., 2012)

1.2 – Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose é uma doença restrita à América Latina, sendo o Brasil, Colômbia e Venezuela os países mais afetados e o Brasil o responsável pelo maior número de casos reportados, cerca de 80% deles. Um estudo da mortalidade referente a micoses sistêmicas no Brasil entre 1996-2006 apontou a PCM como a principal causa de morte entre as micoses em pacientes não imunossuprimidos, seguida de criptococose, candidíase e histoplasmosse (PRADO et al., 2009). Os maiores índices de mortalidade foram encontrados na região Sudeste, principalmente nos estados de São Paulo (SP), Minas Gerais (MG) e no Rio de Janeiro (RJ), e na região Sul, nos estados do Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS) (PRADO et al., 2009). As áreas endêmicas apresentam níveis de precipitação e temperaturas moderados (900-1800 mm/ano; 17-24°C), presença de florestas tropicais ou subtropicais, invernos curtos e verões chuvosos (BRUMMER et al., 1993).

A PCM foi incluída na lista de doenças tropicais negligenciadas, uma das principais micoses responsáveis por importantes problemas de saúde pública (HOTEZ et al., 2008). A falta de notificação compulsória dos casos de PCM impede a determinação verdadeira da incidência dos casos. A ausência de dados disponíveis gera um impacto na prevenção, diagnóstico e tratamento da doença, que não é vista com devida atenção. A PCM, se não diagnosticamente e tratada de maneira conveniente pode levar morte precoce ou, em caso de cura, ao desenvolvimento de sequelas, como fibrose pulmonar, podendo ocasionar a incapacitação para o trabalho (MARTINEZ, 2010).

Estudos experimentais indicam que propágulos produzidos pelo fungo na sua forma micelial são inalados pelo hospedeiro chegando aos pulmões, órgãos alvos da infecção primária. A partir daí a infecção pode evoluir para a cura ou torna-se latente devido à presença de uma resposta imune, caracterizado pela

ausência de sintomas clínicos. Ainda pode progredir com a disseminação para outros órgãos pela via hematogênica ou linfática (FRANCO et al. 2000).

A PCM está relacionada com práticas de manuseio do solo e, portanto ocorre um predomínio de trabalhadores rurais acometidos pela doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A doença é mais frequente em homens do que em mulheres. Estudos revelaram que o contato parece ocorrer igualmente entre homens e mulheres, mas o desenvolvimento da doença é mais comum em homens. Evidências, inclusive experimentais, sugerem que fatores hormonais podem participar na patogênese da doença provavelmente associada à presença do receptor para o hormônio feminino $17\text{-}\beta\text{-estradiol}$ no citoplasma do fungo (RESTREPO et al., 1984, 2008; BRUMMER et al., 1993; COUTINHO et al., 2002). Estudos recentes demonstraram, *in vivo*, que o hormônio feminino estrógeno é capaz de impedir a transição da fase micelial para a fase leveduriforme, conferindo uma maior resistência das mulheres à progressão da doença (ARIZTIZABAL et al., 1998).

A PCM apresenta duas formas clínicas: a forma aguda ou subaguda (tipo juvenil) e a forma crônica/ adulta. A forma adulta acomete principalmente indivíduos acima de 40 anos e representa a grande maioria dos casos, aproximadamente 90% dos pacientes. Caracteriza-se pela progressão lenta, com estabelecimento de uma sintomatologia leve, moderada ou intensa. Manifestações pulmonares ocorrem em 90% dos casos crônicos, com sintomas pouco específicos, como tosse, dificuldade respiratória, perda de peso, fraqueza e anorexia. Pode ser subdividida segundo o grau de acometimento em unifocal e multifocal. Nas formas multifocais as lesões estão presentes em vários órgãos, ocorrendo, com frequência, lesões nas mucosas oral e nasal, linfonodos, glândulas adrenais e pele (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; WANK E AIDÊ, 2009).

A forma juvenil da doença corresponde entre 3 e 5% dos casos. Caracteriza-se por uma rápida progressão e disseminação linfática ou linfo-hematogênica do fungo ao sistema mononuclear fagocitário (baço, fígado, linfonodos e medula óssea), com perda de função dos órgãos acometidos. É mais frequente entre jovens e ocorre igualmente em ambos os sexos, apresentando uma taxa de

mortalidade superior a 10% (NEGRONI, 1994; MONTENEGRO & FRANCO, 1994; NOGUEIRA et al., 2006).

O diagnóstico da PCM é baseado na visualização da levedura característica de *P. brasiliensis* em amostras biológicas por meio de exames diretos e/ou histopatológicos, acompanhados de cultura e identificação. Testes sorológicos também apresentam relevância no diagnóstico da doença, sendo a imunodifusão dupla (ID) o principal método usado tendo em vista seu baixo custo e maior especificidade. O ensaio imunoenzimático (ELISA) também é uma alternativa por sua sensibilidade e rapidez, sendo o mais apropriado para um grande número de soros. Porém, o ELISA apresenta menor especificidade quando comparado com o método ID, quando se empregam preparações constituídas por proteínas não purificadas, misturas antigênicas complexas, exigindo maiores cuidados na interpretação dos resultados, dada a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com outras micoses sistêmicas, notadamente a histoplasmose (SHIKANAY-YASUDA et al., 2006; SILVA & SARAIVA, 2008; FERREIRA, 2009).

O tratamento da PCM é usualmente longo com doses agressivas dos agentes antimicrobianos, mantidos por meses ou até anos e na ausência de tratamento a doença pode ser fatal (WALMESLEY et al., 2002). Anfotericina B é o antimicrobiano usado para formas mais graves da doença, sendo administrado de forma intravenosa em doses diárias, por um curto período de tempo (3 a 4 meses) (BRUMMER et al., 1993; VISBAL et al., 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; SAN-BLAS & NIÑO-VEJA, 2008). Os derivados sulfamídicos são usados amplamente principalmente no Brasil, por sua disponibilização pelo Sistema Único de Saúde (SUS), seu baixo custo e baixa toxicidade. Requerem longos períodos de tratamento, podendo levar ao abandono do tratamento pelos pacientes, que com a amenização nos sintomas, se consideram curados, elevando as taxas de recaída da doença (VISBAL et al., 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; SAN-BLAS & NIÑO-VEJA, 2008). Os derivados azólicos representaram um grande avanço para o tratamento da doença. Entre os derivados azólicos, o itraconazol é o mais utilizado, sendo a droga de escolha do tratamento. Como efeitos colaterais pode-se citar a ação teratogênica apresentada por todos os azólicos e a hepatotoxicidade em pacientes com

alterações hepáticas prévias (VISBAL et al., 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; SAN-BLAS & NIÑO-VEJA, 2008). Devido à dificuldade de eliminação do fungo nos tecidos os pacientes devem ser avaliados de maneira periódica para certificar o desaparecimento de lesões e sintomas (QUEIROZ-TELLES et al., 2005).

Para que um paciente seja considerado curado são avaliados parâmetros clínicos, radiológicos e imunológicos. O desaparecimento dos sinais e sintomas da doença, incluindo a cicatrização das lesões tegumentares, involução das linfadenopatias e recuperação do peso corporal, estabilização do padrão das imagens cicatrizes radiológicas pulmonares e negatização dos títulos de imunodifusão dupla ou estabilização dos títulos em valores baixos, devem ser analisados. Frequentemente podem persistir sintomas provenientes de sequelas da PCM como respiratórias, linfático-abdominais, cutâneas, adrenais e neurológicas, sintomas estes que não representam presença da infecção (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006)

1.3 - Resposta imune na Paracoccidioidomicose

1.3.1 - Reconhecimento do patógeno

O contato inicial entre o patógeno e células do sistema imune do hospedeiro é mediado pelo reconhecimento de moléculas conservadas presentes nos grupos de micro-organismos, chamadas de padrões moleculares associados a micro-organismos (PAMPs). Esse reconhecimento ocorre via diferentes receptores (Receptores de reconhecimento padrão – PRRs), que quando ativados desencadeiam cascatas de sinalização responsáveis pela ativação de células e montagem de uma resposta inflamatória (ROMANI 2004; 2011).

Entre os fungos, os componentes estruturais das células fúngicas considerados essenciais para sobrevivência e que, portanto, são altamente conservados são, principalmente, as quitinas, glucanas e mananas. Essas estruturas são capazes de ativar receptores específicos direcionando a montagem de uma resposta dependente de fatores relacionados ao patógeno e aos tipos de receptores envolvidos (ROMANI, 2011). PRRs classicamente envolvidos nas respostas

imunes em infecções fúngicas são os receptores de manose (MR) e os receptores dectina-1, ambos pertencentes ao grupo de receptores de lecitina tipo C. Esses receptores reconhecem os componentes glicoproteicos e os carboidratos presentes nas células fúngicas. Recentemente, foi mostrado que o contato com leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* foi capaz de induzir um aumento na expressão do gene de dectina-1, ao contrário do que foi analisado para MR. Além disso, a inibição do receptor de manose levou a uma redução nos níveis da citocina IL-12, enquanto que a utilização de um agonista de dectina-1 manteve os níveis de citocinas em células expostas ao fungo (TAVARES, 2012). Trabalhos realizados utilizando monócitos humanos mostraram evidências da participação desses dois receptores no reconhecimento da proteína gp43 (BONFIM, et al., 2009). Esses resultados sugerem a ocorrência da sinalização via MR e dectina-1 na infecção por *P. brasiliensis*.

Outro grupo de receptores que tem sido associado a mecanismos de resistência a infecções por fungos é a família de receptores do tipo Toll (TLRs). Esses receptores estão presentes em células como os macrófagos, neutrófilos e monócitos, que devido a sua importante atividade fagocítica, são conhecidamente essenciais na resposta inata durante a infecção pelo fungo *P. brasiliensis* (CALICH et al., 2008; ROMANI, 2011). Trabalhos utilizando camundongos deficientes em receptores TLR2 infectados por *P. brasiliensis* mostraram um aumento na resposta Th17, com elevado infiltrado de polimorfonucleares, relacionado com uma menor carga fúngica e manifestações menos graves da doença (LOURES et al., 2009). Além disso, Calich e colaboradores demonstraram que o reconhecimento via TLR2 e TLR4 induz a fagocitose, mas não a morte do fungo, permitindo uma maior sobrevivência e proliferação da levedura no interior de macrófagos (CALICH et al., 2008). Mais recentemente, Tavares e colaboradores (2012) mostraram evidências de que a expressão de genes relacionados aos receptores do tipo toll é reduzida quando o reconhecimento do fungo é via dectina-1, induzindo uma resposta de perfil Th1 e controle da infecção. Isso mostra que o reconhecimento por receptores toll influenciam no perfil de resposta e na progressão da doença.

Durante uma infecção por *P. brasiliensis*, diversos receptores podem ser ativados, e podem exercer influências na ativação de células do sistema imune inato e na liberação de mediadores, e, conseqüentemente, na gravidade da doença desenvolvida pelo hospedeiro (CALICH, et al., 2008).

1.3.2 - Resposta celular do hospedeiro na infecção por *P. brasiliensis*

Estudos pioneiros sobre a imunologia da PCM evidenciaram que a resistência à infecção por *P. brasiliensis* é, principalmente, associada a imunidade celular, com ativação efetiva de fagócitos resultando na formação de granulomas bem organizados, importantes na destruição do fungo por macrófagos alveolares. Células *natural killer* (NK), neutrófilos, monócitos e macrófagos desempenham papel central na resistência do hospedeiro ao *P. brasiliensis*. A interação com esse patógeno induz a liberação de citocinas que ativam essas células que atuam na resposta inflamatória e na morte do fungo (CALICH et al., 2008).

Os macrófagos são as primeiras células que interagem com *P. brasiliensis*, sendo as principais células de defesa em infecções causadas pelo fungo (PINA et al., 2008, BORGES-WALMSLEY et al., 2002). Esporos fúngicos inalados alcançam os espaços alveolares, onde são fagocitados por macrófagos alveolares residentes, responsáveis pela contenção do fungo por meio da sua capacidade fagocítica e de inibição de replicação do micro-organismo (CALICH et al., 2008). *In vivo*, *P. brasiliensis* multiplica-se intracelularmente após a ingestão por macrófagos pulmonares não ativados, os quais são lisados liberando numerosas células leveduriformes (BRUMMER et al. 1989; KURITA et al., 2000). Entretanto, análises *in vitro* demonstraram que macrófagos alveolares ativados com IFN- γ têm habilidade para matar células leveduriformes e conídeos de *P. brasiliensis*, sugerindo o papel essencial desse mediador para a defesa do hospedeiro contra o fungo (BRUMMER et al., 1989; CANO et al., 1992). Estudos realizados mostraram a importância dos processos de ativação celular, principalmente por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , para que essas células sejam capazes de exercer suas funções na resposta contra o patógeno. A depleção de IFN- γ , tanto em camundongos resistentes quanto em susceptíveis, provoca o agravamento da lesão pulmonar, além de possibilitar a

disseminação do fungo para outros tecidos (CANO et al., 1998; CALVI ET AL., 2003a; 2003b).

Gonzalez e colaboradores (2000) verificaram que a capacidade de macrófagos ativados em eliminar o patógeno está relacionada com a produção de espécies reativas de nitrogênio, como óxido nítrico (NO). Mais recentemente, evidências mostraram que, além de metabólitos de nitrogênio, espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na atividade fungicida de macrófagos ativados com IFN- γ ou TNF- α (MOREIRA et al., 2008). Baixos níveis de IL-10 associado a altos níveis de IFN- γ , responsáveis por inibir e ativar iNOS, respectivamente, contribuem para a produção de óxido nítrico e controle da replicação fúngica (SOUTO et al., 2000). Além disso, IFN- γ também é responsável por estimular macrófagos infectados por *P. brasiliensis* a secretar TNF- α , sendo este essencial para a formação e persistência de granulomas bem formados, recrutamento e acúmulo de macrófagos e, juntamente com IFN- γ , induz uma atividade microbicida (CORRADIN et al., 1991 ; LEENEN et al., 1994; SOUTO et al., 2000). Em animais deficientes na produção de IFN- γ ou em receptores de TNF- α foi observado um aumento no número de células fúngicas viáveis levando os animais a morte devido à disseminação fúngica precoce (CANO et al., 1998; SOUTO, et al., 2000). Esse aumento na susceptibilidade foi associado à redução na produção de óxido nítrico (NO) e na formação de granulomas frouxos, demonstrando a importância de IFN- γ e TNF- α no controle da infecção por *P. brasiliensis* (BORGES-WALMSLEY et al., 2002; SOUTO et al., 2000). Em conformidade com esses estudos, pacientes com forma grave da PCM produzem baixos níveis de IFN- γ e TNF- α , confirmando a importância dessas citocinas no controle da doença (BAVA, et al., 1991).

Recentemente, Santos e colaboradores (2013) demonstraram a importância do sistema de atividade da enzima 5-lipoxigenase (5-LO) no controle da infecção por *P. brasiliensis*. Foi observado um aumento na susceptibilidade de animais deficientes para a enzima 5-LO, sendo essa susceptibilidade associada a alterações no recrutamento inflamatório em estágios iniciais da infecção, disseminação fúngica e resposta inflamatória pulmonar exacerbada. Além disso,

os leucotrienos, principalmente o leucotrieno B₄, foi apontado como o principal mediador dependente de 5-LO envolvido na fagocitose e morte do fungo (SANTOS et al., 2013). Além desses mediadores, estudos realizados *in vitro* mostraram o envolvimento de IL-1 β e ativação de inflamassoma na resposta de células dendríticas infectadas com *P. brasiliensis*. Animais deficientes para o receptor IL-1R1 apresentaram uma elevada carga fúngica, mostrando a importância da sinalização via IL-1 β na atividade fungicida contra o fungo *P. brasiliensis* (TAVARES et al., 2013)

A interação inicial entre macrófagos alveolares e células de *P. brasiliensis* parece governar os mecanismos subsequentes da imunidade inata e adaptativa, que resultam no controle da infecção ou doença disseminada (PINA et al., 2008). Ao interagir com macrófagos, o fungo induz a liberação de mediadores quimiotáticos que atraem neutrófilos, sendo estas as primeiras células a chegarem ao sítio da infecção, e essenciais para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva do hospedeiro (FORTES et al., 2011). Os neutrófilos são caracterizados como células efetoras na infecção por *P. brasiliensis*, por apresentarem atividade fungicida contra o fungo após a ativação mediada por citocinas, como IFN- γ e TNF- α (PINA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007). Além disso, pacientes que apresentam quadros clínicos de paracoccidiodomicose ativa apresentam os polimorfonucleares com atividade fungicida prejudicada em comparação com indivíduos saudáveis (PINA et al., 2006). Estudos demonstraram que a morte de *P. brasiliensis* por neutrófilos visualizada em camundongos infectados foi correlacionada com a capacidade dessas células em produzir intermediários reativos de oxigênio, como peróxido de hidrogênio e ânion superóxido (COSTA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007). Além de radicais livres, os neutrófilos também produzem no sítio inflamatório enzimas como elastases e metaloproteinases. Essas enzimas podem levar a destruição dos tecidos do hospedeiro, sendo responsáveis por muitas das imunopatologias observadas em processos inflamatórios crônicos (Silva, 2010).

O controle da doença na fase inicial da infecção também está relacionado com a presença de células NK ativadas. Estas são produtoras das citocinas pró-inflamatórias que são responsáveis pela modulação da resposta imune, além de

apresentarem uma função citotóxica contra leveduras de *P. brasiliensis*. Em casos mais graves da doença, as células NK apresentam uma baixa atividade, o que está relacionado com o aumento das lesões e progressão para uma doença mais agressiva (PAGLIARI et al., 2010; LONGUI et al., 2012).

A ativação de linfócitos B e a consequente elevação nos títulos de anticorpos, como os dos isotipos IgE, IgG4 e IgA, estão frequentemente relacionados com a disseminação do fungo e progressão da forma mais grave da doença. Elevado número de células fúngicas viáveis também está associado com esse perfil de resposta mediada por anticorpos (CALICH et al., 1998; BORGES-WALMSLEY et al., 2002; MAMONI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002). Entretanto, um estudo recente mostrou que a ausência de células B resulta em uma elevada mortalidade, relacionada com um influxo intenso de mononucleares para o pulmão e a formação de granulomas frouxos e desorganizados, impedindo o controle da carga fúngica. Portanto, células B parecem estar envolvidas de maneira efetiva no controle da carga fúngica e na organização das lesões granulomatosas observadas durante a PCM experimental (TRISTÃO, et al., 2013).

A PCM induz uma intensa ativação do sistema imune que é dependente da dinâmica das interações entre o micro-organismo e o hospedeiro. O estudo dos mecanismos resultantes dessa interação é de extrema relevância para a avaliação da resposta imune de pacientes com PCM e assim para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2. Justificativa

Paracoccidioides brasiliensis é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma das micoses sistêmicas mais importantes da América Latina, especialmente no Brasil onde se apresenta o maior número de casos relatados. Além da elevada prevalência, a PCM é motivo de preocupação devido ao difícil tratamento que, frequentemente é prolongado e, em alguns casos, dependendo do medicamento de escolha, pode se associado a fortes efeitos colaterais. Além disso, a falta de relato de casos e estudos mais precisos sobre a doença levou a sua inclusão na lista das doenças negligenciadas.

