

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina

Análise comparativa das variações
morfológicas entre dois diferentes isolados
(Pb01 e Pb18) do fungo *Paracoccidioides*
brasiliensis e da sua interação com o
sistema imune do hospedeiro

Cecília Lívia Falcomer Fraga

Brasília, 2008

Programa de pós-graduação em Patologia Molecular

Análise comparativa das variações morfológicas entre dois diferentes isolados (Pb01 e Pb18) do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e da sua interação com o sistema imune do hospedeiro

Aluna: Cecília Lívia Falcomer Fraga

Orientadora: Dr^a Anamélia Lorenzetti Bocca

Co-orientadora: Dr^a Alice Melo Ribeiro

Dissertação de mestrado desenvolvida no Laboratório de Immunopatologia da Universidade de Brasília e apresentada ao programa de pós-graduação em patologia molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de mestre em patologia molecular.

Brasília, 2008

Banca Examinadora

Titulares:

Prof^a Dr^a Anamélia Lorenzetti Bocca, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Prof Dr Cesar Koppe Grisolia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Dr^a Larissa Fernandes Matos, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

Suplente:

Dr^a Luciana Menezes da Silva Flannery, Fundação Oswaldo Cruz, Unidade de Brasília.

Agradecimentos

A Dr^a Anamélia L. Bocca e Dr^a Alice M. Ribeiro pela oportunidade para que eu desenvolvesse este projeto de pesquisa.

Aos alunos Ana Camila e Isaque pelo enorme auxílio no desenvolvimento dos meus experimentos, como também, aos demais alunos do laboratório Ana Paula, Eleuza, Laura, Márcio e Natália pela colaboração em determinados momentos do meu projeto.

A Yanna Nóbrega pelas dicas, conselhos, e super-ajuda nos experimentos das dosagens de citocinas e da fagocitose dos macrófagos. É claro, não posso esquecer dos momentos de lazer após duras rotinas de trabalho nos finais de semana.

A minha querida amiga e companheira de guerra Janaina Nunes, pela força e auxílio nos momentos difíceis que passamos juntas, pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos em finais de semana e feriados. Muito obrigada!

A professora Maria Sueli S. Felipe pelos ensinamentos sobre biologia molecular, dentre outros conhecimentos transmitidos nos seminários do grupo Pb, como também, nas palestras e work-shop.

Aos alunos do Laboratório de Biologia Molecular da UnB - Adriane, Alex, Calliandra, Hugo, Larissa, Lorena, Marcus e Túlio – que sempre foram super atenciosos e prestativos em auxiliar-me quando solicitava.

A Simoneide Silva que me auxiliou com uma paciência, atenção e carinho nos experimentos de ensaio de fagocitose com macrófagos. Além de auxiliar-me com dicas super interessantes e coerentes nos momentos que estava meio perdida com os rumos do meu projeto pesquisa.

Ao meu verdadeiro orientador André Amaral, que desde início do meu trabalho com este projeto, esteve ao meu lado auxiliando-me no desenvolvimento prático dos meus experimentos com dicas, conselhos, e claro, não posso esquecer das broncas também.

Além disso, muito obrigada pelas correções sugeridas, pela preocupação com minha saúde e pela amizade.

A Patrícia Cunha pelos ensinamentos sobre as técnicas histológicas, pelo incentivo e carinho com o qual me auxiliou nestes difíceis momentos finais pelos quais passei.

A Rosane Mansan pela amizade, pelos momentos de lazer, pela super ajuda nesta reta final do meu mestrado. Muito obrigada!

A prof^a Fabiana Pirani pelo auxílio na fotografia das lâminas da histopatologia, como também, pela correção da minha descrição das lâminas, muito obrigada!

A professora Sônia Bao por disponibilizar os equipamentos e materiais para que eu realizasse os procedimentos da MET, e não posso esquecer da sua aluna Shélida Braz que me auxiliou com muita atenção e carinho nos procedimentos da MET na interação Pb-macrófago. Muito obriga!

Ao professor Florêncio Figueiredo e a técnica Viviane do laboratório LIB pelo processamento do material para análise histopatológica.

Ao pesquisador Alexandre Caetano da Embrapa, por disponibilizar o aparelho β -cintilador para que eu utilizasse na leitura das minhas amostras. Muito obrigada!

Ao técnico Nelson Pellet pelo carinho, paciência, auxílio e colaboração nos experimentos para realizar a leitura da timidina tritiada, muito obrigada!

Ao técnico Sr^o Dedé pelos ensinamentos sobre como manipular e cuidar dos animais, pelas dicas e conselhos, como também, por conseguir arrecadar animais para os meus experimentos, muito obrigada!

Aos os órgãos financiadores do fomento para pesquisa CAPES, CNPQ e FINATEC pelo apoio financeiro neste projeto.

Agradecimento mais do que especial aos meus pais e minhas irmãs que foram pessoas fundamentais nesta etapa da minha vida, muito obrigada pelo carinho, compreensão, apoio psicológico e financeiro que dispuseram comigo ao longo desses anos do mestrado.

A minha super amiga Juliana Caldas que foi meu verdadeiro anjinho, sempre auxiliando, aconselhando, escutando as minhas reclamações e fazendo-me rir no final, e principalmente muito obrigada pela sua enorme ajuda e incentivo nesta reta final!

As minhas amadas e queridas mocras pelo carinho, preocupação, paciência, incentivo e pelos alegres momentos de distração que tiveram comigo ao longo desses anos de estudo. Ana por sempre me acompanhar nas longas horas de estudo na biblioteca; Beta por disponibilizar seu tempo para auxiliar-me com os trabalhos no photoshop; La pelo seu entusiasmo em sempre querer saber como estava indo meu projeto de pesquisa; e não posso esquecer da minha “fia”, Marina por ter me auxiliado desde a preparação dos slides para prova de seleção, como também, em diversos outros momentos do mestrado. Muito obrigada!