A PCM depende de múltiplos fatores, relacionados tanto ao fungo e também ao hospedeiro. Dessa maneira é essencial o entendimento de fatores de virulência do fungo e da resposta imune do hospedeiro frente a esses fatores, uma vez que ambos estão intimamente relacionados entre si e influenciam a progressão e persistência da doença.

Existem evidências de que células de *P. brasiliensis* podem sintetizar a melanina nos tecidos do hospedeiro. Apesar dos avanços no entendimento relacionados a esse fator de virulência, ainda falta uma investigação mais profunda sobre o papel da melanina durante a PCM experimental e, mais diretamente, sobre a resposta do hospedeiro.

Nesse contexto, este estudo visa compreender o papel da melanina na infecção pelo fungo *P. brasiliensis*, utilizando diferentes modelos experimentais de infecção, buscando entender os mecanismos da resposta imune do hospedeiro desencadeados devido à presença desse fator de virulência, assim como, sua influência nas manifestações clínicas da doença.

3. Objetivos

3.1. Objetivo principal

Avaliar o papel da melanina produzida por *P. brasiliensis* na indução da resposta imune do hospedeiro, aprofundando no entendimento sobre os fatores responsáveis pela interação entre micro-organismo e o hospedeiro na evolução da paracoccidiodomicose.

3.2 - Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito da presença da melanina em células fúngicas durante a infecção pulmonar experimental pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, considerando os seguintes parâmetros:
 - a. Recuperação do fungo no parênquima pulmonar, no espaço alveolar, fígado, baço, cérebro;
 - b. Cinética de recrutamento de leucócitos para o espaço alveolar;
 - c. Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar, fígado e baço;
 - d. Ativação de macrófagos presentes no parênquima pulmonar, no tecido do fígado e do baço;
 - e. Concentração de citocinas no parênquima pulmonar e no espaço alveolar;

2. Avaliar a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais infectados com leveduras melanizadas e não melanizadas do fungo *P. brasiliensis*, *in vitro*, através de:
 - a. Fagocitose de macrófagos peritoneais infectados com leveduras melanizadas e não melanizadas de *P. brasiliensis*;
 - b. Índice de proliferação intracelular de leveduras melanizadas e não melanizadas;
 - c. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) no interior de macrófagos infectados com o fungo *P. brasiliensis* na condição melanizadas e não melanizada;

3. Estabelecer um modelo de infecção na pata em camundongos selvagens por meio de infecção intra-plantar da fase leveduriforme do fungo avaliando os seguintes parâmetros:

- a. Padronização do inóculo e da cinética da infecção;
- b. Avaliação de edema na pata;
- c. Recuperação do fungo do linfonodo poplíteo, medula óssea, fígado e baço;

4. Estudar o papel da melanina utilizando o modelo de infecção experimental intra-plantar;

- a. Recuperar fungo da pata, linfonodo poplíteo, fígado, baço, medula óssea, glândula supra-renal;
- b. Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido da pata;
- c. Ativação de macrófagos presentes na pata;

4. Materiais e Métodos

4.1 - Cultivo e manutenção das amostras fúngicas

Neste trabalho foi utilizada a amostra Pb18 cedida, gentilmente, pela Professora Patrícia Silva Cisalpino do Laboratório de Biologia de Micro-organismos, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

As amostras foram mantidas em meio líquido YPD (“Yeast Peptone Dextrose” - extrato de levedura 1%; peptona 2%; dextrose 2%; água destilada) na fase leveduriforme sob constante agitação a 37°C com repiques semanais. Para a utilização nos experimentos, as amostras foram submetidas a uma passagem em camundongos selvagens, onde foi realizada inoculação pela via intratraqueal seguida de eutanásia dos animais após 48 h de infecção. Para a recuperação do fungo, os pulmões foram removidos, macerados com auxílio de pistilo e homogeneizados em PBS estéril. A suspensão obtida foi semeada em placas de petri contendo meio Brain Heart Infusion Agar (BHI) suplementado com 4% de soro fetal bovino, 5% de fator de crescimento e 50 mg/L de cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa (BOD Q-315, QUIMIS) a 37°C e as colônias recuperadas foram utilizadas para o preparo do inóculo fúngico.

4.2 - Cultivo das amostras fúngicas na presença de L-DOPA

As leveduras de *P. brasiliensis* recuperadas da infecção citada no item 4.1 foram cultivadas em meio YPD, suplementado com 1 mM de L- 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), a 37°C, por 7 dias. Foi feita análise microscópica de preparações à fresco para verificar a produção do pigmento melanina.

4.3 - Animais

Foram utilizados camundongos machos das linhagens C57BL/6J (6-8 semanas), com 20-30 gramas de peso, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CeBio). Os camundongos foram divididos em grupos de 6 animais por gaiola. Não houve restrições alimentares e foi fornecida ração comercial e uma garrafa de água por gaiola. O fornecimento

de tais itens foi verificado diariamente. Foram mantidos ciclos de claro/ escuro com duração de 12 horas cada.

Esse projeto possui aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo número 163/2012.

4.4 - Padronização e preparo do inóculo

As células fúngicas foram obtidas a partir da recuperação de colônias de infecção pulmonar como descrito no item 4.1. As colônias da amostra foram recolhidas e ressuspensas em meio YPD com e sem L-DOPA, e após 5-7 dias de crescimento as células fúngicas foram lavadas três vezes em tampão fosfato – PBS (*Phosphate buffer solution*) (pH 7,2) estéril (centrifugação a 9000 x g por 5 minutos). Depois da última lavagem, foram adicionados 5 ml de PBS, as partículas maiores sedimentadas, e a porção contendo leveduras isoladas foi coletada. A viabilidade das células foi determinada utilizando o corante Verde Janus e a contagem das leveduras foi feita em Câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada de acordo com o modelo experimental a ser realizado, especificado nos respectivos subitens a seguir.

4.5 - Infecção pulmonar por inoculação intratraqueal (i.t) por *P. brasiliensis*

Antes da inoculação todos os camundongos foram anestesiados com uma solução de cetamina(100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) em PBS pela via intraperitoneal (i.p.). Aproximadamente 10 minutos após a administração desta solução, os camundongos foram submetidos a inoculação do fungo. Para isso, foi realizada uma pequena incisão transversal na pele do pescoço do animal, próxima da região da glândula tireóide, e após a separação das camadas de tecidos, a traquéia foi exposta e injetados 30µL da solução fúngica (1×10^6 leveduras/ animal). Imediatamente após a inoculação, a incisão foi suturada e os camundongos mantidos aquecidos em placa aquecedora. Como controle negativo, os animais receberam 30µL de PBS estéril pela mesma via.

4.6 - Lavado broncoalveolar (LBA)

O lavado broncoalveolar foi realizado para obtenção de leucócitos presentes no espaço alveolar, também dosagem de citocinas. Após eutanásia, a traquéia de cada animal foi exposta e canulada com um cateter de polipropileno 1,7 mm. O lavado foi realizado pela injeção de três alíquotas de 1 ml de PBS estéril gelado, injetadas e coletadas três vezes cada uma, obtendo-se, aproximadamente, 2 ml de volume final recuperado do lavado. O fluido recolhido do lavado foi centrifugado a 128 x g, por 5 minutos a 4º, e o sobrenadante resultante foi coletado e armazenado em freezer -20°C para posteriores ensaios de detecção de citocinas e quimiocinas. O sedimento de células foi suspenso em 100 µL de albumina (0,3%) e utilizado para contagem total e diferencial e leucócitos.

4.7 - Contagem total e diferencial das células do lavado broncoalveolar

A contagem do número total de leucócitos presentes no lavado foi realizada na diluição de 10 vezes empregando a solução de Turk em câmara de Neubauer e visualização em microscópico óptico. A contagem diferencial das células foi realizada em lâminas preparadas em citocentrífuga, a 100 x g por 5 minutos, e submetidas a coloração com kit panótico rápido (LABORCLIN), seguida de visualização em microscópio óptico, em objetiva de imersão (100x). Para cada lâmina visualizada foram contados um total de 100 leucócitos, diferenciados por critérios morfológicos em dois tipos celulares: neutrófilos e mononucleares. A quantidade de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células. Os valores obtidos foram expressos em número de células por ml de lavado.

4.8 - Determinações de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos tecidos coletados e LBA de animais infectados com *P. brasiliensis*

Após a infecção os animais foram eutanasiados e os tecidos (parênquima pulmonar, fígado, baço, sangue, cérebro, pata, linfonodo poplíteo) foram retirados e pesados, sendo que o linfonodo poplíteo foi retirado inteiro. Em seguida os fragmentos dos tecidos foram macerados e homogeneizados em 1 ml e o linfonodo em 50µL de PBS estéril. Alíquotas de 100 e 50µl,

respectivamente, dessas suspensões ou do fluido LBA foram semeadas, em duplicata com auxílio de bastões de vidro, em placas de Petri, contendo meio de cultura ágar infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion Agar- BHI*), suplementado com 5% de fator de crescimento (filtrado de cultura de células leveduriformes da linhagem B339 de *P. brasiliensis*), 4% de soro fetal bovino e 40 mg/ml de gentamicina. Em seguida as placas foram incubadas em estufa, sob câmara úmida a 37°C. As colônias foram contadas após 15 dias de crescimento e o resultado expresso em número de UFC por 100 mg de órgão, ou por ml de lavado ou por linfonodo.

4.9 - Quantificação da mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos no tecido foi analisado pelo ensaio de atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO). Os fragmentos de tecido dos animais controle e submetidos à infecção foram removidos após a infecção e congelados. Após o descongelamento, o tecido (1g para 19 ml de tampão) foi homogeneizado em tampão pH 4,7 (0,1M NaCl, 0,02M NaPO₄, 0,015M NaEDTA), centrifugado à 9000 g por 10 min, descartando-se o sobrenadante. O precipitado sofreu lise hipotônica (15 mL de solução 0,2% de NaCl durante 30 segundos seguida pela adição de igual volume da solução contendo 1,6% de NaCl e 5% de glicose). Após centrifugação, o precipitado foi suspenso em tampão 0,05 M NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizado. Alíquotas da suspensão sofreram três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e serão, sucessivamente, centrifugadas por 10 min a 9000 x g, coletando-se o sobrenadante para o ensaio enzimático. A atividade de MPO foi medida por mudanças da densidade óptica (D.O.) a 450 nm usando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). Os resultados foram expressos em unidades relativas de acordo com uma curva padrão de neutrófilos preparada a partir do acúmulo induzido na cavidade peritoneal de camundongos estimulados com caseína 5%.

4.10 - Detecções dos níveis de N- acetilglicosaminidase (NAG) nos tecidos infectados

O acúmulo de macrófagos no tecido foi avaliado pelo ensaio de atividade enzimática da N-actilglicosaminidase (NAG). Fragmentos dos tecidos (100mg) foram homogeneizados em tampão 0,1 M NaCl; 0,02 M NaPO₄; 0,015 M NaEDTA) pH 4,7 (100 mg para 1,9 de tampão), centrifugado a 9000 x g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi submetido à lise hipotônica (1,5 ml de solução 0,2% de NaCl durante 30s seguida pela adição de igual volume da solução contendo 1,6% NaCl e 5% de glicose). A seguir foram centrifugadas a 9000 x g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspenso e homogeneizado em 1 ml de salina 0,9% com 0,1% v/v de Triton X-100, centriifugadas por 10 minutos a 9000 x g, e o ensaio realizado com o sobrenadante coletado. Os níveis de NAG foram determinados pela alteração na densidade ótica (D.O.) durante leitura em espectrofotômetro de microplacas com comprimento de onda de 405 nm utilizando o substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidina (SIGMA) e tampão glicina 0,2M (pH 10,6). O acúmulo de macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão da atividade de NAG expressa a partir de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos com tioglicolato 3%. Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos em 100 mg de tecido.

4.11 - Quantificações de citocinas e quimiocinas

As concentrações de citocinas e quimiocinas foram quantificadas através do método imunoenzimático (ELISA) utilizando kits comerciais (*Kits DuoSet, R&D Systems*). Os tecidos infectados e controle foram homogeneizados em PBS (0,4 mM NaCl, 10 mM NaPO₄) com inibidores de proteases (0,1 mM PMSF, 0,1 mM Benzethonium clorídrico, 10 mM EDTA e 0,01 mg/mL Aprotinina A, pH 7.4) e Tween 20 (0,05%), centrifugados por 10 minutos a 8944 x g e o sobrenadante utilizado para ELISA. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems). Os anticorpos de captura purificados e diluídos em PBS foram ligados a uma fase sólida na base dos poços de placa de 96 poços e esta incubada *overnight* a 4°C. Após sucessivas lavagens foi adicionado tampão fosfato com 1% de BSA (tampão bloqueio) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)

e incubados por uma hora. Após lavagens, as amostras foram então adicionadas e incubadas *overnight* a 4°C permitindo a formação de um complexo pela ligação com o anticorpo, e removendo-se, com a lavagem, os que não se ligarem. A curva padrão com as citocinas recombinantes foi preparada de acordo com as instruções do fabricante. Um segundo anticorpo (de detecção) foi adicionado ligando-se ao antígeno. Após lavagens sucessivas foi adicionada a solução do conjugado estreptovidina/ biotina. As placas foram submetidas a novo ciclo de lavagem e foi adicionada a solução de OPD. A reação foi bloqueada com a adição de 1M de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura da densidade óptica foi avaliada em espectrofotômetro de microplacas com filtro de 492 nm. A concentração das citocinas foi calculada a partir da curva padrão e os resultados expressos em picogramas de proteína por 100 mg de tecido.

4.12 - Isolamento e cultivo de macrófagos murinos

Macrófagos peritoneais foram obtidos a partir da injeção intraperitoneal de 2 ml de tioglicolato 3% estéril (300 mg de caldo tioglicolato, 42 mg de NaHCO₃ em 10 ml de PBS). Após 3 dias, os camundongos foram eutanasiados e os macrófagos retirados por meio da lavagem da cavidade peritoneal com 3 ml de PBS estéril. O lavado coletado foi adicionado em tubos plásticos de 50 ml e submetidos à centrifugação por 10 minutos a 300 x g. O sedimento celular foi reconstituído em 10 ml de meio de cultura RPMI-1640 (Cultilab) e submetido a novo ciclo de centrifugação. O sobrenadante foi removido e o sedimento celular suspenso em 1 ml de meio RPMI 1640 completo (suplementado com 5% de soro fetal bovino e 50 mg/ml de gentamicina - RPMI-C). A contagem do número total de células e sua viabilidade foram realizadas empregando corante Azul de Trypan em câmara de Neubauer. A quantidade de macrófagos foi ajustada para 2x 10⁵/ poço e as células depositadas sobre lamínulas de 3 mm estéreis presentes no fundo dos poços de placas de 24 poços, seguido de incubação em estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂. Após um período de duas horas as células não aderidas foram removidas por lavagens consecutivas com meio RPMI-1640 e foi acrescentado meio RPMI-C, seguido de incubação por um período de 18 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Os

macrófagos foram tratados ou não com 100U/ ml de IFN- γ murinho recombinante durante este período e incubados ou não com melanina a 20 μ g/ml.

4.13 - Ensaio de fagocitose

Os inóculos contendo leveduras de *P. brasiliensis* nas condições melanizada e não melanizada foram preparados conforme descrito anteriormente, ajustado para a concentração 10⁶ células/poço (razão de 5 leveduras para cada macrófago) e adicionados à cultura de macrófagos. As culturas foram incubadas durante 6, 10 e 24 horas a 37°C e, atmosfera de 5% de CO₂. As lamínulas foram lavadas com PBS estéril para remoção das células não internalizadas, fixadas com metanol absoluto gelado e coradas com Giemsa. Foi realizada a contagem de macrófagos e de leveduras internalizadas para a determinação do índice de fagocitose (IF), definido pela equação: $IF = P \times F$, onde P é a porcentagem de macrófagos com levedura internalizada e F é o número médio de células de levedura por macrófago. Os experimentos foram realizados por grupos.

4. 14 - Ensaio de proliferação intracelular

Para os ensaios de proliferação intracelular, os macrófagos foram infectados com leveduras de *P. brasiliensis* melanizadas e não melanizadas, conforme descrito acima. Após seis horas de incubação, as leveduras não internalizadas presentes no sobrenadante foram removidas a partir da lavagem dos poços e então meio RPMI-C, com ou sem melanina a 20 μ g/ ml, sem micro-organismo, foi adicionado aos poços. Após 10 e 24 horas os poços contendo cultura de macrófagos foram lavados com PBS estéril e, em seguida, adicionada água destilada para lisar os macrófagos. A suspensão resultante foi coletada e 100 μ l foram inoculados em meio de cultura ágar BHI suplementado para, após 15 dias de incubação em estufa a 37°C, avaliar a presença de fungos viáveis. A taxa de proliferação intracelular foi calculada pela divisão do número de leveduras intracelulares viáveis após 24 horas, pelo número de leveduras viáveis após 10 horas de infecção de macrófagos.

4.15 - Quantificações da produção de ROS e RNS pelos macrófagos no ensaio de fagocitose

Os níveis endógenos de ROS e RNS foram medidos por meio de análise da fluorescência emitida pelo tratamento das suspensões com sondas marcadoras de cada radical. Para avaliar níveis de ROS, ONOO⁻ e NO, os sobrenadantes das culturas de macrófagos, 30 minutos e 1 hora após infecção com *P. brasiliensis* nas condições descritas acima, foram incubados com 50 µM da sonda 2', 7' diacetato diclorodihidrofluoresceína (DCDHF-DA, Invitrogen), 25 µM de dihidrorodamina 123 (DHR 123, Invitrogen) e 10µM de 4-amina-5- metilamina-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM, Invitrogen), respectivamente. DCDHF-DA é permeável em células e não emite fluorescência, mas em presença de ROS é convertido em 2', 7' diclofluoresceína (DCF) que se mantém no interior das células emitindo fluorescência. DHR 123, na presença de ONOO⁻, é convertido em Rodamina 123 que emite fluorescência (KOOY et al., 1994). DAF-FM quantifica baixas quantidades de NO em solução e é virtualmente não fluorescente até reagir com NO, formando um bezotriazol fluorescente. Em todas as análises, a fluorescência foi determinada em fluorímetro (Synergy 2, BIOTEK, USA) em comprimento de onda de 485nm e medindo emissão a 530nm.

4.16 - Modelo de infecção intra-plantar com *P. brasiliensis*

Os camundongos foram inoculados, de maneira bilateral, na região da pata por meio de infecção intra-plantar (i. pl.) onde foi injetado, com o auxílio de uma seringa de 1 mL, 30µL da suspensão de células fúngicas nas concentrações de 1x10⁵, 1x10⁶ e 1x10⁷ células/30µL. Os animais do grupo controle receberam injeção de 30µL de PBS pela mesma via de infecção utilizada para o grupo experimental. Os animais foram eutanasiados em diferentes tempos após a infecção (3, 7, 10, 15 e 30 dias) para as análises dos parâmetros inflamatórios.