As minhas médicas - Carmem, Rose e Patrícia - e a enfermeira Angélica pelos carinhosos cuidados com a minha saúde, pelo incentivo para que persistisse nos meus estudos nos momentos que eu queria desistir. Muito obrigada!

A Deus pela força para que eu conseguir ultrapassar todos obstáculos presentes ao longo destes anos de estudo. Muito obrigada!

Sumário	Página
Índice de figuras	VIII
Índice de quadros	IX
Índice de tabelas	X
Lista de abreviaturas e siglas	XI
Resumo	XIII
Abstract	XIV
Introdução	1
1 - <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	2
1.1 - Paracoccidioidomicose	3
1.2 - Resposta imune do hospedeiro na paracoccidioidomicose	8
Justificativa	11
Objetivo Geral	11
Material e Métodos	12
1.1 Fungo	13
1.2 Animais experimentais	13
1.3 Manutenção da virulência dos isolados	13
1.4 Morfometria dos isolados Pb01 e Pb18	14
1.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	14
1.6 Protocolo do Co-cultivo dos macrófagos com os isolados <i>in vitro</i>	15
1.6.1 Índice de Fagocitose	15
1.6.2 Dosagem Óxido Nítrico	16
1.6.3 MET da interação macrófago com isolados do <i>P. brasiliensis</i>	16
1.7 Preparação dos isolados para infecção via endovenosa e via intratraqueal nos animais experimentais	16
1.8 Protocolo experimental da infecção sistêmica <i>in vivo</i>	17
1.8.1 Unidades formadoras de colônia do pulmão	17
1.8.2 Histopatologia do pulmão	18
1.8.3 Ensaio de proliferação celular	18
1.8.4 Dosagem de anticorpos (IgG1 e IgG2a) pelo método ELISA	19
1.9 Protocolo experimental da infecção intratraqueal <i>in vivo</i>	19

1.9.1 Recuperação dos isolados levedura do pulmão	20
1.10 Análise Estatística	20
Resultados	21
1- Comparações morfológicas entre os isolados Pb01 e Pb18 cultivados <i>in vitro</i>	22
1.1-Análise morfométrica dos isolados	22
1.2 Microscopia Eletrônica Transmissão dos isolados	24
2- Interação dos isolados Pb01 e Pb18 com macrófagos MH-S <i>in vitro</i>	26
2.1-Capacidade de fagocitose dos macrófagos	26
2.2 Dosagem de Óxido Nítrico	28
2.3 Microscopia eletrônica transmissão da interação <i>P.brasiliensis</i> com células MH-S	29
3- Interação dos isolados Pb01 e Pb18 com o hospedeiro <i>in vivo</i>	29
3.1 - Via de infecção endovenosa	29
3.1.1 - Análise histopatológica do pulmão dos animais dos dois grupos experimentais	31
3.1.2 - Determinação do número de leveduras viáveis no tecido pulmonar	34
3.1.3 - Capacidade linfoproliferativa dos animais com infecção sistêmica	35
3.1.4 - Quantificação das imunoglobulinas	36
3.2 - Via de infecção intratraqueal	36
3.2.1-Recuperação das Unidades Formadoras de Colônia do tecido pulmonar	37
3.2.2-Análise histopatológica do tecido pulmonar	37
3.2.3-Dosagem de NO e dos anticorpos IgG1 e IgG2a	39
Discussão	42
Conclusão	50
Referências Bibliográficas	52
Anexo 1	67

Índice de Figuras:

Página

Figura 1: Gráficos que representam à média aritmética dos valores do diâmetro dos isolados de levedura Pb01 e Pb18.	23
Figura 2: Imagens em microscopia óptica ilustrando as diferenças morfológicas entre o Pb01 e o Pb18, corados com azul de algodão.	24
Figura 3: Eletromicrografias de transmissão do Pb01 e Pb18 do fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	25
Figura 4: Capacidade de fagocitose dos macrófagos MH-S <i>in vitro</i> em relação ao Pb01 e Pb18.	26
Figura 5: Viabilidade das células dos isolados nos ensaios de fagocitose.	27
Figura 6: NO liberado pelos macrófagos MH-S em co-cultivo.	28
Figura 7: Microscopia eletrônica transmissão da interação das leveduras de <i>P. brasiliensis</i> com células MH-S após 72 horas.	30
Figura 8: Fotomicrografias mostrando a evolução da lesão granulomatosa pulmonar ocasionada pela inoculação por via endovenosa de 1×10^6 leveduras do isolado Pb18.	32
Figura 9: Fotomicrografia dos infiltrados inflamatórios induzido no pulmão dos animais infectados via endovenosa com isolado Pb01 do fungo <i>P. brasiliensis</i> .	33
Figura 10: Cinética da recuperação das CFU do pulmão durante o curso da infecção sistêmica com os isolados Pb01 e Pb18.	34
Figura 11: Resultados dos índices de proliferação dos esplenócitos obtidos dos animais infectados com isolados Pb01 e Pb18.	35
Figura 12: Cinética de recuperação das CFU/g pulmão durante o curso da infecção intratraqueal com os isolados Pb01 e Pb18.	37
Figura 13: Fotomicrografia dos infiltrados inflamatórios induzido no pulmão dos animais infectados via intratraqueal com 10^6 leveduras do isolado Pb01.	38
Figura 14: NO liberado nos pulmões dos animais C57Bl/6 infectados intratraquealmente.	39

Índice de Quadros:

Página

Quadro I: Algumas manifestações clínicas da PCM que afetam órgãos do paciente infectado com *P. brasiliensis*. 6