4.17 - Avaliação de edema na pata

Os animais inoculados pela via intra-plantar foram observados para avaliação de edema. Com o auxílio de um hidropletismômetro, foi realizada a mensuração da pata antes da infecção (medida basal) e a cada 3 dias após a infecção. Os

valores obtidos foram comparados com os valores referentes aos animais não infectados.

4.18 - Análise estatística

Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) por meio da análise de variância (ANOVA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. Resultados

5.1 - Presença da melanina em células fúngicas durante a infecção pulmonar experimental

Para avaliar o efeito da presença da melanina em células de *P. brasiliensis* durante infecção pelo fungo, verificou-se a resposta de animais à inoculação pulmonar de leveduras nas condições melanizadas e não melanizadas.

A análise da carga fúngica no pulmão de animais inoculados com o fungo na condição de não melanizada mostrou, após sete dias de infecção, a presença de leveduras, seguida de uma redução significativa na contagem de colônias, quinze e trinta dias após a infecção. De maneira semelhante, foram recuperadas células fúngicas de animais infectados com leveduras melanizadas no sétimo dia de infecção, seguida de redução significativa na contagem de colônias quinze e trinta após infecção. É importante ressaltar que a recuperação de colônias de *P. brasiliensis* no tecido pulmonar foi significativamente maior no grupo infectado com o fungo melanizado, em comparação com o fungo não melanizado. É importante ressaltar que foi possível recuperar colônias fúngicas após trinta dias de infecção nos animais inoculados com leveduras melanizadas. A presença da melanina, provavelmente, está relacionada com a cronificação da doença nesse órgão, uma vez que somente no grupo inoculado com leveduras melanizadas foi possível recuperar o fungo 30 dias após a infecção (FIGURA 1A). Um perfil semelhante foi observado na recuperação de leveduras do espaço alveolar dos animais infectados (FIGURA 1B).

Para avaliar a capacidade de disseminação das leveduras para outros órgãos do hospedeiro, foi feita uma análise da carga fúngica no baço, fígado, sangue e cérebro. Em nenhum dos animais submetidos à infecção com *P. brasiliensis* não melanizado foi observado disseminação da levedura para outros tecidos. Já nos animais inoculados com células melanizadas houve recuperação do fungo somente no fígado, sugerindo, que esse possa ser um foco secundário da infecção. No fígado, o pico de recuperação do fungo foi no sétimo dia após a infecção, seguido de diminuição significativa na contagem de colônias fúngicas após 15 dias (FIGURA 2C). Trinta dias após a infecção, houve completo controle

do crescimento do *P. brasiliensis*. Nos demais órgãos analisados, não foram recuperadas células fúngicas em nenhum dos tempos na infecção com leveduras melanizadas..

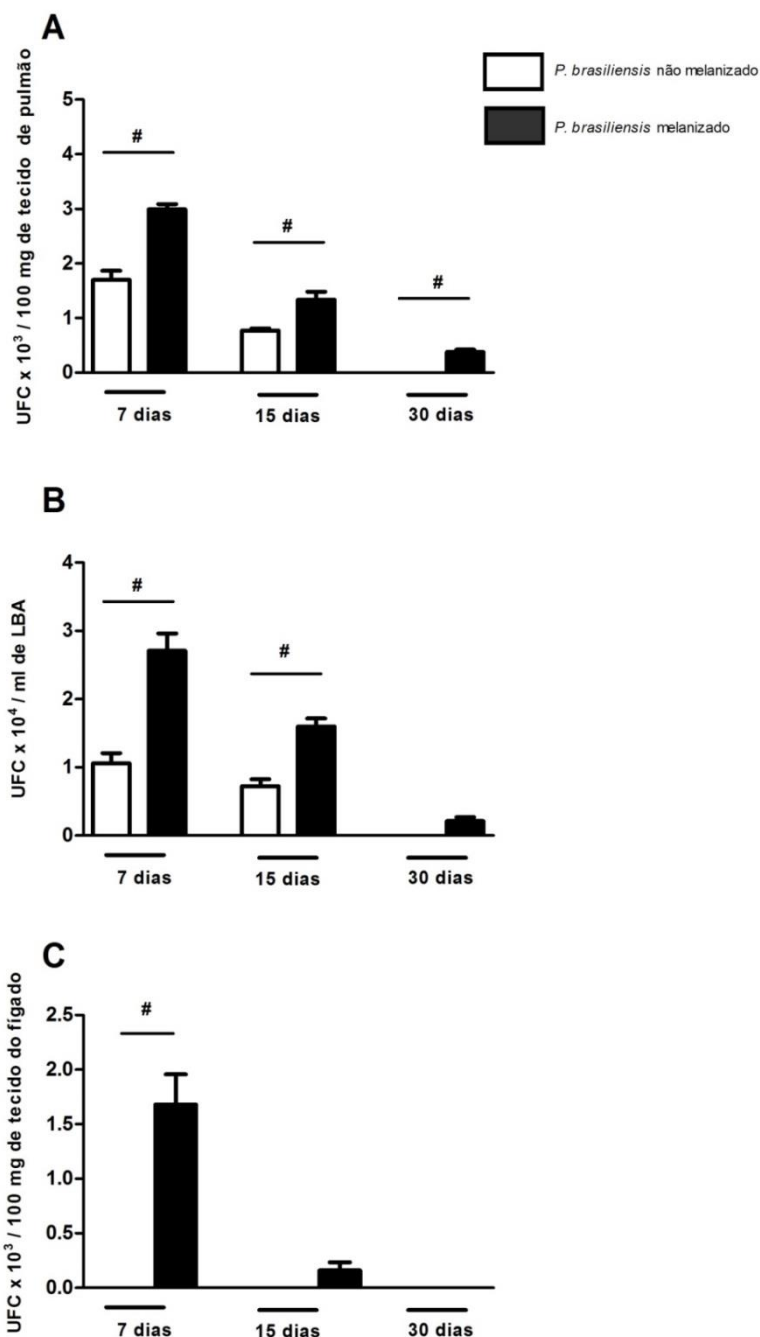


Figura 1 - Animais inoculados com leveduras melanizadas apresentam maior carga fúngica no pulmão, LBA e fígado. Animais foram inoculados pela via intratraqueal com 10⁶células fúngicas melanizadas ou não melanizadas e após sete, quinze e trinta dias de infecção foi realizada a avaliação da carga fúngica no pulmão (A), LBA (B) e fígado (C) dos animais. Os resultados estão expressos como o número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas por ml de LBA ou grama de tecido pulmonar ou do fígado (p<0,05). # diferença estatística entre diferentes grupos no mesmo tempo.

Tendo em vista a diferença da carga fúngica entre animais inoculados com leveduras melanizadas e não melanizadas, foi feita uma análise do recrutamento de células inflamatórias para o local da infecção. Animais submetidos à infecção com *P. brasiliensis* na condição de não melanizado não apresentaram aumento no infiltrado inflamatório de células em nenhum dos tempos avaliados, em comparação com o controle não infectado (FIGURA 2 A). Já a infecção com *P. brasileinsis* na condição de melanizado resultou em alterações significativas no infiltrado de células inflamatórias quando comparado ao controle, sendo observado um infiltrado de células totais significativamente maior, após sete dias de infecção, sendo que a diferença se manteve 15 e 30 dias após a infecção (Figura 2A). Em comparação com animais infectados com células fúngicas não melanizadas, observou-se maior recrutamento de células inflamatórias para o espaço alveolar em animais inoculados com leveduras melanizadas em todos os tempos avaliados (Figura 2A).

Com relação ao número de neutrófilos no sítio da infecção, foi observado um pico dessas células no espaço alveolar de animais infectados com *P. brasiliensis* não melanizado após sete dias de infecção, seguido de diminuição após 15 e 30 dias de infecção, retornando ao nível visualizado em animais não infectados. Dessa mesma maneira foi observado um aumento dessas células nos animais infectados com leveduras melanizadas após sete dias de infecção, em comparação com o controle. Após 30 dias, houve uma diminuição significativa nesse recrutamento neutrofílico, retornando ao nível observado em animais não infectados (Figura 2B). Na comparação entre animais inoculados com células fúngicas melanizadas e não melanizadas verificou-se um maior infiltrado de polimorfonucleares nos primeiros animais e essa diferença se manteve após 15 dias de infecção (Figura 2B).

Na avaliação do perfil de mononucleares em resposta ao fungo não melanizado não foi observado aumento no infiltrado de mononucleares no lavado broncoalveolar, em comparação com animais não infectados. Já animais infectados com o fungo melanizado apresentaram um aumento significativo dessas células no espaço alveolar após sete dias de infecção, em relação ao grupo controle. Este aumento foi mantido após 15 dias, e, depois de 30 dias de

infecção, o nível de mononucleares foi semelhante ao nível visualizado em animais não infectados (Figura 2C). Em comparação aos animais infectados com fungo não melanizado, foi observado um infiltrado de mononucleares significativamente maior em animais inoculados com leveduras melanizadas após sete dias de infecção, sendo essa diferença mantida após 15 dias de infecção.

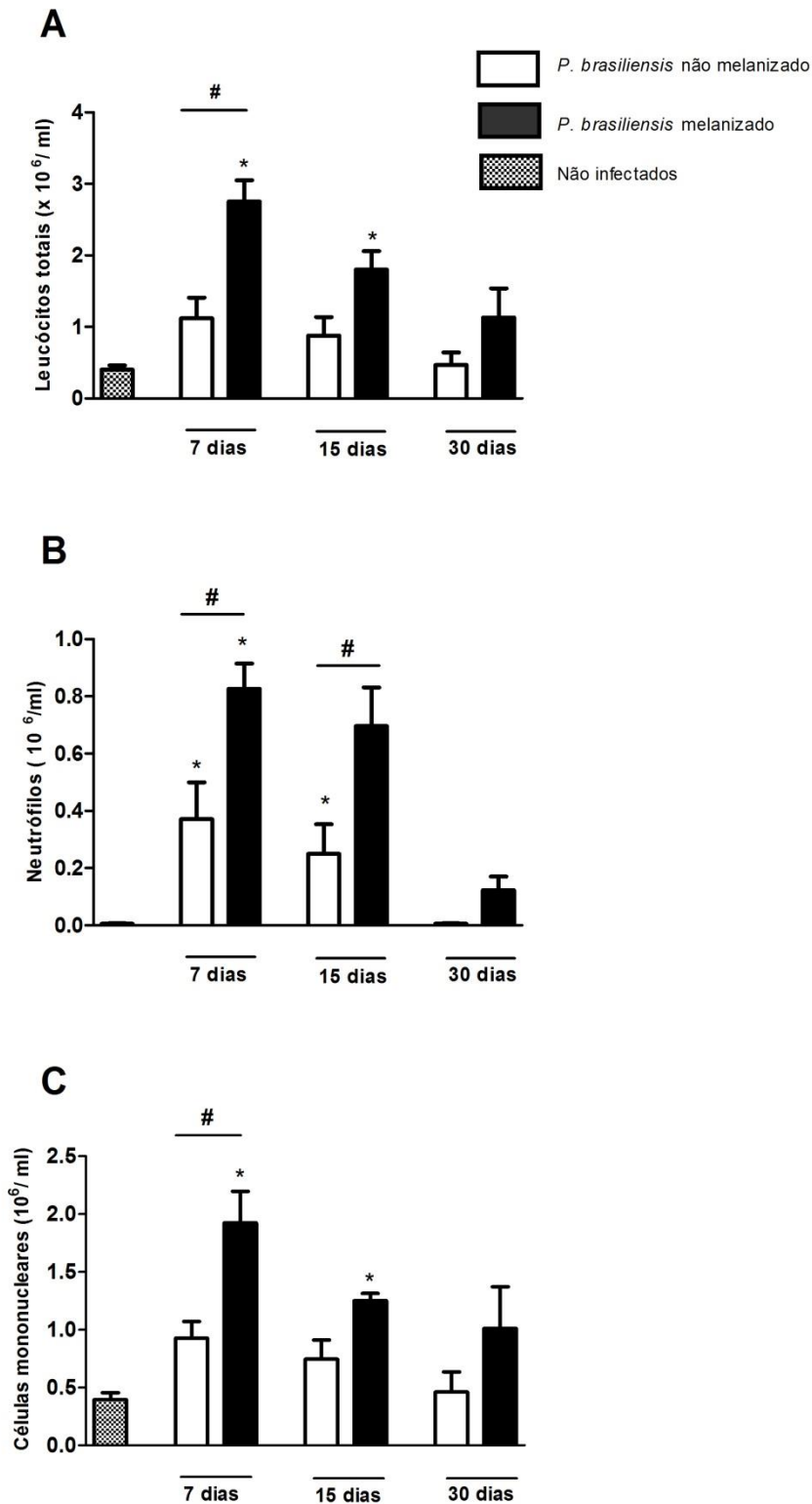


Figura 2 - Infecção usando leveduras melanizadas induz aumento no infiltrado inflamatório para o espaço alveolar. Animais foram inoculados com 10^6 leveduras melanizadas e não melanizadas de *P. brasiliensis* pela via intratraqueal e após sete, quinze e trinta dias de infecção foi obtido o LBA e feita a quantificação dos leucócitos totais (A), neutrófilos (B) e células mononucleares (C). Animais não infectados receberam PBS no lugar do inóculo. ($p < 0,05$). # diferença estatística entre diferentes grupos no mesmo tempo. * diferença estatística em relação ao grupo não infectado.

Foi também verificado o acúmulo de leucócitos nos tecidos de animais infectados com o fungo não melanizado e melanizado. Para tanto, foi avaliada a atividade de MPO no pulmão, fígado e baço dos animais, sendo esta uma medida indireta do acúmulo de neutrófilo no tecido analisado. Observou-se um aumento significativo no acúmulo de neutrófilos no parênquima pulmonar dos animais infectados com leveduras não melanizadas após sete dias de infecção, com redução significativa ao nível dos animais não infectados após 15 dias (Figura 3A). De maneira semelhante, os animais inoculados com o fungo melanizado apresentaram um acúmulo de neutrófilos nesse tecido após sete dias de infecção, seguida de redução após quinze dias. Entretanto, o grupo infectado com *P. brasiliensis* não melanizado apresentou níveis significativamente maiores de MPO em comparação ao grupo infectado com células melanizadas, no sétimo dia após a infecção (Figura 3A). Um perfil semelhante de acúmulo de neutrófilos foi observado nos tecidos do fígado e baço (Figura 3B e 3C, respectivamente).

Além da análise feita com relação ao acúmulo de neutrófilos, também foi avaliada o acúmulo de macrófagos no pulmão, fígado e baço de animais infectados com *P. brasiliensis* na condição não melanizada e melanizada. Isso foi feito por meio da medida da atividade de NAG. Na comparação com animais não infectados, a infecção com o fungo não melanizado induziu um acúmulo significativo de macrófagos no parênquima pulmonar após sete dias de infecção, seguido de um aumento significativo após quinze e trinta dias de infecção (Figura 4A). De maneira diferente, animais inoculados com leveduras melanizadas, inicialmente, não apresentaram alteração no acúmulo dessas células quando comparado com animais controle. Nos tempos de quinze e trinta dias após infecção foi observado um aumento significativo de macrófagos na comparação com animais não infectados. Comparando-se animais inoculados com leveduras melanizadas e não melanizadas foi observado uma diferença significativa no acúmulo de macrófagos entre esses animais nos três tempos analisados (Figura 4A), sendo que o acúmulo na infecção não melanizada foi maior (Figura 4A). O mesmo perfil de atividade de NAG foi observado no fígado e baço (Figura 4B e 4C, respectivamente).

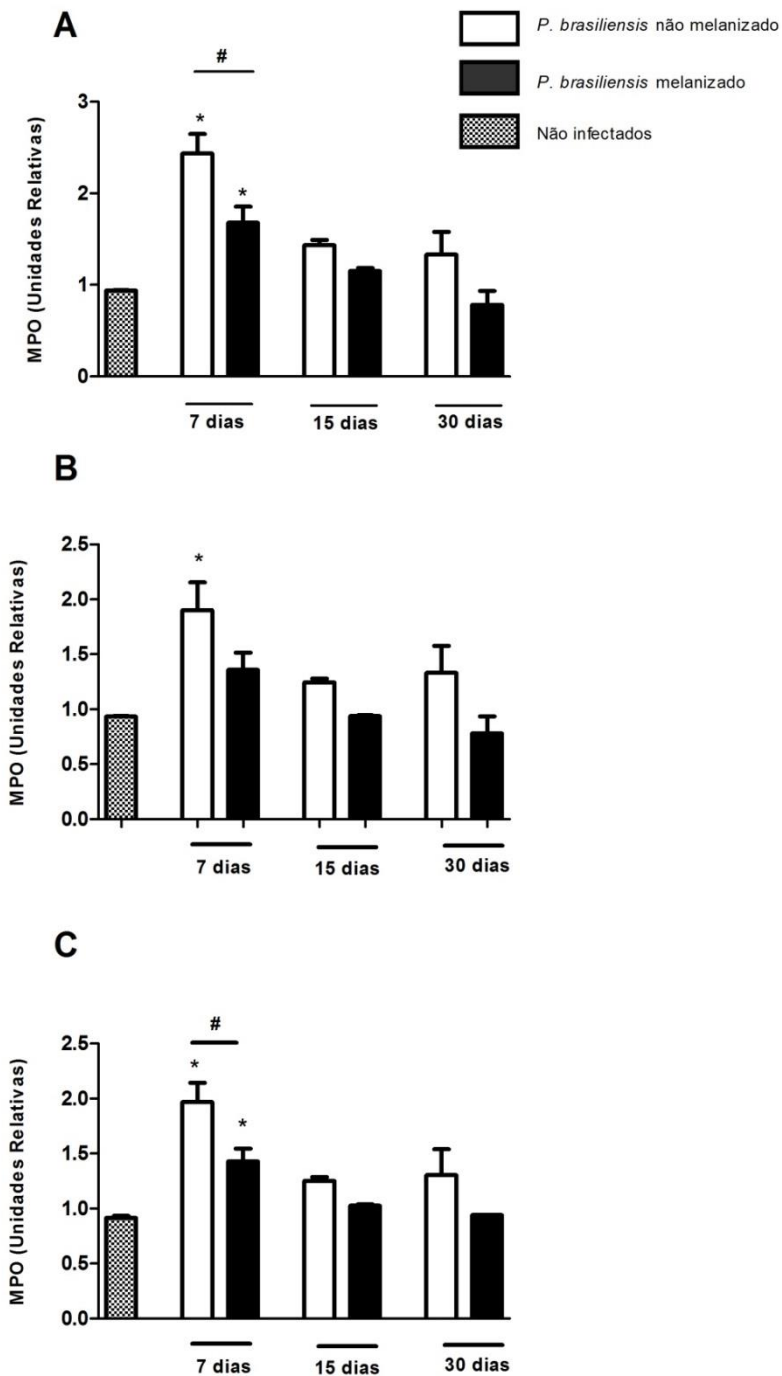


Figura 3 - A presença da melanina em células fúngicas altera o acúmulo de leucócitos no parênquima pulmonar, fígado e baço de animais após infecção com *P. brasiliensis*. Animais foram inoculados com leveduras melanizadas e não melanizadas de *P. brasiliensis* pela via intratraqueal e após sete, quinze e trinta de infecção os animais foram eutanasiados para a coleta dos tecidos e foi feita avaliação do acúmulo de neutrófilos no parênquima pulmonar (A), fígado (B) e baço (C). Animais não infectados receberam PBS no lugar do inóculo. ($p < 0,05$). # diferença estatística entre diferentes grupos no mesmo tempo. * diferença estatística em relação ao grupo dos não infectados.