Quadro 2: Isolados do fungo *P. brasiliensis* demonstrando o grupo genético que pertencem, como também, o local onde foi extraído do hospedeiro e o órgão no qual foi retirado cada isolado. 7

Índice de Tabela:

Página

Tabela 1: Morfometria do Pb01 e Pb18 no 4º, 5º, 6º e 7º dia de cultivo em meio BHI líquido.	23
Tabela 2: Dosagem dos isotipos IgG1 e IgG2a da imunoglobulina IgG no soro animais infectados.	36
Tabela 3: Dosagem dos isotipos IgG1 e IgG2a no soro animais C57Bl/6 infectados pela via intratraqueal com 10^5 leveduras	40

Lista de Abreviaturas e Siglas

BHI	Brain Heat Infusion
°C	Graus centígrados
CACO	Tampão cacodilato de sódio
CFU	Unidades formadoras de colônias
cm ²	Centímetros quadrados
ConA	Concanavalina A
CPM	Contagem de pulsos por minuto
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
g	Grama
G	Gravidade
h	Horas
HE	Hematoxilina-Eosina
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL-2	Interleucina do subtipo 2
L	Litros
LPS	Lipopolissacarídeo
μ Ci	MicroCurie
μ g	Microgramas
μ L	Microlitros
μ m	Micrometros
μ M	Micromolar
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
min.	Minutos
M	Molar
nm	Nanômetros
N	Normal

NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão salina fosfato
PCM	Paracoccidioidomicose
pH	Potencial de hidrogênio
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
SD	Desvio padrão
Th	Células T auxiliares
%	Porcentagem
RNI	Espécies reativas de nitrogênio
RNO	Espécies reativas de oxigênio

Resumo

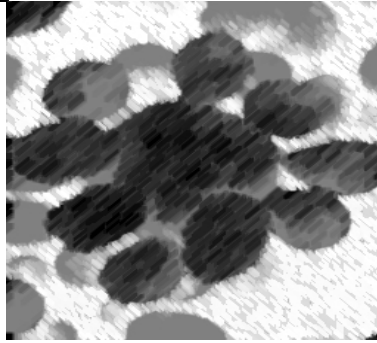
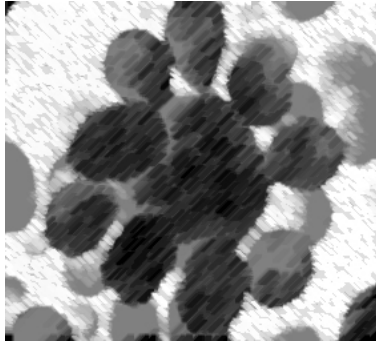
O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da micose sistêmica paracoccidioidomicose, cuja região endêmica restringe-se a América Latina, sendo o Brasil, a Colômbia e a Venezuela os países com alta frequência na incidência de casos. O desenvolvimento da doença depende diretamente da interação entre o *P. brasiliensis* e o hospedeiro, aspectos como a virulência do fungo e o tipo de resposta imune que ele induz no hospedeiro são importantes para compreender as diferenças nas formas clínicas desta doença. Um aspecto importante a ser considerado nesta interação são as diferenças genéticas, observadas entre os grupos filogenéticos, do gênero *Paracoccidioides*. Assim, neste trabalho avaliamos as diferenças morfológicas entre dois isolados *P. brasiliensis* (Pb01 e Pb18), como também, observamos a interação destes isolados com macrófagos *in vitro*. Além de realizar a caracterização da resposta imune induzida por diferentes vias de infecção em camundongos. As células do isolado Pb01 apresentaram um menor diâmetro em relação à do Pb18 e com o formato circular predominante tanto para células mães como para os brotamentos, enquanto Pb18 variou sua morfologia entre a forma elíptica e circular. As leveduras Pb01 são fagocitadas mais rápido e numa porcentagem maior que as do Pb18, as quais sobrevivem por um tempo maior dentro dos macrófagos e induzem uma menor produção óxido nítrico. Na infecção sistêmica, os animais inoculados com Pb01 apresentaram uma resposta linfoproliferativa mais eficiente até 30 dias após infecção. Após este período a resposta tornou-se similar com a do Pb18, no qual ocasiona supressão da resposta linfoproliferativa. Neste tipo de infecção observou-se uma resposta imunológica predominantemente Th1. Mas, na infecção pela via intratraqueal houve uma resposta imunológica mista (Th1 e Th2) nos animais infectados, porém nas duas formas de infecção, houve uma baixa carga fúngica recuperada do tecido pulmonar e não apresentou a formação da resposta inflamatória granulomatosa. Os animais infectados com o isolado Pb18, nas duas formas de infecção, houve predomínio da resposta Th2, como também, uma quantidade crescente na carga fúngica recuperada do pulmão e uma resposta inflamatória granulomatosa neste órgão. Portanto, o isolado Pb01 possui uma menor patogenicidade em relação ao Pb18, como também, induz uma resposta imunológica mais efetiva nos animais experimentais.

Palavras chaves: *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomicose experimental, isolados Pb01 e Pb18, resposta imune celular.