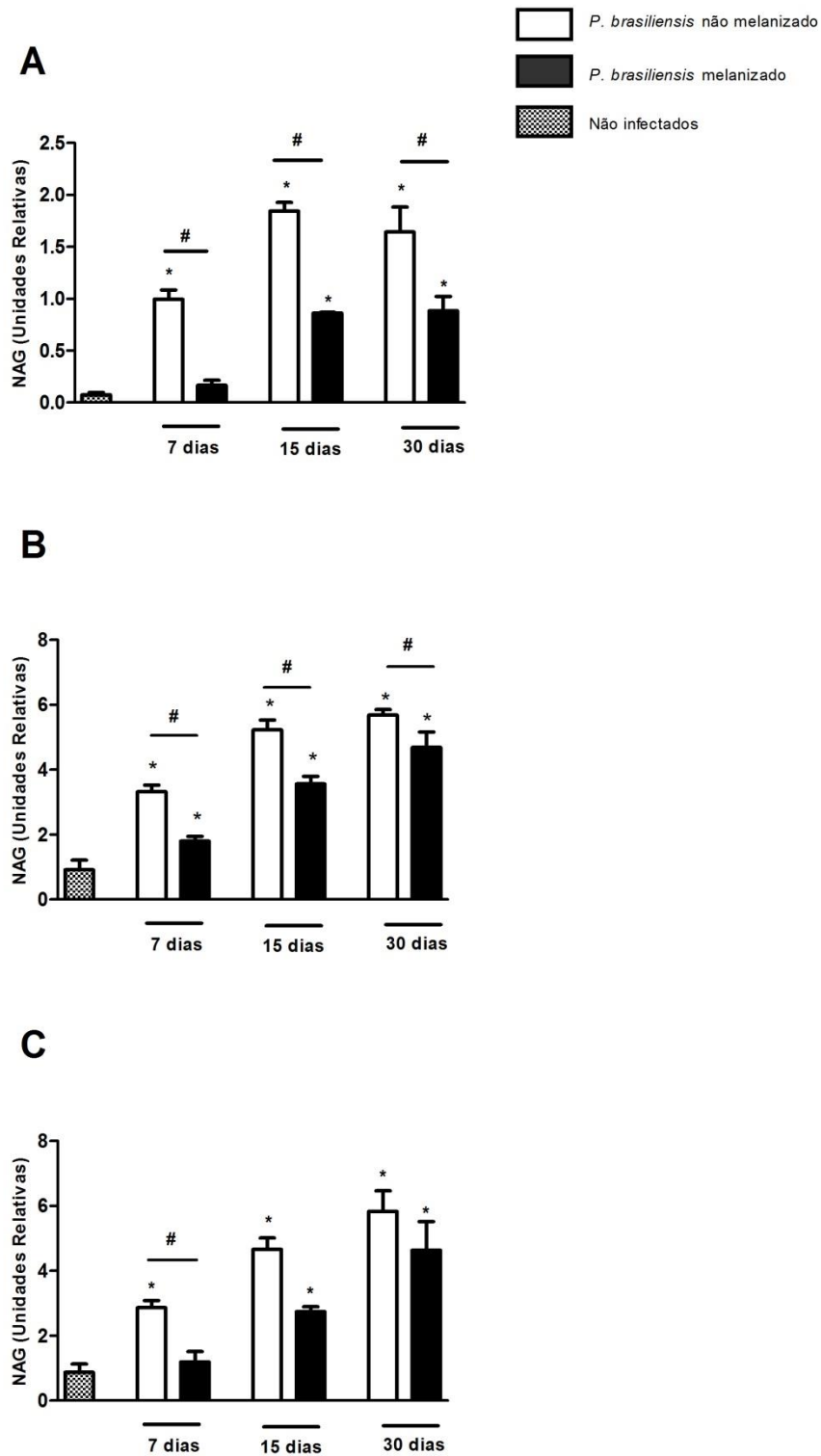


Figura 4 - A presença da melanina em células fúngicas altera o acúmulo de macrófagos no parênquima pulmonar, fígado e baço após infecção com *P. brasiliensis*. Animais foram inoculados com 10^6 leveduras melanizadas e não melanizadas de *P. brasiliensis* pela via intratraqueal e após sete, quinze e trinta de infecção foi feita avaliação do acúmulo de macrófagos no parênquima pulmonar (A), fígado (B) e baço(C). Animais não infectados receberam PBS no lugar do inóculo. ($p < 0,05$). # diferença estatística entre diferentes grupos no mesmo tempo. * diferença estatística em relação ao grupo não infetado.

Em seguida foi avaliada a participação da melanina na produção de citocinas no pulmão após infecção com *Paracoccidioides brasiliensis* na condição não melanizado e melanizado.

O grupo infectado com *P. brasiliensis* não melanizado apresentou produção significativamente maiores das citocinas IL-12, IFN- γ , TNF- α e IL-1 β e da quimiocina CXCL-1 no parênquima pulmonar em relação ao controle não infectado. O pico de produção dessas citocinas e quimiocina foi ao sétimo dia após a infecção, ocorrendo, posteriormente, diminuição de sua produção de maneira dependente do tempo (Figura 5). Para a citocina IL-6 houve um aumento significativo, em relação ao controle, após sete dias de infecção, sendo este mantido quinze e trinta dias após infecção. Em relação à citocina IL-1 β , um aumento significativo de sua produção foi observado somente nesses animais infectados com o fungo não melanizado, sendo, seu pico de produção, também no sétimo dia após a infecção (FIGURA 5F).

Nos animais infectados com células melanizadas, com relação à produção de IL-12, CXCL-1 e TNF- α , foi visualizado um pico na concentração das citocina e quimiocina no parênquima pulmonar após sete de infecção, em comparação com o controle, seguida de uma redução significativa 15 e 30 dias após a infecção. Para a citocina IL-6, houve um aumento na produção após sete dias de infecção, sendo que os níveis foram mantidos no 15^o dia de infecção seguido de redução significativa somente após trinta dias (Figura 5E). A infecção usando leveduras melanizadas não induziu a produção da citocina de IL-1 β , que manteve sua concentração constante e semelhante a aquela observada em animais não infectados em todos os períodos de tempo avaliados (Figura 5F). Não houve um aumento significativo na produção de IFN- γ , que manteve a concentração semelhante aos níveis basais em todos os tempos analisados (Figura 5C).

Na comparação entre os animais infectados com células não melanizadas e com melanizadas, verificou-se uma diferença nas concentrações de IFN- γ , IL-1 β e TNF- α somente após sete dias de infecção, sendo que o segundo grupo apresentou os menores níveis das citocinas (Figura 5C, D e F). Para IL-12 e CXCL-1, os níveis em animais infectados com leveduras melanizadas também

foram significativamente menores quando comparados com a infecção com a levedura não melanizada, sendo essa diferença presente até o décimo quinto dia da infecção. Não houve diferença na concentração de IL-6 entre animais infectados com leveduras melanizadas e não melanizadas em nenhum dos tempos analisados.

Em seguida, foi feita uma avaliação da produção de citocinas e quimiocinas no espaço alveolar após a infecção com *P. brasiliensis* nas condições não melanizado e melanizado. Com relação à citocina IL-12, não foi observado, em nenhum dos tempos analisados, aumento na produção da citocina em animais inoculados com leveduras não melanizadas, em comparação com animais não infectados (Figura 6A.). Para a quimiocina CXCL-1 e para as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-1 β , verificou-se um pico na concentração após sete dias de infecção com *P. brasiliensis* não melanizado, seguida de redução quinze e trinta dias após infecção, tempo após o qual, as produções retornaram aos níveis semelhantes aos encontrados em animais não infectados (Figura 6B-F).

Com relação aos animais infectados com *P. brasiliensis* na condição melanizada foi observado aumento significativo na produção de todas as citocinas e a quimiocina analisadas, em comparação aos animais não infectados, sendo o pico de produção no sétimo dia após infecção, seguido de redução significativa quinze e trinta dias após infecção (FIGURA 6A- F).

Comparando a produção dos mediadores inflamatórios entre animais infectados com fungo melanizado e não melanizado, observou-se para as citocinas IL-12 e IL-6, que a produção não foi diferente entre os grupos (Figura 6 A e E). Já em relação a CXCL-1 e TNF- α , o fungo melanizado induziu uma produção significativamente maior dos mediadores (Figura 6B e 6D). Entretanto, a infecção com células melanizadas induziu níveis menores na produção de IFN- γ e IL-1 β , sendo que diferença significativa foi observada apenas sete dias após a infecção (Figura 6C e F).

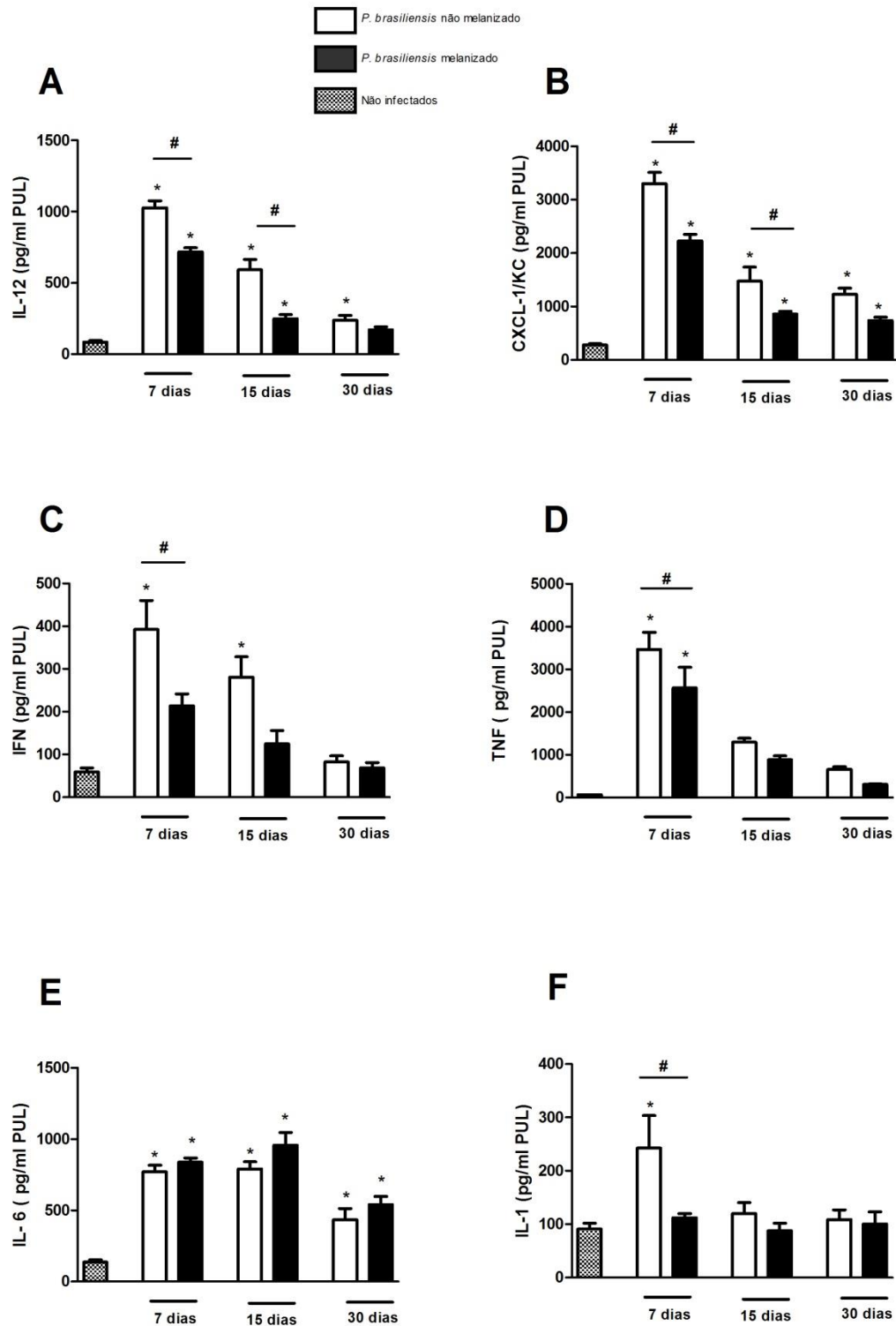


Figura 5 - A presença da melanina em células fúngicas altera a concentração de citocinas e quimiocinas no pulmão após infecção com *P. brasiliensis*. Animais foram inoculados com 10^6 leveduras melanizadas ou não melanizadas de *P. brasiliensis* pela via intratraqueal e, após sete, quinze e trinta dias de infecção, os animais foram eutanasiados para retirada do pulmão e avaliação da concentração das citocinas IL-12 (A), IFN- γ (C), TNF- α (D), IL-6 (E) e IL-1 β (F) e da quimiocina CXCL-1 (KC) (B). Animais controle receberam 30 μ l de PBS pela mesma via de inoculação. ($p < 0,05$) # diferença estatística entre diferentes grupos no mesmo tempo. * diferença estatística em relação ao não infectado.

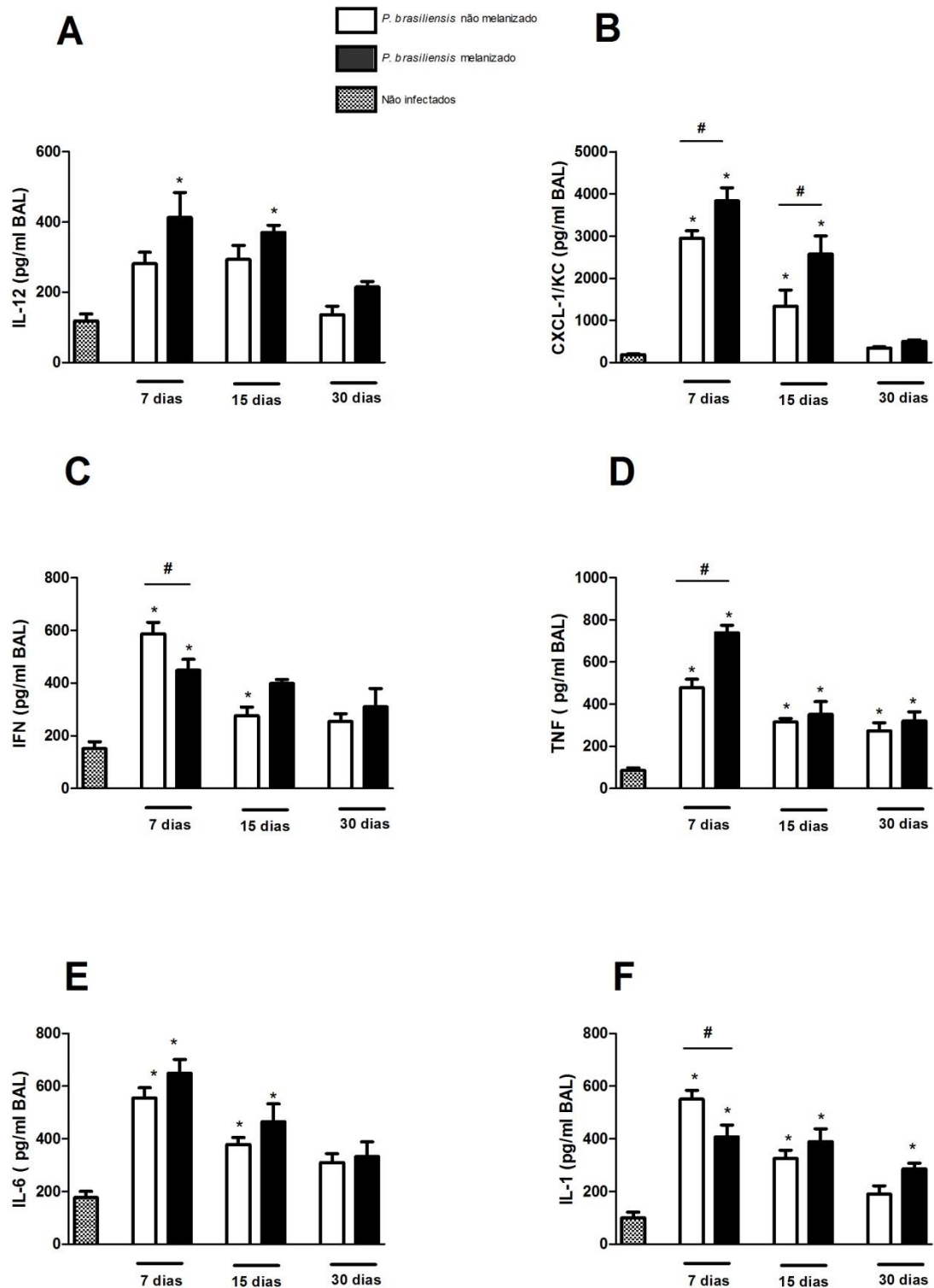


Figura 6 - A presença da melanina em células fúngicas altera a concentração de citocinas e quimiocinas no LBA após infecção com *P. brasiliensis*. Animais foram inoculados com 10^6 leveduras melanizadas ou não melanizadas de *P. brasiliensis* pela via intratraqueal e, após sete, quinze e trinta dias de infecção, os animais foram eutanasiados para retirada do LBA e avaliação da concentração das citocinas IL-12 (A), IFN- γ (C), TNF- α (D), IL-6 (E) e IL-1 β (F) e da quimiocina CXCL-1 (KC) (B). Animais controle receberam 30 μ l de PBS pela mesma via de inoculação. ($p < 0,05$) # diferença estatística entre diferentes grupos no mesmo tempo. ϕ diferença estatística em relação ao não infectado.

5.2 - A influência da presença da melanina na capacidade fagocítica de macrófagos

A análise da carga fúngica em diferentes órgãos mostrou a presença de leveduras no fígado após infecção com *P. brasiliensis* melanizado, o que indica uma possível capacidade de disseminação do fungo nessa condição. Diante disso, o próximo passo foi verificar alterações na capacidade de macrófagos de fagocitar e matar o fungo em sua forma melanizada, o que poderia alterar o controle fúngico pelo hospedeiro.