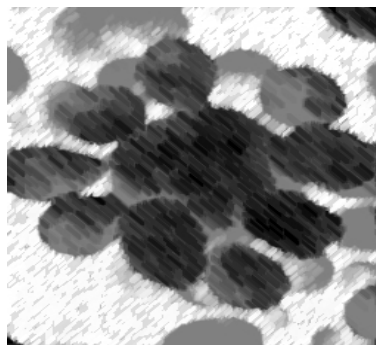
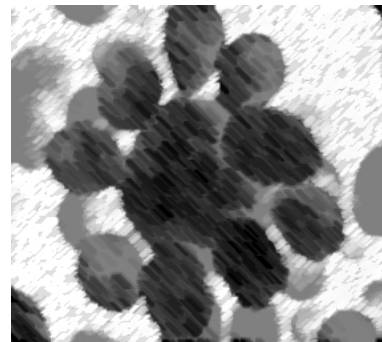
Abstract

The dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiologic agent of systemic mycosis paracoccidioidomycosis, it is restrict to Latin American. It is frequently diagnosed in Brazil, Colombia and Venezuela. The evolution of this disease depends directly on the interaction between *P. brasiliensis* and host. Aspects of fungus's virulence and the immune type response of host that is caused by fungi are important to understand differences on the clinical form's disease. An important aspect to be considered on this interaction are genetic differences, observed between phylonegetics groups from *Paracoccidioides* genus. In this work we analyzed morphological differences of two isolate of *P. brasiliensis* (Pb01 and Pb18) and studied the interaction of these isolate and macrophages *in vitro*. Immune response induced by distinct ways of infection in murine was characterized. The isolate Pb01 cells showed mainly a circular shape and a littlest diameter either to mother's cells and budding compared to Pb18 that presented an elliptical and circular shape. Yeasts Pb01 are phagocyted fastly and in a major quantity than Pb18. Yeasts Pb18 survived for more time inside macrophages and induced a little oxide nitric's production. In systemic infection, inoculated animals with Pb01 presented more efficient linfoproliferative response until 30 days after infection. After this period, the response became similar to Pb18, which causes suppression of linfoproliferative response. In this kind of infection we observed an immunological response predominantly Th1. But, in infection by intratracheally way occurred a mixed immunological response (Th1 e Th2) in infected animals, however in two types of infection, a low fungic's load was recovered from lung's tissue and did not present formation of inflammatory granulomatosa response. Infected animals with isolate Pb18, in both ways of infection, occurred mainly response Th2 and a crescent increase on quantity of fungal burden recovered from lungs and an inflammatory granulomatosa in this organ. Then, the isolate Pb01 has a minor pathogenicity in relation to Pb18 and induces an immunological response more efficient in model animals.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, experimental paracoccidioidomycosis, isolates Pb01 and Pb18, cellular immune response



Introdução



Introdução

1 – *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da micose sistêmica paracoccidioidomicose (PCM). Ele é encontrado na forma de micélio em temperaturas inferiores a 28°C, que é caracterizado por filamentos septados com conídios terminais ou intercalares (San-Blas, 1993). Em temperaturas 37°C, ele apresenta a forma de levedura que é caracterizada por brotamentos múltiplos formados por evaginação da célula mãe, onde uma célula central é circundada por várias células periféricas, conferindo um aspecto de roda de leme de navio (Lacaz *et al.*, 1991). Essa diferenciação morfológica é consequência de um conjunto de alterações bioquímicas e fisiológicas desencadeadas pela variação da temperatura, a qual estimula uma adaptação no padrão transcricional e/ou regulatório de genes (Nunes *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2007).

As condições e o local exato onde *P. brasiliensis* ocorre na natureza ainda não foram totalmente elucidadas, embora, sabe-se que a sua adaptação é favorecida em solos úmidos, com pH ácido e rico em matéria orgânica, os quais são típicos de regiões que apresentam temperatura moderada e com curtos períodos de seca (Restrepo *et al.*, 1985). Estas condições estavam presentes em áreas onde *P. brasiliensis* já foi isolado, como: nas plantações de café no Brasil (Silva-Vergara *et al.*, 1998), na Argentina (Negróni, 1966), na Venezuela (Albornoz, 1971), nas de fezes de morcegos *Artibeus literatus* (Grose & Tamsitt, 1965), de pinguins *Pygoscelis adeliae* (Gezuele, 1989) e de tatu *Dasyurus novemcinctus* e *Cabassous centralis* (Silva-Vergara *et al.*, 1999; Corredor *et al.*, 2005).

O fungo foi inicialmente caracterizado por Almeida (1930) como sendo do gênero *Paracoccidioides* e da espécie *brasiliensis*. A sua classificação como membro do filo Ascomycota foi realizada por Leclerc *et al.* (1994), após comparações filogenéticas das seqüências de DNA da subunidade ribossomal maior (28S) entre fungos dimórficos e dermatófitos. A partir de comparações entre seqüências parciais de rRNA de fungos dimórficos realizadas por Guého *et al.* (1997), o fungo *P. brasiliensis* foi classificado, juntamente com os gêneros *Histoplasma*, *Emmonsia* e *Blastomyces*, como pertencente à família Onygenaceae. Análises filogenéticas das seqüências da subunidade ribossomal menor de vários fungos reforçaram a tese de que *P. brasiliensis* deveria ser agrupado na

ordem Onygenales (Bialek *et al.*, 2000). Assim, atualmente *P. brasiliensis* é descrito como pertencente ao reino: Fungi; divisão: Ascomycota; subdivisão: Euascomycotina; classe: Plectomyceto; subclasse: Euascomycetidae; ordem: Onygenales; família: Onygenaceae; subfamília: Onygenaceae anamórficos; gênero: *Paracoccidioides*; espécie: *brasiliensis* (San-Blas *et al.*, 2002).

Além da classificação em filo, ordem, família e gênero, Matute (2006) demonstrou que existem espécies crípticas dentro da espécie *P. brasiliensis*:

S1 – constituída por 38 isolados de diferentes localizações geográficas na América Latina: Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela -;

PS2 - formada por 2 espécies filogenéticas, com 5 isolados brasileiros encontrados nos estados de São Paulo e Minas Gerais e 1 isolado venezuelano da região de Caracas -;

PS3 – composta por 3 espécies filogenéticas, formada por 21 isolados colombianos - . Sendo que PS2 e PS3 são parafiléticas e o grupo S1 é considerado como espécies independentes.

O isolado Pb18 está incluso dentro do grupo S1, porém o isolado Pb01 não se apresenta dentro desta classificação (Carrero *et al.*, 2008). Assim, o isolado Pb01 apresenta um alto nível de divergência quando comparado com as 3 espécies filogenéticas descritas por Matute (2006), corroborando com estudos prévios de Carrero (2008) e Teixeira (2008) que definem uma nova espécie filogenética para fungo, Pb01-like, a qual abrange Pb01, como também, outros isolados dos estados Goiás e Mato Grosso. Além disso, Teixeira (2008) sugere no seu trabalho que isolado Pb01 representa uma nova espécie para o gênero *Paracoccidioides*, propondo a denominação de *Paracoccidioides lutzii*.

1.1- Paracoccidioidomicose (PCM)

A infecção no hospedeiro humano geralmente ocorre pela inalação de propágulos, os quais alcançam o epitélio alveolar pulmonar convertendo-se na forma de levedura (Restrepo *et al.*, 2001). Este processo de transformação ocorre no hospedeiro, sendo fundamental para o sucesso no estabelecimento do foco inflamatório (Brummer *et al.*, 1993; Camargo *et al.*, 2000). Porém, o desenvolvimento da doença depende diretamente da resposta imune do hospedeiro (Mendes *et al.*, 1971).

Inicialmente descrita por Adolpho Lutz em 1908, a PCM ocorre predominantemente em áreas rurais, onde os indivíduos estão possivelmente mais

expostos ao agente etiológico, acometendo principalmente indivíduos do sexo masculino entre 30 e 60 anos de idade e pacientes com deficiência imunológica (Brummer *et al.*, 1993; Coutinho *et al.*, 2002). É uma micose sistêmica com alta prevalência na América Latina (Franco *et al.*, 1987) onde se estima que cerca de dez milhões de pessoas estejam infectadas, embora somente cerca de 2% apresentam predisposição para desenvolver a doença (McEwen *et al.*, 1995).

Dados epidemiológicos indicam uma distribuição situada entre 20° ao norte e 35° ao sul do Equador, estendendo-se por 14 países situados do México à Argentina (Restrepo *et al.*, 1985; San-Blas *et al.*, 2002). Entretanto, a doença não ocorre em todos os países dentro destes limites, a maior incidência da doença é observada no Brasil, Colômbia e Venezuela (Rivitti & Aoki, 1999).

No Brasil ocorrem cerca de 80% dos casos descritos na literatura (Lacaz *et al.*, 1991; Brummer *et al.*, 1993). A distribuição da doença nas regiões endêmicas mostra-se heterogênea, ocorrendo mais casos nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, destacando-se os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul na incidência de casos (Camargo *et al.*, 2000). Por não requerer notificação compulsória, a real incidência da PCM na América Latina não é conhecida, mas estima-se a ocorrência de 1 a 3 casos por 100.000 habitantes (Brummer *et al.*, 1993). Além disso, o longo período de latência que caracteriza a PCM dificulta determinar com precisão o possível local onde a infecção foi adquirida, já que em homens esta latência é por volta de 15 anos para as primeiras manifestações clínicas aparecerem (Brummer *et al.*, 1993).

A maioria dos indivíduos infectados desenvolve a forma assintomática, podendo ou não progredir para a doença, que apresenta diferentes formas clínicas, as quais estão relacionadas com fatores do hospedeiro, níveis de virulência dos isolados e condições ambientais (San-Blas *et al.*, 2002). Dentre os fatores do hospedeiro que facilitariam a transição do estado de infecção para doença, seriam: a desnutrição (Franco, 1987), o alcoolismo (Martinez & Moya, 1992) e o estado imunitário do hospedeiro (Leão & Mendes, 1980). Tais fatores conferem à doença uma característica de micose oportunista. Portanto, a apresentação clínica da PCM e o curso da infecção dependem principalmente das condições de saúde do indivíduo e também, do isolado de *P. brasiliensis* no qual o hospedeiro foi infectado.

Há duas formas da doença que são conhecidas e distintas entre si: a forma aguda (ou juvenil) e a forma crônica (ou adulta) (Franco *et al.*, 1987). A primeira desenvolve-

se mais rapidamente sendo mais grave que a segunda (Montenegro *et al.*, 1986). Porém, nos dois casos, as funções imunes mediadas por células são alteradas, e na ausência de terapia específica, a mortalidade é alta (Lacaz *et al.*, 1991). Um estudo realizado por Coutinho e colaboradores avaliou o número de óbitos por PCM no Brasil durante o período 1980 a 1995 (Coutinho *et al.*, 2002). Os seus resultados demonstraram que a PCM é a 8ª causa de mortalidade entre as doenças crônicas, como também, é a detentora da maior taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas no país.

A forma aguda ou juvenil acomete principalmente crianças e jovens, representando apenas 3 a 5% dos casos de PCM. É caracterizada pelo rápido curso (semanas a meses) e pelo envolvimento do sistema reticulo endotelial -baço, fígado, nódulos linfáticos e medula óssea- resultando na hipertrofia destes órgãos (Londero & Melo, 1983). A função imune mediada por células é deprimida nestes pacientes, ocasionando uma desordem linfoproliferativa. Esta é a forma mais grave da PCM e com o pior prognóstico para pacientes (Brummer *et al.*, 1993).