O ensaio de fagocitose foi realizado usando estratégia experimental *ex vivo* por meio de contagem de leveduras internalizadas por macrófagos murinos peritoneais infectados com *P. brasiliensis* na condição melanizada ou não melanizada. Macrófagos infectados com células fúngicas não melanizadas apresentaram um aumento na atividade fagocítica, depois de ativados com IFN- γ , após 6, 10 e 24 horas de infecção. Na comparação entre a atividade fagocítica de macrófagos infectados com fungo nas duas condições de melanização, verificou-se um menor número das leveduras pigmentadas fagocitadas, na presença ou não de IFN- γ , perfil observado em todos os tempos analisados (Figura 7). De maneira semelhante, macrófagos, quando incubados com melanina e infectados com *P. brasiliensis* não melanizado, apresentaram atividade fagocítica menor à observada na infecção com fungo não melanizado na ausência da melanina, após 6, 10 e 24 horas de incubação (Figura 7).

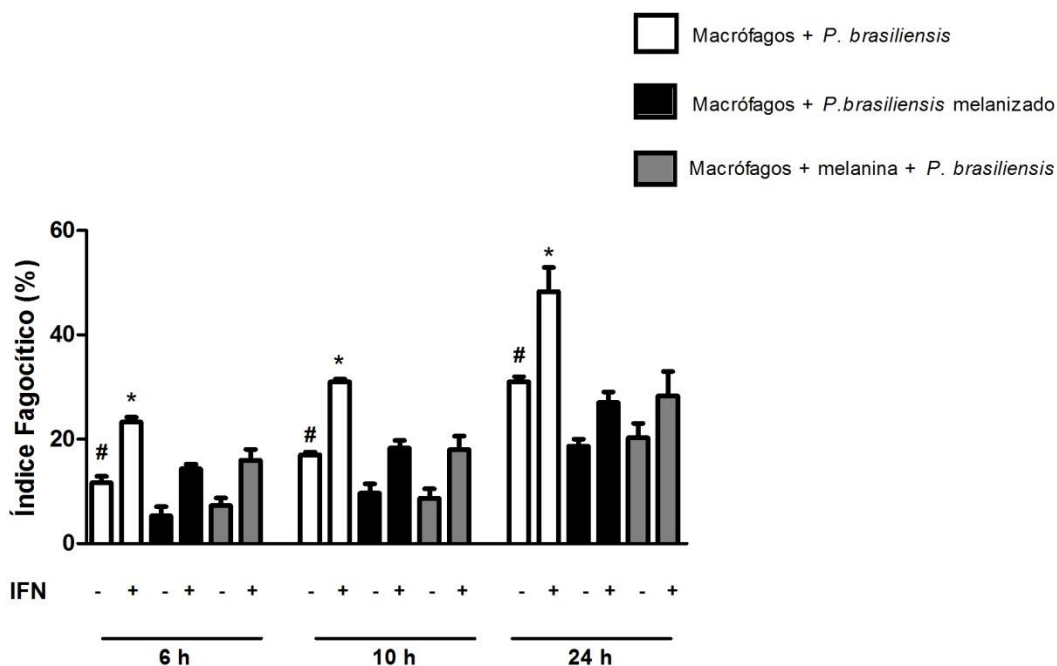


Figura 7 - Células fúngicas melanizadas de *P. brasiliensis* são menos fagocitadas por macrófagos peritoneais. Macrófagos peritoneais, ativados ou não com IFN- γ , foram infectados com leveduras de *P. brasiliensis* (razão de 5 leveduras para cada macrófago) melanizadas e não melanizadas e atividade fagocítica foi avaliada, 6, 10 e 24 horas depois da infecção, por meio da contagem de leveduras internalizadas. Macrófagos incubados com melanina foram infectados com *P. brasiliensis* não melanizado e foi feita a análise do índice fagocítico nos mesmos tempos citados. ($p < 0.05$) # diferença estatística em relação ao grupo não ativado com IFN- γ infectado com *P. brasiliensis* melanizado, no mesmo tempo. *diferença estatística em relação ao grupo ativado com IFN- γ infectado com *P. brasiliensis* melanizado, no mesmo tempo.

Depois de avaliar o efeito da melanina na capacidade fagocítica dos macrófagos, foi feita avaliação da capacidade de proliferação de células melanizadas e não melanizadas do fungo no interior de macrófagos. Leveduras melanizadas apresentaram uma capacidade significativamente maior de proliferar no interior de macrófagos, ativados ou não com IFN- γ , em comparação com leveduras não melanizadas (Figura 8). De maneira interessante, leveduras não pigmentadas incubadas com macrófagos na presença da melanina também apresentaram uma capacidade maior de proliferar no interior de macrófagos do que quando não incubadas com a melanina (Figura 8).

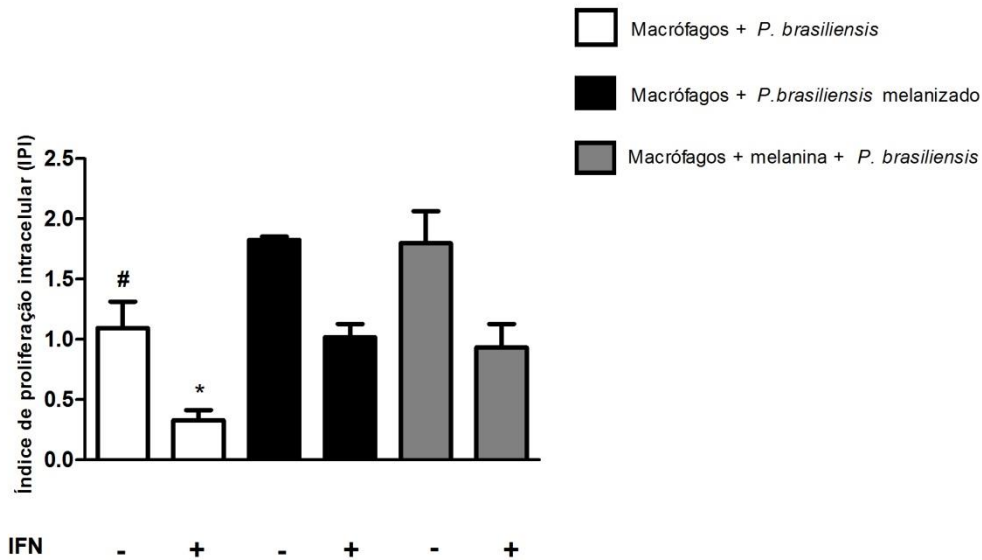


Figura 8 - Células fúngicas melanizadas de *P. brasiliensis* apresentam maior capacidade de proliferação no interior de macrófagos. Macrófagos peritoneais, ativados ou não com IFN- γ , foram infectados com leveduras de *P. brasiliensis* (razão de 5 leveduras para cada macrófago) melanizadas e não melanizadas e o índice de proliferação no interior de macrófagos foi analisado. Macrófagos incubados com melanina foram infectados com *P. brasiliensis* não melanizado e também foi feita a análise do índice de proliferação nos mesmos tempos citados. A taxa de proliferação intracelular foi calculada pela divisão do número de leveduras intracelulares viáveis após 24 horas, pelo número de leveduras viáveis após 10 horas de infecção de macrófagos. ($p < 0.05$) # diferença estatística em relação ao grupo não ativado com IFN- γ infectado com *P. brasiliensis* melanizado, no mesmo tempo. *diferença estatística em relação ao grupo ativado com IFN- γ infectado com *P. brasiliensis* melanizado, no mesmo tempo.

Posteriormente, foi também investigado a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no interior de macrófagos, após o desafio com o fungo por meio da utilização de sondas para a marcação dessas espécies. A infecção de macrófagos, ativados com IFN- γ , com leveduras não melanizadas induziu um aumento nos níveis das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Comparando-se a infecção de macrófagos, ativados ou não com IFN- γ , com *P. brasiliensis* na condição não melanizada e melanizada, verificou-se níveis significativamente menores de peróxido nítrico, óxido nítrico e ROS em macrófagos infectados com leveduras pigmentadas, após uma e seis horas de incubação (Figuras 9A, 9B e 9C, respectivamente). Esse mesmo perfil de geração de espécies reativas foi observado em macrófagos incubados com células não melanizadas na presença de melanina.

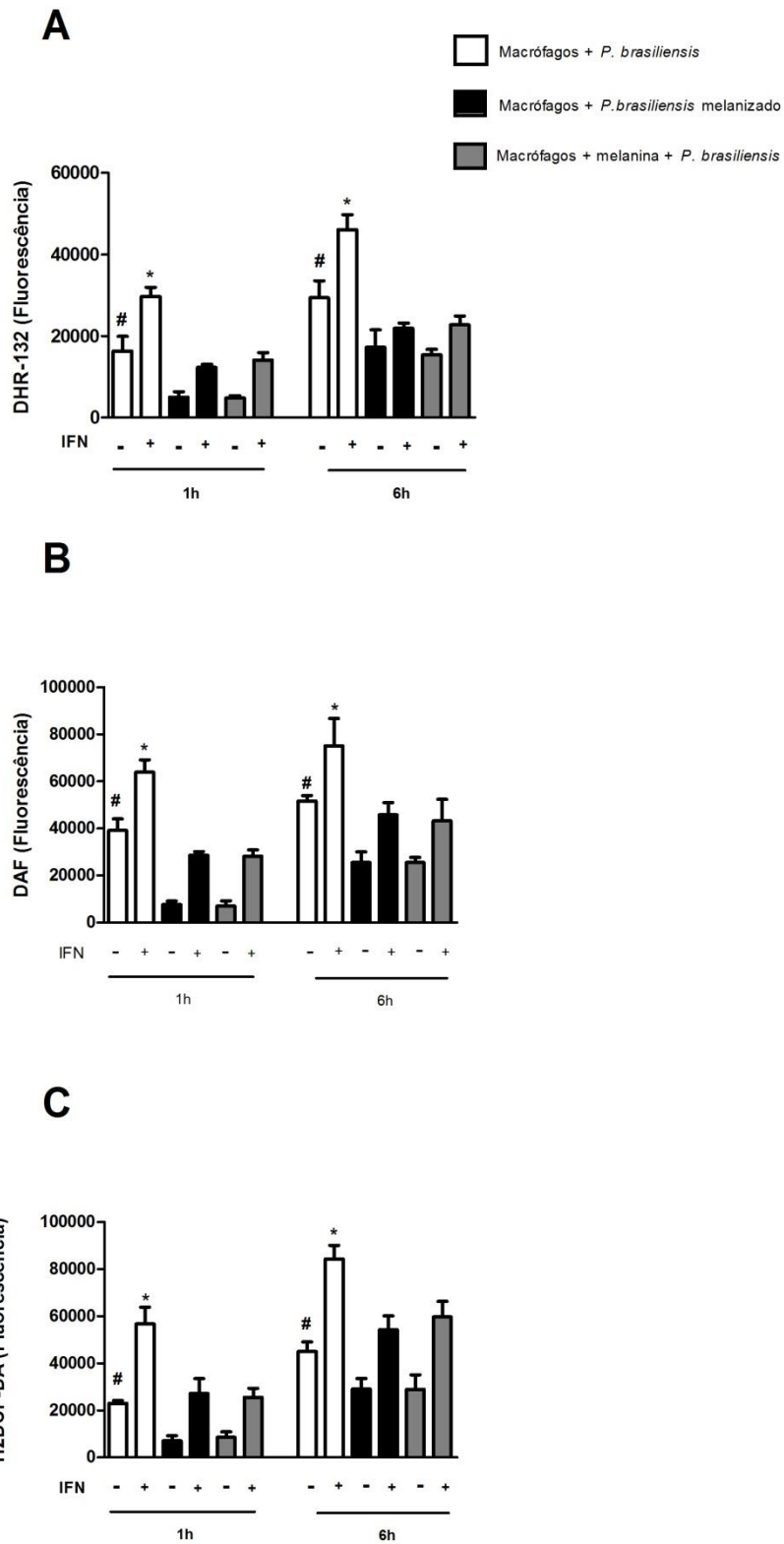


Figura 9 - Células fúngicas melanizadas de *P. brasiliensis* induzem geração de menores níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Macrófagos peritoneais foram infectados com leveduras de *P. brasiliensis* (razão de 5 leveduras para cada macrófago) melanizadas e não melanizadas e foi feita avaliação dos níveis de peróxido nitrito (A), óxido nítrico (B) e ROS (C) com a utilização de sondas específicas marcadoras dessas espécies. # diferença estatística do grupo ativado ou não com IFN- γ no mesmo tempo.

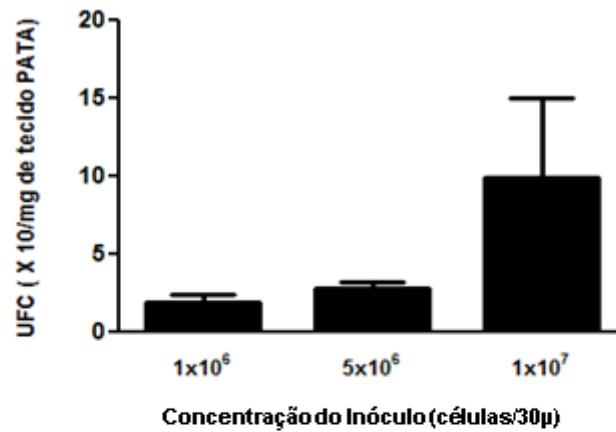
5.3 - Padronização do modelo experimental de infecção intra-plantar com *Paracoccidioides brasiliensis*

Diante dos resultados obtidos com a melanina relacionados à disseminação do fungo, diminuição da capacidade de fagocitose e aumento no índice de proliferação no interior de macrófagos, viu-se necessário o estudo mais profundo do reconhecimento e recrutamento celular após infecção com *P. brasiliensis* melanizado. O modelo experimental de infecção intra-plantar envolve uma reação inflamatória localizada e, sendo este sítio de fácil acesso ao linfonodo, torna-se possível avaliar o perfil celular associado à infecção pelo fungo, assim como estudar a progressão do processo inflamatório e seus fatores associados. Foi então feita a padronização do modelo de infecção intra-plantar com *P. brasiliensis* não melanizado para sua utilização posterior em infecções com o fungo melanizado.

Para a padronização do inóculo de *P. brasiliensis*, animais C57/BL6 foram infectados com diferentes concentrações de levedura: 1×10^6 ; 5×10^6 ; 1×10^7 células/ 30 μ l. Os animais foram eutanasiados após dez dias de infecção e foram retirados pata, linfonodo poplíteo, fígado e baço para a avaliação da carga fúngica, atividade de MPO e NAG nos três inóculos testados.

Com relação à carga fúngica, foi possível recuperar colônias fúngicas apenas da pata e linfonodo poplíteo de animais infectados usando os três inóculos testados, mas não houve diferença no número de leveduras recuperadas em cada tecido entre os inóculos (Figura 10 A e 10B, respectivamente). É importante ressaltar que o número de colônias fúngicas recuperadas da pata e linfonodo foram insignificantes em todos os tempos avaliados.

A



B

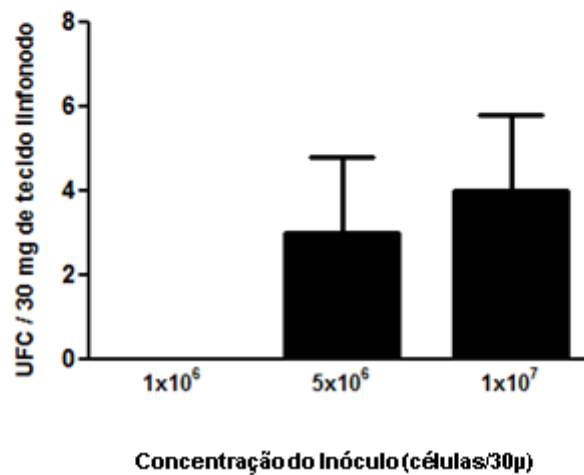


Figura 10 - Carga fúngica de animais infectados pela via intra-plantar. Animais foram inoculados com células fúngicas pela via intra-plantar usando inóculos nas concentrações 1×10^6 , 5×10^6 e 1×10^7 e após dez dias de infecção foi realizada a avaliação da carga fúngica na pata (A) e linfonodo poplíteo (B). Animais controle receberam PBS no lugar do inóculo. Os resultados estão expressos como número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas por grama de tecido.

Como descrito anteriormente, foi também verificado o acúmulo de leucócitos no tecido da pata de animais infectados com o fungo. Para tanto, foi avaliado a atividade de MPO na pata dos animais, uma medida indireta do acúmulo de neutrófilo no tecido analisado. Observou-se um aumento significativo no acúmulo

de neutrófilos em animais infectados com o inóculo na concentração de 5×10^6 células/30 μ l, em comparação com animais não infectados e infectados com os demais inóculos (Figura 11A).

Além da análise feita com relação ao acúmulo de neutrófilos, também foi avaliado o acúmulo de macrófagos na pata de animais infectados com *P. brasiliensis*. Isso foi feito indiretamente por meio da medida da atividade de NAG. Animais inoculados com as concentrações 5×10^6 e 1×10^7 células/30 μ l apresentaram uma elevada atividade de NAG, indicando um acúmulo significativo de macrófagos no sítio da infecção, comparado com animais não infectados e infectados com o menor inóculo (Figura 11B).

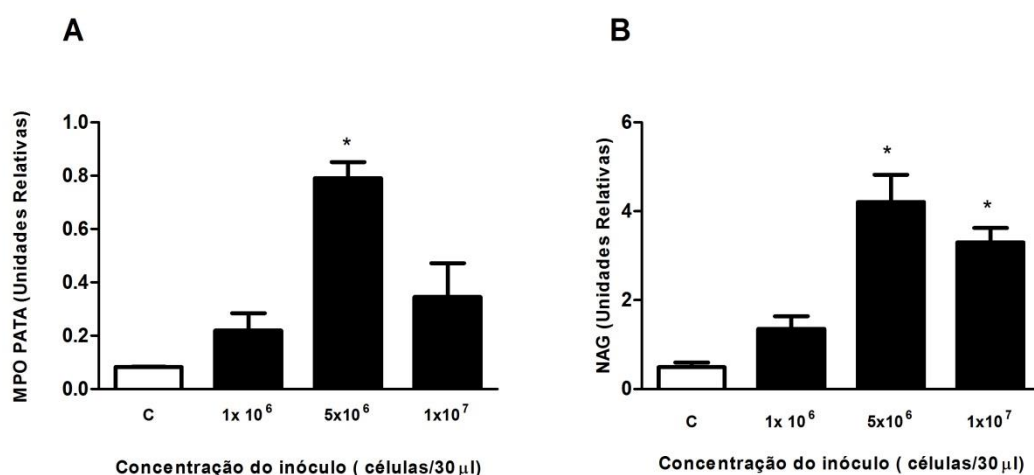


Figura 11 - Infiltrado de células inflamatórias na pata de animais infectados com *P. brasiliensis* pela via intra-plantar. Animais foram inoculados com células fúngicas pela via intra-plantar usando inóculos nas concentrações 1×10^6 , 5×10^6 e 1×10^7 e após dez dias de infecção foi feita avaliação do acúmulo de neutrófilos (A) e macrófagos (B) na pata. Animais não infectados receberam PBS no lugar do inóculo. (p < 0,05). * diferença estatística em relação ao grupo controle

Diante dos resultados obtidos da recuperação da carga fúngica e do infiltrado de células inflamatórias em animais infectados pela via intra-plantar, o melhor inóculo que induziu os parâmetros ideais para análise de recrutamento celular foi 5×10^6 células/30 μ L. Após a determinação da concentração deste inóculo, foi avaliado o tempo de infecção ideal nesse modelo experimental. Para tal, animais foram infectados usando o inóculo padronizado e foram eutanasiados 3, 7, 10,

15 e 30 dias após infecção para avaliação da lesão induzida, da carga fúngica e infiltrado de células inflamatórias.