A forma crônica acomete mais de 90% dos pacientes com PCM, sendo que os homens adultos são os mais afetados. A progressão da doença acontece de forma lenta, podendo levar meses ou até anos para se tornar completamente estabelecida (Brummer *et al.*, 1993; Svidzinski *et al.*, 1999). Em 25% dos casos ela é unifocal e os únicos órgãos clinicamente afetados são os pulmões. Mas, em muitos casos o paciente somente irá tratar-se quando a doença se espalhar para outros órgãos, devido a sua forma silenciosa, ou seja, ao seu período de latência (Restrepo *et al.*, 1976; Londero, 1986; Franco *et al.*, 1989). Esta disseminação gera o quadro clínico denominado forma crônica multifocal a qual apresenta sintomas variáveis, porém com freqüentes lesões na mucosa oral e nasal, na pele, nos nódulos linfáticos e nas glândulas adrenais e as funções da imunidade celular são diminuídas (Tendrich *et al.*, 1991; Brummer *et al.*, 1993).

As manifestações clínicas da forma crônica da PCM são classificadas em duas formas polares (Franco *et al.*, 1994). A polar positiva que é caracterizada pela presença de lesões generalizadas, pelo elevado título de anticorpos específicos aos antígenos de *P. brasiliensis*, imunidade celular enfraquecida e presença de reação inflamatória granulomatosa, contendo muitos fungos viáveis. Na forma polar negativa, as lesões são localizadas, o título de anticorpos específicos ao *P. brasiliensis* é baixo ou ausente, a imunidade celular é preservada e as lesões granulomatosas são compactas e com baixo número de fungos. Ambas as formas clínicas da doença estão associadas com extensas seqüelas nos órgãos do hospedeiro que incluem lesões ocasionadas por uma resposta

anormal de células do sistema imune. O quadro **I** representa alguns órgãos que podem ser afetados no decurso do quadro clínico da PCM.

Quadro I: Algumas manifestações clínicas da PCM que afetam órgãos do paciente infectado com *P. brasiliensis*.

Regiões afetadas	Características clínicas
Mucosa	Lesões ulcerativas que podem afetar qualquer estrutura dentro da boca, nariz, laringe e orofaringe. ^{e, c, h}
Pulmão	Nódulos confluentes bilaterais com infiltração afetando, principalmente a região central e basal do pulmão; ^{a, c, g} Fibrose pulmonar. ^{c, d, g}
Pele	Lesões ulcerativas que tendem a infiltrar nos tecidos subcutâneos. ^{b, c}
Diversos órgãos do sistema digestivo, vascular e nervoso.	Pode afetar baço, gânglios linfáticos, trato intestinal, tubo digestivo, fígado, ocasionar a destruição óssea, comprometimento do sistema nervoso central. ^{a, b, f, c}

a: Chojniak *et al.*, 2000; **b:** Brummer *et al.*, 1993; **c:** Del Negro *et al.*, 1982 **d:** Cock *et al.*, 2000; **e:** Sposto *et al.*, 1994; **f:** Silva *et al.*, 1999; **g:** Franco *et al.*, 1993; **h:** Manns *et al.*, 1996.

Os diversos isolados do fungo *P. brasiliensis* são obtidos de pacientes com PCM, como também, de animais (quadro **2**). Estes isolados de *P. brasiliensis* exibem variações biológicas em relação ao seu crescimento, nas suas características estruturais e moleculares, como também, na patogenicidade e virulência (Mendes-Giannini *et al.*, 1990; Salem-Izacc *et al.*, 1997; Mollinari-Madlum *et al.*, 1999; Camargo *et al.*, 2000). Estas variações sugerem que a PCM pode ser causada por diferentes isolados de *P. brasiliensis* (Camargo *et al.*, 2000). Diversos autores (Franco *et al.*, 1993; Mollinari-Madlum *et al.*, 1999; Camargo *et al.*, 2000) observaram que nas infecções experimentais induzidas por diferentes isolados de *P. brasiliensis*, ocorrem diferenças na formação dos granulomas e no comprometimento dos órgãos, na resposta imune do hospedeiro ao patógeno, devido principalmente, à virulência de cada isolado utilizado, a qual influencia diretamente na relação *P. brasiliensis* - hospedeiro.

Quadro 2: Isolados do fungo *P. brasiliensis* demonstrando o grupo genético que pertencem, como também, o local onde foi extraído do hospedeiro e o órgão no qual foi retirado cada isolado.

Isolado	Grupo genético	Localização	Hospedeiro	Origem	Referência
T1F1	S1	Pratania, São Paulo, Brasil	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Fígado	Hebeler-Barbosa <i>et al.</i> , 2003
T3B6	S1	Pratania, São Paulo, Brasil	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Baço	Hebeler-Barbosa <i>et al.</i> , 2003
T4B17	S1	Manduri, São Paulo, Brasil	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Baço	Hebeler-Barbosa <i>et al.</i> , 2003
T5LN1	S1	Botucatu, São Paulo, Brasil	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Nódulo linfático	Hebeler-Barbosa <i>et al.</i> , 2003
T7F6	S1	Manduri, São Paulo, Brasil	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Fígado	Hebeler-Barbosa <i>et al.</i> , 2003
T8LN2	S1	Botucatu, São Paulo, Brasil	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Nódulo linfático	Hebeler-Barbosa <i>et al.</i> , 2003
T9B1	S1	Botucatu, São Paulo, Brasil	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Baço	Hebeler-Barbosa <i>et al.</i> , 2003
T13LN2	S1	Manduri, São Paulo, Brasil	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Nódulo linfático	Hebeler-Barbosa <i>et al.</i> , 2003
T15LN1	S1	Manduri, São Paulo, Brasil	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Nódulo linfático	Hebeler-Barbosa <i>et al.</i> , 2003
BT60	S1	Manduri, São Paulo, Brasil	Humano	Sputum	Hebeler-Barbosa <i>et al.</i> , 2003
Pb18	S1	São Paulo, São Paulo, Brasil	Humano	Ganglionar pus	Teixeira <i>et al.</i> , 1987
Pb339	S1	São Paulo, São Paulo, Brasil	Humano	Desconhecido	Restrepo-Moreno & Schneidau, 1967
Pb927	S1	Antártida/Uruguai	<i>Pygoscelis adeliae</i>	Feces	Garcia <i>et al.</i> , 1993
BT84	PS2	Botucatu, São Paulo, Brasil	Humano	Sputum	Hebeler-Barbosa <i>et al.</i> , 2003
T10B1	PS2	Botucatu, São Paulo, Brasil	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Baço	Hebeler-Barbosa <i>et al.</i> , 2003
Pb262	PS2	Uberlândia, Minas Gerais, Brasil	–	Ração canina	Ferreira <i>et al.</i> , 1990
Pb02	PS2	Caracas, Venezuela	Humano	Desconhecido	Morais <i>et al.</i> , 2000
Pb04	PS2	São Paulo, São Paulo, Brasil	Humano	Desconhecido	Morais <i>et al.</i> , 2000
EPM83	PS3	Colômbia	Humano	Desconhecido	Desconhecido
EPM77	PS3	Colômbia	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido
Pbdog	Desconhecido	Curitiba, Paraná, Brasil	Canis familiares	Nódulo linfático	Farias <i>et al.</i> , 2005
Pb01	Pb01-like	Goiânia, Goiás, Brasil	Humano	Pulmão	Maria do Rosário R. Silva comunicação pessoal

Adaptado: Theodoro *et al.*, 2008

Singer-Vermes e colaboradores (1994) estudaram a patogenicidade de 6 diferentes isolados (Pb44, Pb47, Pb50, Pb45, Pb56, Pb57) do fungo *P. brasiliensis*, os quais foram provenientes de pacientes com PCM crônica que apresentavam diferenças na apresentação clínica da doença - variando entre as formas brandas a graves. Os

autores compararam a PCM dos humanos nos quais os isolados foram obtidos, com a virulência destes isolados, o tropismo para diferentes órgãos como também, habilidade de induzir a resposta imune celular e humoral em animais susceptíveis B.10A. Os seus resultados indicam que associação entre patogenicidade e virulência do fungo na doença humana e em animais susceptíveis não são análogas.

Além do estado imunitário do hospedeiro, alguns fatores relacionados ao fungo são importantes na indução e na manutenção do processo inflamatório granulomatoso, como os componentes da parede celular do fungo, principalmente a α -1,3-glucana que é um polissacarídeo presente predominantemente na forma de levedura do fungo *P. brasiliensis*, e na fase de micélio o polissacarídeo é a β -1,3-glucana (San-Blas *et al.*, 1993). A β -1,3-glucana está presente na parede celular das células dos seres do reino Fungi, enquanto a α -1,3-glucana ocorre com menor frequência nos indivíduos deste reino. Assim, Zaccarias e colaboradores (1986) que estudaram a composição da parede celular de dois isolados Pb265 e o Pb18, observaram a não existência de diferenças em relação à percentagem de hexoses encontradas na fração 1 (composta por β -1,3-glucana e quitina) em ambos isolados. Porém, o isolado Pb265 que apresenta uma menor virulência, possui uma maior percentagem de hexoses na fração 2 (que contém α -1,3-glucana e resíduos de β -1,3-glucana). Fato este que corrobora com trabalho de San-Blas & Nino-Vega (2008) que sugerem a existência de uma relação entre a quantidade de α -glucana na parede celular das leveduras dos isolados de *P. brasiliensis* com a virulência destas.

Vários autores trabalham com as leveduras do isolado Pb18 para induzir a paracoccidiodomicose experimental em animais. Em relação ao isolado Pb01, pouco se conhece sobre a infecção ocasionada por este, já que este isolado é muito utilizado para estudos moleculares, como seu transcriptoma (Felipe *et al.*, 2005). Assim, o intuito deste trabalho foi demonstrar se a levedura do isolado Pb01 é capaz de induzir a PCM em modelos murinos como a do isolado Pb18.

1.2 Resposta imune do hospedeiro na paracoccidiodomicose

A resposta imune do hospedeiro desempenha um papel fundamental na progressão da PCM, já que direciona a evolução da doença para uma das formas clínicas. Assim, a forma aguda da doença, com envolvimento de vários órgãos e que

ocasiona a morte do paciente, é acompanhada da perda gradual de respostas imunes celulares específicas e de número maior de títulos de anticorpos específicos. O pólo positivo ou hiperérgico da forma crônica da doença pode apresentar algumas lesões localizadas e que regridem com tratamento, conseguindo manter um adequado funcionamento da resposta imune celular e níveis baixos de anticorpos específicos (Fava-Netto, 1955; Mendes & Raphael, 1971). Este fato não é observado no pólo negativo ou anérgico da forma crônica da doença.

O papel de proteção da resposta imune humoral na paracoccidiodomicose é controverso. Embora possa facilitar a opsonização de fungos e mediar sua lise via complemento em soros de pacientes com doença ativa (Nogueira *et al.*, 1986) a superprodução de anticorpos em pacientes com PCM, estaria refletindo uma desregulação no balanço da resposta humoral do sistema imune, sendo relacionada com um mau prognóstico da doença. A produção de anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA é induzida pela infecção por *P.brasiliensis* (Vaz *et al.*, 1992; Blotta & Camargo, 1993). Com a disseminação da doença, observa-se a ativação policlonal de células B (com produção de altos níveis de anticorpos das classes IgG, IgE e IgA) e resposta imune celular comprometida (Chequer-Bou-Habib *et al.*, 1989). O alto nível de anticorpos nestes casos provavelmente, deve-se à disseminação de leveduras, visto que o sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro é incapaz de controlar a multiplicação das leveduras no seu interior (Diniz *et al.*, 1999).