Os resultados relacionados à carga fúngica mostraram que na pata o pico de recuperação do fungo foi no terceiro dia após a infecção (Figura 12 A), seguido de redução significativa na contagem de colônias fúngicas após 7 dias. Não foram observadas leveduras após 15 e 30 dias de infecção (Figura 12 A). Foi interessante observar que ocorreu migração de leveduras para o linfonodo drenante, nos tempos de três, sete e quinze dias após infecção. Entretanto, o número de colônias fúngicas foi insignificante em todos os tempos (Figura 12B).

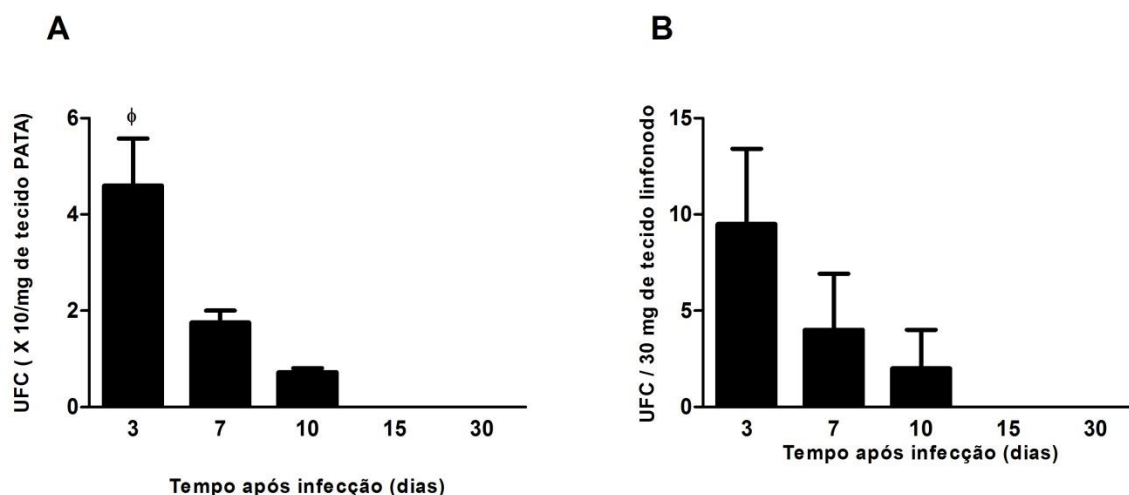


Figura 12 - Avaliação da carga fúngica em animais infectados com *P. brasiliensis* pela via intra-plantar após diferentes tempos de infecção. Animais foram inoculados com 5×10^6 células pela via intra-plantar e eutanasiados 3, 7, 10, 15 e 30 dias após infecção para avaliação da carga fúngica na pata (A) e linfonodo poplíteo (B). Os resultados estão expressos como o número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas por grama de tecido. (p < 0,05) ϕ diferença estatística em relação aos outros tempos.

Foi realizada avaliação da lesão induzida pela infecção, por meio da mensuração do edema na pata dos animais infectados. O procedimento foi feito a cada três dias após infecção. Os dados mostraram que animais controle apresentaram um aumento no edema no terceiro dia após infecção, mas a injeção de PBS na pata não está associada a presença de edema, a não ser no primeiro dia, onde provavelmente, há lesão pela injeção. Entretanto o edema em animais infectados ocorreu no terceiro dia e foi significativamente maior em comparação ao controle,

mantendo-se até o nono dia de infecção. Animais não infectados tiveram o volume da pata reduzido aos níveis basais logo após o terceiro dia de infecção. Após 30 dias de infecção as patas de animais infectados voltaram aos níveis semelhantes aos de animais não infectados (Figura 13)

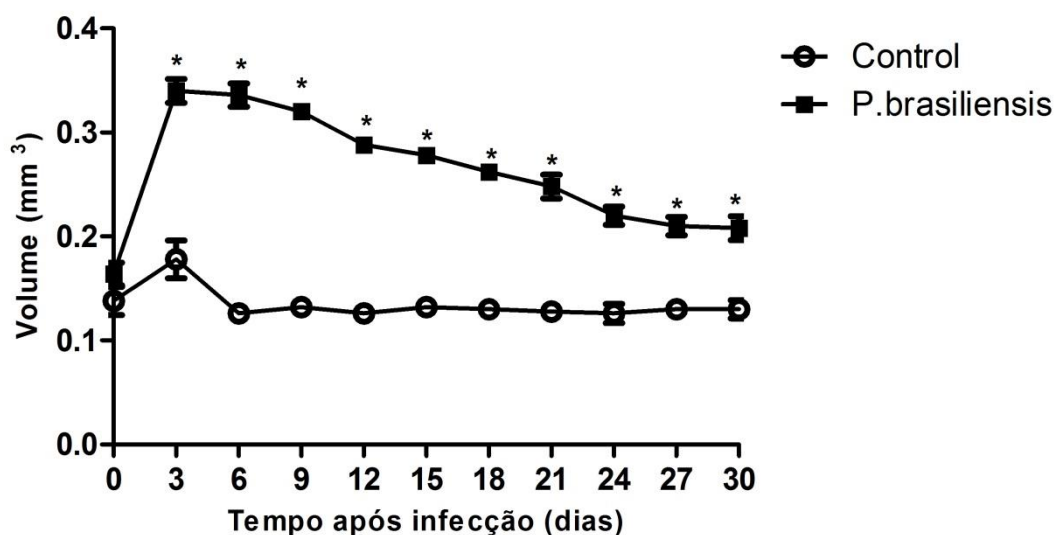


Figura 13 - Edema na pata de animais infectados com *P. brasiliensis*. Animais foram inoculados com 5×10^6 células fúngicas pela via intra-plantar e a cada 3 dias, por um período de 30 dias, foi feita a mensuração do edema na pata dos animais. ($P < 0.05$) * diferença estatística em relação ao controle.

Posteriormente, foi feita a avaliação do acúmulo de células inflamatórias por meio da atividade de MPO. Os dados de MPO mostram que a infecção com *P. brasiliensis* induziu um aumento significativo no acúmulo de neutrófilos na pata dos animais infectados em todos os períodos analisados, em comparação com o controle não infectado. A atividade de MPO manteve-se elevada até o décimo dia de infecção, e após 15 dias verificou-se uma redução significativa no acúmulo dessas células. (Figura 14A). Em seguida, foi analisado o acúmulo de macrófagos nas patas dos animais infectados através da medida da atividade de NAG. Os resultados mostram um aumento significativo de macrófagos após três dias de infecção em comparação ao grupo não infectado, sendo que estes valores foram mantidos elevados em todos os tempos analisados (Figura 14B).

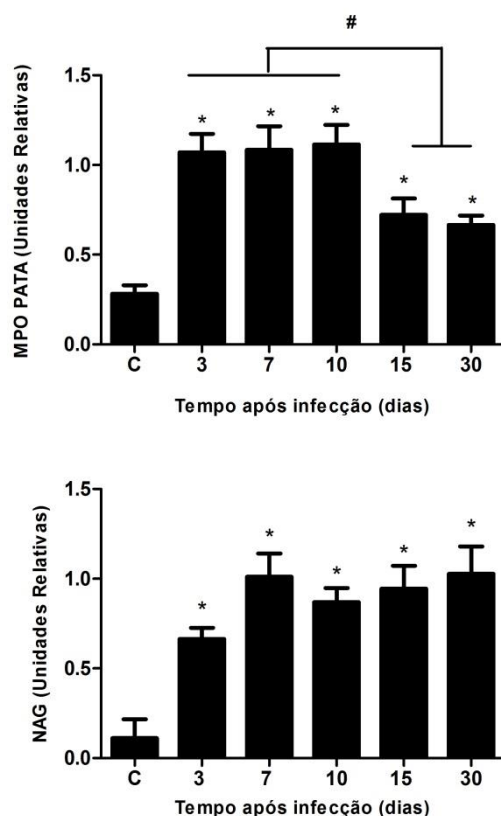


Figura 14 - Infiltrados de células inflamatórias na pata de animais infectados com *P. brasiliensis* pela via intra-plantar em diferentes tempos. Animais foram inoculados com células fúngicas pela via intra-plantar usando inóculo na concentração 5×10^6 após 3, 7, 10, 15 e 30 dias após infecção os animais foram eutanasiados e foi feita a retirada da pata para a avaliação do acúmulo de neutrófilos (A) e macrófagos (B) na tecido. Animais não infectados receberam PBS no lugar do inóculo. ($p < 0,05$). * diferença estatística em relação ao grupo controle.

Posteriormente a padronização do modelo experimental de infecção intra-plantar com *P. brasiliensis*, o próximo passo foi avaliar o efeito causado pela presença da melanina em células do fungo durante a infecção intra-plantar. Para tal, verificou-se a resposta de animais a inoculação de leveduras nas condições de melanizadas e não melanizadas pela via intra-plantar, avaliando diferentes parâmetros tais como indução de edema, carga fúngica e acúmulo de células inflamatórias.

A avaliação da carga fúngica mostrou que houve recuperação de células fúngicas após a infecção com *P. brasiliensis* não melanizado, mas não em número significativo. Entretanto, a recuperação de leveduras de animais

inoculados com *P. brasiliensis* melanizado foi significativamente maior após três dias de infecção, em comparação com animais infectados com o fungo não melanizado (Figura 15 A). Foi observada uma redução significativa na recuperação dessas colônias melanizadas após sete e dez dias de infecção, sendo que no último tempo o número de colônias foi semelhante ao observado na infecção com células não melanizadas (Figura 15 A). Um perfil semelhante foi observado no linfonodos dos animais infectados com leveduras melanizadas e não melanizadas (Figura 15B). Não foram recuperadas colônias fúngicas dos tecidos do baço, fígado e pulmão.

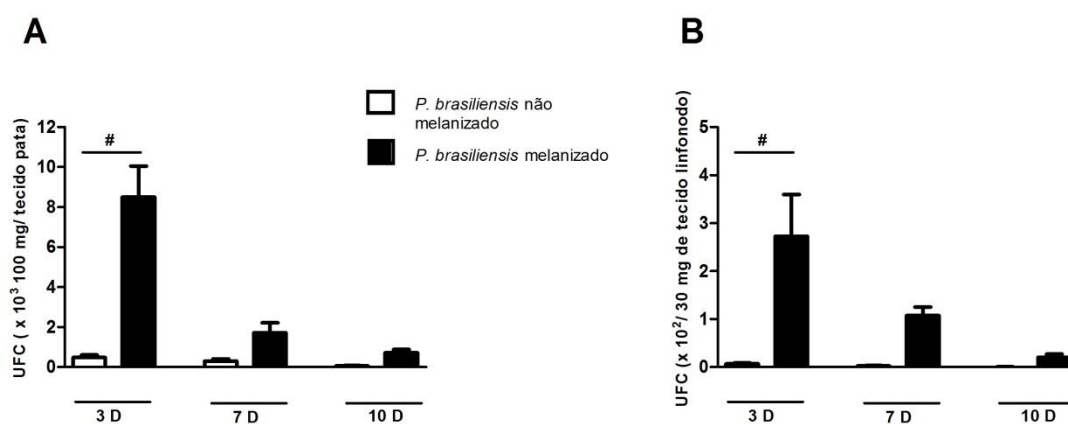


Figura 15 – Animais infectados com *P. brasiliensis* melanizado apresentam maiores cargas fúngicas na pata e linfonodo. Animais foram inoculados com 5×10^6 células melanizadas e não melanizadas e eutanasiados 3, 7, 10 dias após infecção para avaliação da carga fúngica na pata (A) e linfonodo poplíteo (B) Os resultados estão expressos como número de unidade formadoras de colônias (UFC) recuperadas por grama de tecido.. # diferença estatística entre os grupos no mesmo tempo.

A mensuração do edema na pata mostrou que, após a infecção utilizando *P. brasiliensis* na condição de não melanizada, o pico no edema ocorreu no terceiro dia após infecção e se manteve até o nono dia. Animais infectados com leveduras melanizadas também apresentaram pico do edema após três dias de infecção, entretanto, o edema apresentado foi significativamente maior quando comparado aos animais inoculados com células fúngicas não melanizadas (Figura 16). Os valores foram mantidos após 9 dias de infecção, seguido de redução no volume até os níveis basais (Figura 16).

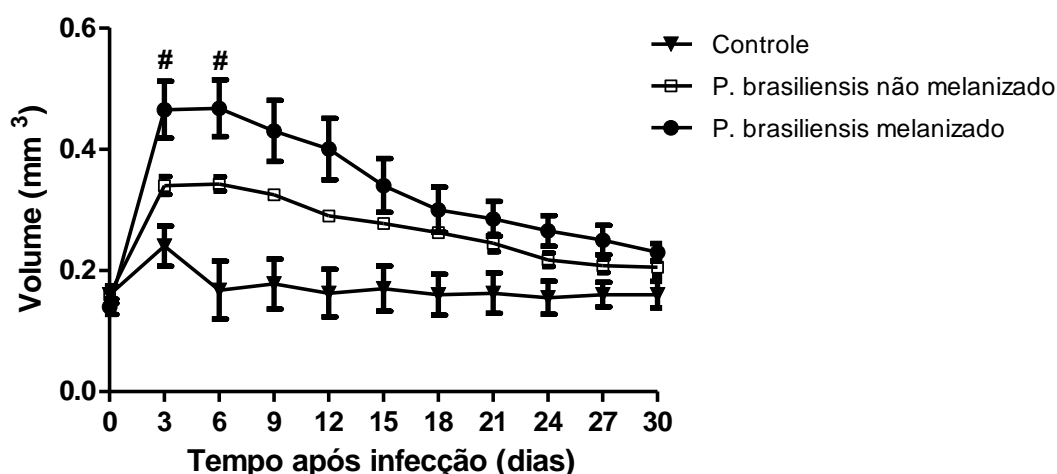


Figura 16 - Edema na pata de animais infectados com *P. brasiliensis* nas condições de melanizado e não melanizado. Animais foram inoculados com 5×10^6 células fúngicas melanizadas e não melanizadas pela via intra-plantar e a cada 3 dias, por um período de 30 dias, foi feita a mensuração do edema na pata dos animais. ($p < 0.05$) # diferença estatística em relação ao *P. brasiliensis* não melanizado

Como citado anteriormente, foi avaliado o acúmulo de neutrófilos na pata de animais infectados com leveduras melanizadas e não melanizadas de *P. brasiliensis* por meio da atividade de MPO.

Verificou-se um aumento significativo no acúmulo de neutrófilos após três dias de infecção nas patas de animais infectados com leveduras melanizadas e não melanizadas, em comparação com animais não infectados (Figura 17 A). Esse acúmulo foi mantido após 15 dias de infecção. Entretanto, o acúmulo dessas células nas patas dos animais inoculados com leveduras pigmentadas foi significativamente maior em relação ao acúmulo nas patas dos animais infectados com o fungo não melanizado em todos os tempos analisados (Figura 17 A).

Em seguida foi analisado o acúmulo de macrófagos nas patas de animais infectados com células fúngicas melanizados e não melanizados através da medida da atividade de NAG. Foi observado um aumento significativo na atividade de NAG após três dias de infecção nas patas de animais inoculados

com leveduras melanizadas em comparação com animais não infectados. Essa elevada atividade de NAG manteve-se em todos os tempos analisados (Figura 17B). Animais infectados com células não melanizadas apresentaram aumento no acúmulo de macrófagos após sete dias de infecção em comparação com animais controles. Esses valores mantiveram-se nos outros tempos analisados (Figura 17B). Foi verificado o acúmulo maior em animais infectados com leveduras pigmentadas em todos os períodos analisados, em relação à animais infectados com *P. brasiliensis* não melanizados ($p < 0,05$) (Figura 17B).

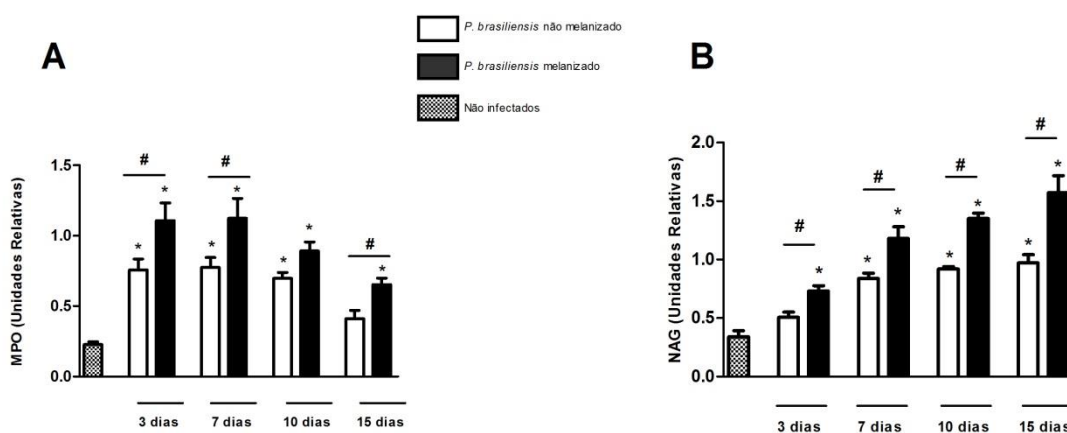


Figura 17 - A presença da melanina induz uma alteração no acúmulo de células inflamatórias após infecção intra-plantar com *P. brasiliensis*. Animais foram inoculados com células fúngicas pela via intra-plantar usando inóculos na concentração 5×10^6 e após 3, 7, 10, 15 dias após infecção foi feita avaliação do acúmulo de neutrófilos (A) e macrófagos (B) na pata. Animais não infectados receberam PBS no lugar do inóculo. ($p < 0,05$). * diferença estatística em relação ao grupo controle. # diferença estatística com relação ao outro grupo no mesmo tempo

6. Discussão

O presente estudo relatou o efeito da presença da melanina durante infecção com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, mostrando parâmetros conhecidamente associados a um quadro mais grave da PCM experimental, tais como elevada carga fúngica, aumento da migração de células inflamatórias para os pulmões, alterações na produção de citocinas e disseminação fúngica para outros órgãos.

A melanina é um pigmento ubíquo e tem-se descrito a sua produção por vários fungos patogênicos, como *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *F. pedrosoi* (NOSANCHUK et al., 2002; DA SILVA et al., 2006). Em *P. brasiliensis* a produção de melanina foi descrita, primeiramente, por GÓMEZ et al. (2001). Para *P. brasiliensis*, assim como para outras espécies fúngicas, como *C. neoformans* e *Histoplasma capsulatum*, a produção da melanina requer a presença de substratos exógenos na forma de compostos fenólicos como L-DOPA (NOSANCHUK et al., 2003). No presente estudo, foi observado o crescimento de colônias enegrecidas a partir do cultivo das amostras de *P. brasiliensis* em meio contendo L-DOPA, e a análise microscópica confirmou a presença de pigmentos na parede e citoplasma das células (dado não mostrado), corroborando os relatos de GÓMEZ et al (2001) e Da Silva et al. (2006).

No presente estudo, foi demonstrado que leveduras melanizadas de *P. brasiliensis* são capazes de persistir por mais tempo no organismo do hospedeiro, o que pode ser explicado pela melanização do fungo e a consequente resistência deste à morte pelas células do sistema imune do hospedeiro (TABORDA et al., 2008). Da Silva e colaboradores (2009), demonstraram que células melanizadas de *P. brasiliensis* apresentaram maior resistência à internalização por macrófagos *in vitro*, e, esse aumento da sobrevivência intracelular pode explicar a alta carga fúngica observada nos pulmões dos animais infectados pela via intratraqueal com leveduras melanizadas (Da Silva et al., 2009). Nossos dados sugerem que a melanização da levedura foi associada com a cronificação da doença, uma vez que, somente células melanizadas persistiram no organismo do hospedeiro após 30 dias de

infecção. Nesse estágio da doença, geralmente, é possível observar a presença de granulomas, que são importantes para conter a replicação do fungo no organismo do hospedeiro. Desbalanços na homeostase, que levem a alterações na resposta do sistema imune do hospedeiro, podem resultar na reativação do fungo aprisionado no interior dos granulomas, resultando, assim, na reincidência da doença (SHIKANAY-YASUDA et al., 2006). Além disso, de maneira interessante, somente no grupo infectado com células de *P. brasiliensis* melanizadas, houve disseminação para o fígado, sugerindo a melanina como um fator de virulência o qual pode influenciar na progressão da doença e que o fígado possa ser o órgão secundário da PCM experimental. O achado de células fúngicas em sítio extrapulmonar, está de acordo com a descrição PCM crônica multifocal (WANK E AIDE, 2009; SHIKANAY-YASUDA et al., 2006). A forma crônica de doença ocorre em 90% dos casos, e, nas formas multifocais, além do pulmão, pode haver comprometimento da pele, mucosas, suprarrenais, do sistema osteoarticular, fígado, baço, bem como linfadenopatias (WANK E AIDE, 2009; SHIKANAY-YASUDA et al., 2006).

De maneira interessante, apesar da infecção com o fungo melanizado resultar em maior carga fúngica pulmonar, foi observado menor recrutamento de células inflamatórias no parênquima pulmonar dos animais, em comparação ao grupo infectado com células não melanizadas. Houve reduzida atividade das enzimas MPO e NAG, parâmetros da medida indireta do acúmulo de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, sugerindo menor ativação dessas células no pulmão. Esses resultados são inovadores, e sugerem que a melanização de *P. brasiliensis* interfere na interação com os fagócitos, uma vez que não houve ativação de células inflamatórias no local da infecção. Essa hipótese é mantida pela redução na produção das citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α e IFN- γ , IL-1 β , além da quimiocina CXCL-1, observada em nossos resultados. Esses mediadores inflamatórios, principalmente TNF- α e IFN- γ , estão envolvidos nos processos de ativação celular. Estudos mostram que a inibição da produção de IFN- γ em camundongos resulta em uma progressão mais grave da doença, caracterizada por lesões pulmonares mais graves e disseminação do fungo para outros órgãos (CALVI ET AL., 2003a; 2003b). Além disso, animais depletados para a produção de interferon-gamma e TNF- α apresentam a

formação de granulomas frouxos e a redução na produção de metabólitos de nitrogênio, o que foi associado com o aumento e disseminação fúngica precoce. É importante ressaltar a redução na produção também de IL-1 β . Recentemente, Tavares e colaboradores (2013) mostraram a importância da ativação de inflamassoma em células dendríticas derivadas de medula óssea após a infecção com *P. brasiliensis*, sendo essa ativação dependente da produção de IL-1 β . Animais deficientes para o receptor IL-1R1 apresentaram uma elevada carga fúngica, mostrando a importância da sinalização via IL-1 β na atividade fungicida contra o fungo *P. brasiliensis*. Além disso, a sinalização via IL-1R1 é necessária para a maturação do fagolisossomo (fusão do fagossomo e lisossomo e acidificação do fagolisossomo) e para a atividade microbicida de macrófagos em outras infecções microbianas (Lazarevic et al., 2008). Assim, a melanização de *P. brasiliensis* pode alterar a sinalização e ativação do inflamassoma via IL-1 β , contribuindo para a manutenção da elevada carga fúngica, possivelmente porque a melanina está alterando o reconhecimento.

A infecção com *P. brasiliensis* melanizado, também resultou em uma recuperação maior do fungo no espaço alveolar dos animais infectados em comparação com animais infectados com leveduras não melanizadas. Entretanto, houve uma alteração no recrutamento de neutrófilos e macrófagos, e na produção de citocinas, comparado com os níveis observados no parênquima pulmonar. Os mediadores inflamatórios CXCL-1, TNF- α tiveram níveis mais altos de produção em animais infectados com leveduras melanizadas, justificando o aumento no recrutamento de células inflamatórias. Como descrito anteriormente, nossos dados sugeriram uma alteração na ativação de células envolvidas no controle da PCM. Possivelmente, a presença da melanina influenciou na interação entre o fungo e as células do hospedeiro e essas foram ativadas tardiamente, resultando em um aumento tardio na produção das citocinas. Além disso, de maneira diferente dos outros mediadores inflamatórios, a produção de IFN- γ e IL-1 β manteve-se menor na infecção com *P. brasiliensis* melanizado. A alteração no reconhecimento induziu a produção de citocinas que, provavelmente, estão envolvidas no aumento da lesão, enquanto que, IFN- γ e IL-1 β , mediadores com atividade relevante na resolução da infecção, mantiveram-se em níveis baixos, contribuindo para a demora no

controle da infecção. Devido a essa alteração na ativação das células de defesa, o controle da infecção foi mais lento, justificando a elevada carga fúngica no parênquima pulmonar e espaço.

A progressão da doença depende de vários fatores ligados ao hospedeiro e ao fungo, como virulência da amostra e quantidade de células fúngicas presentes no pulmão (tamanho do inóculo) (WANKE E LONDERO, 1994). Os resultados do presente estudo sugerem que a falta de controle da carga fúngica no pulmão na fase inicial da doença, associado à melanina como proteção contra as espécies reativas de oxigênio produzidas pelos fagócitos, aumente a sobrevivência do fungo no interior de macrófagos (Da Silva et al., 2006), permitindo, então migração para o fígado, de onde foram recuperadas colônias fúngicas. Portanto, os nossos dados, sugerem que produção de melanina por *P. brasiliensis* está associada com a alteração da interação do fungo com o hospedeiro, bem como a persistência do fungo no organismo do hospedeiro e com o acometimento de sítios extrapulmonares.

Os dados apresentados no nosso estudo mostram que a presença da melanina nas células fúngicas altera o perfil de citocinas produzidas e o recrutamento de células inflamatórias na infecção por *P. brasiliensis*. A interação entre os padrões moleculares associados a micro-organismos e os PRRs resulta na ativação do sistema imune inato e subsequente produção dos mediadores que são utilizados pela montagem da resposta e manutenção da homeostasia (ROMANI, 2004; CUNHA et al., 2012). Durante uma infecção fúngica, diversos PRRs podem ser ativados simultaneamente e a resposta imune final vai depender de diferentes fatores, principalmente o grau de ativação de cada receptor, da espécie de fungo, de seus componentes estruturais e a cooperação com outros receptores (CUNHA et al., 2012). Da Silva e colaboradores (2006) sugerem a melanina como um possível componente da parede celular de fungos que altera o reconhecimento do micro-organismo pelas células imunes, mostrando que células melanizadas de *P. brasiliensis* são mais resistentes à fagocitose mediada pelo sistema complemento, uma vez que a melanina altera a ligação de anticorpos ao micro-organismo. Além disso, as melaninas são polímeros carregados negativamente e sua presença na parede celular de *C. neoformans*

altera a carga da superfície celular fúngica, contribuindo para alterações no processo de ativação de células, reduzindo sua capacidade de exercer suas funções na resposta imune, como ocorre com os macrófagos, que tem sua capacidade fagocítica reduzida (Nosanchuk et al., 1997). Além disso, como dito anteriormente, a melanina dificulta a ligação de diversos anticorpos, reduzindo o mecanismo de opsonização, bem como a internalização de células melanizadas ((Da Silva et al., 2006). Infelizmente, pouco se sabe sobre a localização da melanina em fungos patogênicos, mas tem sido descrito sua localização no espaço intra e extracelular (externa a membrana celular). Em alguns fungos a melanina é encontrada como um componente da parede, muitas vezes vista como uma camada externa distinta e bem definida, e algumas vezes é encontrada em associação com a matriz fibrilar projetando-se para fora da parede celular de muitos fungos. Por exemplo, em *C. neoformans*, a L-DOPA externa é usada na síntese de uma camada de melanina posicionada entre a membrana e a parede celular (Taborda et al., 2008). Para *P. brasiliensis*, a visualização usando microscopia eletrônica de varredura revelou que leveduras melanizadas e não melanizadas tem uma superfície lisa sem grande diferença, mas a análise por micrografias eletrônicas de transmissão mostra grânulos eletrondensos distribuídos por todo o citoplasma e na superfície celular de leveduras melanizadas (Da Silva et al., 2006). Além disso, estudos relatam que a produção de melanina altera a composição da parede celular dos fungos, reduzindo o teor de quitina presente (CASADEVALL, et al., 2012). Células de *C. neoformans* apresentam altos níveis de melanina quando genes relacionados a síntese de quitina são regulados negativamente (Baker et al., 2007; Banks et al., 2005). Dados bioquímicos também sugerem a interação entre a síntese de melanina e quitina. Após a lise enzimática de parede celular de células melanizadas de *Aspergillus nidulans* não foi observado a liberação de quitina como observado em células não melanizadas. Além disso, melanina solúvel se liga diretamente à quitina impedindo a atividade da enzima quitinase (Bull et al., 1970). Esses dados da literatura sustentam a hipótese de que a presença da melanina esteja envolvida no reconhecimento de *P. brasiliensis* por células do hospedeiro, principalmente macrófagos, impedindo que exerçam suas funções na montagem da resposta imune e assim influenciando nas manifestações da doença desenvolvida.

Os macrófagos são células fundamentais para o estabelecimento de uma resposta imune efetiva durante a infecção por *P. brasiliensis*, contribuindo, assim para a resolução da PCM (DE CASTRO, et al., 2013). No atual estudo, foi observado que macrófagos infectados com leveduras melanizadas de *P. brasiliensis* apresentaram uma atividade fagocítica reduzida quando comparado com a infecção usando leveduras não melanizadas. Da Silva e colaboradores (2006) relataram o efeito protetor da melanina, associado à redução da internalização das células melanizadas pelos macrófagos. Nesse mesmo estudo, foi observado que, embora anticorpos policlonais contra melanina de *P. brasiliensis* possam aumentar a fagocitose de células melanizadas por linhagens de macrófagos peritoneais e alveolares, anticorpos policlonais contra células não melanizadas do mesmo fungo não aumentam a fagocitose de células melanizadas de *P. brasiliensis*. Isso indica que a melanina interfere tanto na interação entre os anticorpos com as células do fungo como no reconhecimento do micro-organismo, resultando, então, na redução na internalização das células melanizadas. Estudos *in vitro* mostraram que células melanizadas de *C. neoformans* são menos susceptíveis a danos causados por exposição à luz ultravioleta (WANG et al., 1994), fagocitose mediada por macrófagos (BLASI et al., 1995; WANG et al., 1995a), danos causados por oxidação (WANG et al., 1995b), peptídeos antimicrobianos (DOERING et al., 1999), toxicidade por metais pesados (GARCIA-RIVERA et al., 2001), e drogas antifúngicas, como a Anfotericina B (WANG et al., 1994).

Além da redução na internalização por macrófagos, a melanização promoveu proteção contra a atividade fungicida dessas células. Nossos resultados mostraram que o fungo melanizado apresentou um índice de proliferação no interior de macrófagos maior, comparando-se com o fungo na condição de não melanizado, o que indica uma maior sobrevivência das leveduras no interior de macrófagos. De maneira semelhante, a produção de melanina em outros fungos, como *C. neoformans* e *F. pedrosoi*, é descrito como um fator que aumenta a resistência à atividade fungicida de células fagocíticas (Wang et al., 2006; Cunha et al., 2005). O mecanismo pelo qual ocorre o aumento da sobrevivência de leveduras pigmentadas de *P. brasiliensis* no espaço intracelular pode ser

explicado pela redução na produção ROS e RNS, metabólitos de extrema importância na morte do fungo, visualizada nos resultados obtidos nesse trabalho. Estudos anteriores já mostram que a melanização de fungos como *C. neoformans*, *Aspergillus spp.*, *S. schenckii* e até mesmo de *P. brasiliensis* oferece proteção contra danos mediados por radicais derivados de nitrogênio e oxigênio (Nosanchuk et al., 2003; 2006). Então, a redução na produção das espécies reativas permitem a sobrevivência e permanência do fungo no interior de macrófagos por um período mais prolongado. Os dados observados após a adição da melanina externa corroboram a atuação do pigmento como fator de proteção do fungo contra o mecanismo de fagocitose e morte intracelular, uma vez que, em sua presença, o índice de proliferação intracelular das células não melanizadas foi semelhante ao grupo desafiado com células melanizadas. Estudo sugere que o caráter protetor desse pigmento se deve à caracterização deste como um eficiente seqüestrador de radicais livres (POREBSKA-BIDNY et al, 1992), além da sua propriedade de transferência de elétrons, efeito já demonstrado em *C. neoformans* (WANG et al., 1995). Em *Cryptococcus neoformans* foi descrito que a função antioxidante da melanina é particularmente importante à 37° C, já que células melanizadas nesta temperatura apresentam uma redução na atividade da enzima *superóxido* dismutase (JACOBSON et al., 1994). A enzima *superóxido* dismutase é a primeira defesa antioxidante contra ROS e foi a primeira enzima reportada a usar um radical livre como substrato, sendo este o radical *superóxido* (O₂⁻).

Alguns fungos, tais como as espécies de gênero *Cryptococcus*, utilizam as células do sistema imune do hospedeiro, principalmente o macrófago, como escudo protetor, dentro do qual multiplicam-se, evitando dessa forma o contato com componentes do sistema imune hospedeiro (HE et al., 2003). Nesse contexto, para a PCM e outras micoses sistêmicas, o parasitismo intracelular é visto como evento importante para o estabelecimento e progressão da doença, o que permite a latência fúngica e a disseminação do sítio primário de infecção para outros órgãos (Brown et al. 2011; Lazarevic et al., 2008). Como relatado anteriormente, nossos resultados mostraram a presença de células fúngicas no fígado de animais infectados com *P. brasiliensis* melanizado. Na PCM, a disseminação para outros órgãos ocorre pela via hematogênica ou linfática

(FRANCO et al. 2000). Entretanto, nossos dados mostraram a ausência de leveduras no sangue. Esse dado, juntamente com o aumento da sobrevivência intracelular visualizado em nossos resultados, sugere que a disseminação para o tecido hepático possa ter ocorrido no interior de macrófagos. Para espécies do gênero *Cryptococcus*, o mecanismo “Cavalo de Tróia” foi proposto a partir das observações a cerca da capacidade de sobrevivência desse fungo no interior de macrófagos, podendo cruzar a barreira hemato-encefálica no interior de células fagocíticas (MA & MAY et al., 2009; KRONSTAD, et al., 2011). Estudos realizados com *Cryptococcus neoformans* demonstraram, utilizando estratégias *in vivo* e *in vitro*, esse mecanismo de disseminação no interior de células do hospedeiro (CLARLIER et al., 2009). Assim, nossos resultados sugerem que a disseminação de *P. brasiliensis* para o fígado possa ter ocorrido pelo mecanismo de parasitismo intracelular, favorecido pela presença da melanina como fator de proteção.

Os resultados apresentados abrem espaço para novas investigações em relação ao reconhecimento e recrutamento celular em infecções com *P. brasiliensis* na condição melanizada e não melanizada. Para isso, a utilização de um modelo de infecção que envolva uma reação inflamatória mais localizada, permitiria a avaliação direta do perfil celular associado à infecção pelo fungo. O modelo de infecção intra-plantar possibilita esse estudo mais localizado, demonstrando de maneira mais clara a montagem da resposta imune, desde o reconhecimento do patógeno, ativação de células até o controle da infecção. A realização da infecção intra-plantar com *Paracoccidioides brasiliensis* mostrou um aumento na carga fúngica na pata e linfonodo de animais infectados com o fungo melanizado, acompanhado de um aumento no recrutamento de células inflamatórias. Além disso, animais infectados com leveduras melanizadas apresentaram um edema na pata maior do que animais infectados com leveduras não melanizadas, o que também é um indício da progressão de uma doença mais grave.

O fácil acesso ao linfonodo poplíteo torna esse modelo interessante, pois permite a visualização, por imagem, da migração de leveduras para o linfonodo, um estudo mais profundo dos mecanismos envolvidos na interação entre o micro-organismo e o hospedeiro, avaliando os processos de reconhecimento do

patógeno, evidenciando a influência do processo de melanização de *P. brasiliensis* nesses mecanismos.

7. Conclusão

Em conclusão, mostramos que a melanina desempenha um papel importante na patogênese de *P. brasiliensis*. O aumento da resistência de leveduras melanizadas *P. brasiliensis* envolve uma combinação de uma redução no índice de fagocitose com a proteção contra os radicais oxidativos produzidos nas células efectoras do hospedeiro. Essas propriedades antioxidativas desse pigmento possibilitam o parasitismo intracelular do fungo, associado à disseminação deste para sítios extrapulmonares. Além disso, a localização da melanina na parede celular de *P. brasiliensis* sugere que este seja um fator responsável por alterações no reconhecimento desencadeando na alteração da montagem da resposta imune. Entretanto, os mecanismos pelos quais ocorre essa alteração na interação ainda necessitam de mais estudos.

Portanto, a melanina parece interferir no reconhecimento do fungo pelo hospedeiro, e o estudo dessa interação é importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o controle e entendimento das diferentes manifestações clínicas da doença.

8. Perspectivas

1. Avaliar *in vitro* a produção de citocina pelos macrófagos infectados por leveduras melanizadas e não melanizadas de *P. brasiliensis*.
2. Confirmação da melanização do fungo no tecido por meio da marcação com anticorpos específicos anti-melanina.
3. Analisar a interação do fungo melanizado e não melanizado com células do linfonodo poplíteo por meio de microscopia confocal.
4. Entender os mecanismos de disseminação do fungo.
5. Avaliar o papel do complexo inflamassoma no reconhecimento do fungo melanizado.
6. Avaliar as linhagens de linfócitos T presentes no linfonodo poplíteo de animais infectados pelo fungo *P. brasiliensis* na condição melanizada e não melanizada pela via de inoculação intra-plantar.
7. Avaliar o perfil de polarização de macrófagos presentes no linfonodo poplíteo de animais infectados com o fungo na condição melanizada e não melanizada pela via de inoculação intra-plantar.
8. Avaliar a expressão de receptores de reconhecimento fúngico em macrófagos após estímulo com *P. brasiliensis* melanizado e não melanizado.

9. Referências Bibliográficas

ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D. A. et al. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 5587-5591, 1998.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis*, from armadillos (*Dasypus novemcintus*) captures in endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.*, V. 4, p. 505-512, 1998.

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S. M. et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcintus*); in an ecological study. *Medical Mycology*, v. 41, p. 217-233, 2003.

BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M. G.; THEODORO, R. C. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal host that explain several biological features of the pathogen. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 6, p. 344-351, 2006.

BAGAGLI, E., THEODORO, R. C., BOSCO, S. M. G. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia*, 165:197-207, 2008.

BAKER, L. G.; SPECHT, C. A.; DOLIN, M. J.; LODGE J. K. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* . v.6, p. 855–867, 2007

BANKS, I. R.; SPECHT, C. A.; DOLIN, M. J.; GERIK, K. J.; LEVITZ, S. M., LODGE, J.K. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. v. 4, p.1902–1912, 2005.

BARROSO, L. V.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; et al. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *Int J Epidemiol.* v. 38, p. 1642-1649, 2009.

BLASI, E.; BARLUZZI, R.; MARZOLLA, R.; TANCINI, B.; SALEPPICO, S.; PULTI, M.; PITZURRA, L.; BISTONI, F. Role of nitric oxide and melanogenesis in the accomplishment of anticryptococcal activity by the BV-2 microglial cell line. *J. Neuroimmunol.*, v. 58, p. 111–116, 1995.

BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol.* V. 29, p.1–21, 2011.

BULL, A. T. Inhibition of polysaccharases by melanin: enzyme inhibition in relation to mycolysis. *Arch Biochem Biophys.* v. 137, p.345–356, 1970.

BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; SHU, X. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.*, v. 10, n. 2, p. 80-87, 2002.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A. & STEVENS, D. A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infec. Immun.* v. 57. p. 2289-2294, 1989.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical Microbiology Review*, v. 6, p. 89-117, 1993.

CASADEVALL, A. et al. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 93, p.931–940,2012.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA. A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br. J. Exp. Pathol.*, v. 66, p. 585-594, 1985.

CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res. Immunol.*, v. 149, p. 407-417, 1998.

CALICH, V. L. G.: PINA, A.; FENOLATO, M.; et al.. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and Myd88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, v. 53 p. 1-7, 2008.

CALVI, S. A.; PERAÇOLI, M. T.; MENDES, R. P.; et al; Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect*, v. 5, p. 107-113.

CALVI, S. A.; SOARES, A. M.; PERAÇOLI, M. T.; et al. Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. *Microbes Infect* 5(15) p. 1373-1379, 2003b.

CANO, L. E.; BRUMMER, E.; STEVES, S. A. & RESTREPO, A. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophage or cytokines- treated macrophages. *Infect. Immun.*, v. 60, p. 2096-2100, 1992.

CANO, L. E.; KASHINO, S.S.; ARRUDA, C.; ANDRE, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A.; BURGER, E.; CALICH, V. L. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 800-806, 1998.

CARRERO, L.; NIÑO-VEJA, G.; TEXEIRA, M. M. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen fungal. *Genetic Microbiology*, 45: 605-612, 2008.

CLARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S., BRIGITTE, M. CHERETIEN, F., DROMER, F. Evidence of a Role for Monocytes in Dissemination and Brain Invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* v. 77, p. 120–127, 2009.

CONTI, H. R. et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J. Exp. Med.*, v. 206, p. 299–311, 2009.

CORREDOR, G. G.; CASTAÑO, J. H. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in a endemic area for paracoccidioidomycosis in Colômbia. *Ver. Iberoam. Micol.*, v. 16, p. 216-220, 1999.

COSTA, D. L.; DIAS-MELICIO, L. A.; ACORCI, M. J.; BORDON, A. P.; TAVIAN, E. G.; PERAÇOLI, M. T.; SOARES, A. M. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. *Microbiol Immunol.*, 51(1):73-80, 2007.

COUTINHO, Z. F.; da SILVA, D.; LAZÉRA, M. e al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública*, v.18. p. 1441-1454, 2002.

CUNHA, M. M.; FRANZEN, A. J.; ALVIANO, D. S.; ZANARDI, E.; ALVIANO, C. S.; et al. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. *Microsc Res Tech.*; v. 6; p. 377–84, 2005.

DA SILVA, M. B.; MARQUES, A. F.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect.*, v. 8, p. 197-205, 2006.

da SILVA, M. B.; THOMAZ, L.; MARQUES, A. F.; SVIDZINSKI, A. E.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Resistance of melanized yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* to antimicrobial oxidants and inhibition of phagocytosis using carbohydrates and monoclonal antibody to CD18. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 10, p. 644-648, 2009.

DE CASTRO, L. F. ; FERREIRA, M. C. ; DA SILVA, R. M. ; et al. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect.*, v. 67, p. 470-485, 2013.

DE LUCA, A. et al. IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol.*, v. 3, p. 361–373, 2010.

DOERING, T. L.; NOSANCHUK, J. D.; ROBERTS, W. K.; CASADEVALL, A. Melanin as a potential cryptococcal defense against microbicidal peptides. *Med. Mycol.*, v. 37, p. 175–181, 1999

FERREIRA, M. S.; FREITAS, L. H.; LACAZ, C. S. et al. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food contaminated with soil in Uberlândia, Brasil. *Journal Medicine Veterinary Micology*, v. 28, p.253-256, 1990.

FERREIRA, M. C.; BRITO, V. N.; GAMEIRO, J.; COSTA, M. R.; VASCONCELLOS, E. C.; CRUZ-HOFLING, M. A.; VERINAUD, L. Effects of HeNe laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic lesions. *J Photochem Photobiol B.* 84(2):141-9, 2006.

FERREIRA, M. S. Paracoccidioidomycosis. *Paediatric Respiratory Reviews*, 10:161-165, 2009.

FERREIRA, M.C.; GAMEIRO, J.; NAGIB, P.R.; BRITO, V.N.; VASCONCELLOS, E. C.; VERINAUD, L. Effect of Low Intensity Helium–Neon (HeNe) Laser Irradiation on Experimental Paracoccidioidomycotic Wound Healing Dynamics. *Photochem Photobiol.*, 85(1):227-33, 2009.

FORTES, M. R.; MIOT, H. A.; KUROKAWA, C.S.; et al. Immunology of paracoccidioidomycosis, *An Bras Dermatol.*, V. 86, p. 516-524.

FRANCO, M., BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C. S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med . Mycol.*, v. 38, p. 185-191, 2000.

GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. *Med. Mycol.*, v. 39, p. 253-257, 2001.

GEZUELE, E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. de hences pingüino de la Antártica, res. B2. *Resúmenes IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis*, Caracas, Venezuela, 1989.

GESZTESI, J. L.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R.; VICENTINI, A. P.; MORAES, J. Z.; FRANCO, M. F.; LOPES, J. D. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. *Hybridoma*. v. 15, p. 415–422, 1996.

GESZTESI, J. L.; DIAS, M. A.; DE SOUZA, A. R.; DE ALMEIDA, S.R.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. Subcutaneous infection of mice with *Paracoccidioides brasiliensis* induces a peculiar pattern of inflammatory and immune responses. *Mycopathologia*, 145(1):7-14, 1999.

GOLDANI, L. Z., PICARD, M. & SUGAR, A. M. Synthesis of heat-shock proteins in mycelia and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Microbiol.*, v. 40, p. 124-128, 1994.

GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D. ; DÍEZ, S. et al. Detection of melanin-like particles in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. *Infect Immun.*, v. 69, n. 9, p. 5760-5767, 2001.

GONZALEZ, A.; SAHAZA, J.H.; ORTIZ, B.L.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Med. Mycol.*, v. 41, p. 391-9, 2003.

GONZALES, J. F.; MONTIEL, N. A. MAASS, R. L. First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. v. 12, p. 659-662, 2010.

HANNA, S. A.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; GIANNINI, M. J. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect.* v. 2, p. 877–884, 2000.

HE, W. et al. Phagocytic activity and monocyte chemotactic protein expression by pulmonary cryptococcosis. *Infection and Immunity*, v. 71(2), p. 930-936, 2003.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence Factors of Medically Important Fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, v.9, p. 469–488, 1996.

HOTEZ, P.J.; BOTTAZZI, M. E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S. K.; PERIAGO, M. R. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2(9):e300, 2008.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to antifungals. *Microbiol. Immunol.* v. 47, p. 271–277, 2003.

JACOBSON, E.S.; JENKINS, N.D.; TODD, J.M. Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. *Infect. Immun.* v. 62, p. 4085–4086, 1994.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus gatii* infection: a rat model. *Mycopathology*, v. 170, p. 315-330, 2011.

KUROKAWA, C.S.; SUGIKAZI, M. F. & PERAÇOLI, M. T. S. Virulence factors in fungi of systemic mycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.40, 3; 125-135, 1998.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. In:

Paracoccidioidomycosis. FRANCO, M., LACAZ. C. S., RESTREPO-MORENO, A. DEL NEGRO, G. (Eds) Boca raton, p. 13-25, 1994.

LAZAREVIC, V.; MARTINON, F. Linking inflammasome activation and phagosome maturation. *Cell Host Microbe*. v. 3, p. 199–200, 2008.

LONGUI, L. N.; DA SILVA, R. M.; FORNAZIM, M. C.; et al. Phenotypic and functional characterization of NK cells in human immune response against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Immunol.*, v. 189, p. 1279-1290, 2012.

LOURES, F.V.; PINA, A.; FELONATO, M.; CALICH, V.L. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol*, v. 183, p. 1279–1290, 2009.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* Species. *Advances Applied Microbiology*, v. 67, p.131-190, 2009.

MAMONI, R. L.; NOUER, S. A.; OLIVEIRA, S. J. et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- beta in sera from patients with juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.*, v. 40, p. 153-159, 2002.

MARCOS, C. M.; DA SILVA, J. F.; DE OLIVEIRA, H. C.; et al. Surface- expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cell. *FEMS Yeast Res* 12: 557-570.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 43, p. 480, 2010.

MATUTE, D.R.; McEWEEN, J. G.; MONTES, B. A. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular Biology Evol.*, 23: 65-73, 2006.

MCEWEN, J. G.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.36, p. 603-8, 1987.

MONTENEGRO, M.R. & FRANCO, M. Pathogenesis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A. M. in: *Paracoccidioidomycosis* (Ed) Boca Raton, p. 131-150, 1994.

MOREIRA, A. P.; DIAS-MELICIO, L. A.; PERAÇOLI, M. T.; et al. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cell by IFN- gamma and TNF-alpha activated and murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms. *Mycopathologia*, v. 166: p. 17-23; 2008.

NAGIB, P. R.; GAMEIRO, J.; DA COSTA, T. A.; DI GANGI, R.; RIBEIRO, JDA S.; PAULINO, L. C.; VERINAUD, L. Effect of HeNe Laser Irradiation on Extracellular Matrix Deposition and Expression of Cytokines and Chemokines in Paracoccidioidomycotic Lesions. *Photochem Photobiol.* 86(4):920-4, 2010.

NAIF, R. D.; FERREIRA, L. C. L.; BARRET, T. V. et al. Paracoccidioidomycose em tatus (*Dasyus novemcintus*) no Estado do Pará. *Rev. Inst. Méd. trop. São Paulo*, v. 28, p. 19-27, 1986.

NAKAIRA-TAKAHAGI, E., GOLIM, M. A., BANNWART, C. F., PUCCIA, R., PERAÇOLI, M. T. Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. *Med.Mycol.* v. 49, p. 694–703, 2011.

NEGRONI, R. Pathogenesis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A. M. in: *Paracoccidioidomycosis* (Ed) Boca Raton, p. 203-211, 1994.

NOGUEIRA, M. G. S.; ANDRADE, G. M. Q.; TONELLI, E. Clinical evolution of paracoccidioidomycosis in 38 children and teenagers. *Mycopathologia*, v. 161, p. 73-81, 2006

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. *Infect. Immun.* v. 65, p.1836–1841, 1997.

NOSANCHUK, J.D.; ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Antibody response to fungal melanin in mice. *J Immunol.*, v.160, p. 6026–6031, 1998.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.*, v.5, n.4, Apr, p.203-23. 2003.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 50, p. 3519–3528, 2006.

OLIVEIRA , S. J.; MAMONI, R. L.; MUSATTI, C. C.; PAPAORDANOU, P. M. O; BLOTA, M. H. S. L. Cytokine and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.*, v.4, p. 139-144, 2002.

PINA, A.; SALDIVA, P. H.N.; RESTREPO, L.E.C.; CALICH, V.LG. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of host. *J. Leukoc. Biol.*, v. 79, p. 1202-13, 2006.

PAGLIARI, C.; PEREIRA , N. V.; KANASHIRO, L.; et al. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. *J Cutan Pathol.*, v. 37, p. 565-570, 2010.

POPI, F. A. F.; LOPES, J. D. & MARIANO, M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An invasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol* 218: 87-94.

PRADO, M.; DA SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R. TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , Rio de Janeiro, vol.104(3), p. 513-521, 2009.

PUCCIA, R., VALLEJO, M. C., MATSUO, A. L., LONGO, L. V. The Paracoccidioides cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host. *Front. Microbiol.*, v. 2, p. 257, 2011.

QUEIROZ-TELLES, F. Tratamento da Paracoccidioidomicose. In: Foccacia R (ed) *Tratamento de Infectologia*, 3a edição, Editora Atheneu, São Paulo, p. 1395-1402.

RAPPLEYE, C.A., EISSENBERG, L.G., GOLDMAN, W.E. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immunerecognition by the beta-glucan receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 104, p. 1366–1370, 2007.

RAPPLEYE, C. A., ENGLE, J.T., GOLD-MAN, W.E. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Mol. Microbiol.* v. 53, p. 153–165, 2004.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L.E. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infection Immunology*, v. 46, p. 346-353, 1984.

RESTREPO, A.; BENARD, G.; CASTRO, C.C.; AGUDELO, C.A. TABÓN, A.M. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin. Respir. Crit. Care. Med.* v. 29, p. 182-197, 2008.

RICCI, G. MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A. et al. Canine paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology*, v. 42, p. 379-383, 2004.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M. G.; THEODORO, R. C.; et al. Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V. 104, p. 636- 643, 2009.

RODRIGUES, D. R.; DIAS-MELICIO, L. A.; CALVI, S. A.; PERAÇOLI, M. T.; SOARES, A. M. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol.*,45(1):27-33, 2007.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 4, p. 1-13, 2004.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 11, p. 275-288, 2011.

ROSA, L. H; VIEIRA, L. M. A.;SANTIAGO, I. F., ROSA, C. A. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol.* v. 73, p.178–189.,2010.

SAN-BLAS, G. & NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell wall, antifungal, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia*, 165:183-195, 2008

SANTOS, P. C., SANTOS, D. A., RIBEIRO, L.S., FAGUNDES, T. C., DE PAULA, T. P., AVILA, T. V., BALTAZAR, L. M., CRUZ, R. C., DIAS, A.C. MACHADO, F.S., TEIXEIRA, M.M , CISALPINO, P. S., SOUZA, D.G. The pivotal role of 5-Lipoxygenase- derived LTB4 in controlling pulmonary paracoccidioidomycosis, *Plos Negl Trop Dis*, ,v. 7, e2390, 2013.

SHAKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R.P. et al. Concenso em paracoccidioisomicose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39, p. 297-310, 2006.

SILVA, M. T. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors and adaptive immunity against extracellular and intracelular microbial pathogens. *J Leukoc Biol.* v. 87 (5), p. 805-13. 2010.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; MADEIRA, M. et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, state of Minas Gerais, Brasil. *Medical Mycology*, v. 36, p. 37-42, 1998

SOUTO, J. T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.*, v. 156, p. 1811-1820, 2000.

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

TABORDA, C. P., DA SILVA, M. B., NOSANCHUK, J. D., TRAVASSOS, L. R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia*, v. 165, p. 331-339, 2008.

TACHIBANA, T. ; MATSUYAMA, T. ; MITSUYAMA, M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. *Med Mycol.* 36(1):21-7, 1998.

TAVARES, A. H. ; DERENGOWSKI, L. S. ; FERREIRA, K. S. ; et al. Murine Dendritic Cells Transcriptional Modulation upon *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. *Plos Negl Trop Dis.* v.6, p. 1459, 2012.

TAVARES, A. H.; MAGALHAES, K. G.; ALMEIDA, R. D.; R.; BURGEL, P. H. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS Negl Trop Dis.* v.12, e2595, 2013.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; CARVALHO, M. J. A. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of spaciation in the *Paracoccidioides brasiliensis* genus. *Molecular Phylogenetic and Evolution* , 52: 273-283, 2009.

THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; FELIPE, M. S. S. et al. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. *Plos One* 7 (5): e37694.

TRAVASSOS, L. R., RODRIGUES, E. G., IWAI, L. K., TABORDA, C. P. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. *Mycopathologia*. v. 165, p. 341–352, 2008.

TREJO-CHÁVEZ, A.; RAMÍREZ-ROMERO, R. et al. Disseminated Paracoccidioidomycosis in a Southern Two-Toed Sloth (*Choloepus didactylus*). *J. Comp. Path.*, v. 144, p. 231-234, 2011.

TRISTÃO, F. S.; PANAGIO, L. A.; ROCHA, F. A.; et al. B Cell-Deficient Mice Display Enhanced Susceptibility To *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. *Mycopathologia*, v. 170, p. 1- 10, 2013.

URÁN, M. E., NOSANCHUK, J. D. RESTREPO, A., HAMILTON, A. J., GÓMEZ, B. L., CANO, L. E. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* melanin In Vitro and In Vivo studies during infection. *Clin. Vaccine. Immunol.* v. 10, p. 1680-1688, 2011.

VICENTINI, A. P.; GESZTESI, J. L.; FRANCO, M. F.; SOUZA, W.; MORAES, J. Z.; 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.

VISBAL, G.; SAN-BLAS, G.; MURGICH, J. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. *Current Drug targets- Infections Disorders*, v. 5, p. 211-226, 2005.

WALMSLEY, M. I. B.; CHEN, D.; SHU, X. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends in Microbiology*, v. 10, p. 80-85, 2002.

WANG, Y.; CASADEVAL, A. L. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 60, p. 3864–3866, 1994.

WANG, Y., CASADEVALL, A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, v. 38, p. 2648–2650, 1994.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect. Immun.*, v. 62, p. 3004–3007, 1995 a.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect. Immun.*, v. 63, p. 3131-3136, 1995.

WANG, Y., CASADEVALL, A. Melanin, melanin “ghosts” and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.*, v. 64, p. 2420-2424, 1996.

WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (eds.) *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, p. 109-120, 1994

WANK, B.; AIDÊ, M. A. Paracoccidioidomycosis. *J. Bras. Pneumol*, v. 35, p. 1245-1249, 2009