A imunidade celular representa um dos mecanismos mais importantes de defesa do hospedeiro contra o fungo, ocorrendo uma relação inversa entre a integridade da resposta imune celular do paciente e a gravidade da doença (Mota *et al.*, 1985). A resposta imune celular é mediada principalmente por células T auxiliares do subtipo CD4+ (Th1) que são produtoras das citocinas INF γ e IL-2.

O granuloma é um componente essencial na defesa anti-*P. brasiliensis*, sendo o macrófago a sua principal célula constituinte. Vários estudos clínicos e experimentais sugerem que macrófagos ativado pelos linfócitos T têm papel fundamental na resistência a este fungo. Nos granulomas, as células T, que se localizam periféricamente, formam um manto ao redor dos macrófagos agregados no centro. A relação das células apresentadoras de antígenos com linfócitos, possivelmente pode resultar na liberação de fatores estimuladores de célula T, como interleucina 2 (IL-2). Estes linfócitos ativado secretam IL-2 e IFN- γ que atraem, fixam e ativam os

macrófagos nos focos inflamatórios. Além disso, a diferenciação dos macrófagos em células epitelióides nos granulomas, também é estimulada por IL-2 e IFN- γ .

A interação entre macrófago e linfócito T permite que o macrófago exerça suas atividades microbidas e de apresentador de antígenos. Além disto, junto com o linfócito T eles irão produzir e secretar citocinas e outros fatores, como por exemplo, óxido nítrico o qual aumenta a capacidade das células imunes localizadas no granuloma de eliminar *P. brasiliensis*, a fim de evitar a sua disseminação pelo organismo. Como a manutenção do granuloma é uma das características principais da imunidade celular, este ramo do sistema imune adaptativo exerce um papel crucial na proteção contra a infecção por *P. brasiliensis*.

Na infecção humana como na experimental há uma relação entre o padrão de citocinas produzidas e a resistência ao patógeno. Indivíduos resistentes apresentam um padrão de citocinas do tipo Th1 enquanto indivíduos susceptíveis apresentam um padrão de citocinas do tipo Th2 (Kashino *et al.*, 2000). As diferenças no perfil de citocinas podem ter um impacto no tipo de granuloma formado, principalmente na intensidade, como também, na extensão de necrose central do granuloma. Apesar de não estarem elucidados precisamente o mecanismo da formação e manutenção do granuloma, as citocinas apresentam um importante papel neste mecanismo, já que o padrão diferente de citocinas secretadas por linfócitos T localizados nos infiltrados inflamatórios influencia na evolução do granuloma (Kashino *et al.*, 2000).

Durante a formação de um granuloma típico de hipersensibilidade, um perfil de citocinas Th1 predomina, enquanto o perfil Th2 está associado a uma reação granulomatosa prejudicada e de reduzida resistência aos patógenos intracelulares (Kunkel *et al.*, 1996). Outros fatores, além das citocinas presentes, influenciam a diferenciação de uma resposta para Th1 ou Th2. Nestes incluem-se: a dose ou concentração do antígeno, o tipo das células apresentadoras de antígeno que interagem com o linfócito T e o sinal co-estimulador envolvido nessa interação (Pfeiffer *et al.*, 1991; Bretscher, 1992; Hosken *et al.*, 1995).

Os monócitos, assim como os macrófagos, quando não ativados permitem o crescimento e a multiplicação intracelular de *P. brasiliensis*. Porém, ao serem ativados pelo IFN- γ conseguem inibir o crescimento fúngico intracelular (Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994). O sistema complemento também participa no processo de inibição do desenvolvimento da doença. A ativação da via alternativa do sistema complemento pelo *P. brasiliensis*, descrita por Calich *et al.* (1979) pode resultar na opsonização do fungo,

fato este que facilita a fagocitose das leveduras pelos macrófagos (Singer-Vermes *et al.*, 1993).

Justificativa

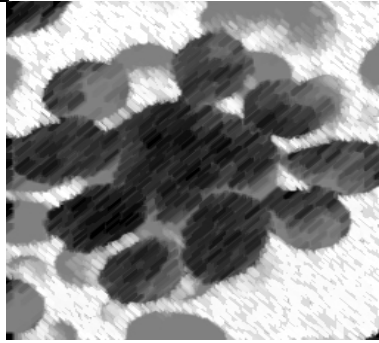
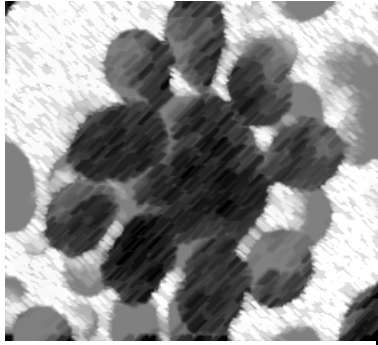
A elucidação das características de um fungo, tais como a patogenia, são necessárias para compreender se diferenças genéticas observadas entre os grupos filogenéticos do gênero *Paracoccidioides* resultam em diferenças no aspecto clínico da PCM. Além disso, sabe-se que o desenvolvimento desta doença depende da virulência da fase leveduriforme do fungo. O isolado Pb01 é usado como modelo para estudos de transcriptoma do fungo *P. brasiliensis*, porém, pouco se conhece sobre este isolado em relação a sua virulência e a resposta imunitária que induz em modelos experimentais quando comparada com isolado Pb18, o qual é amplamente utilizado em pesquisas devido ao conhecimento prévio da sua virulência e da resposta imunológica que promove nos hospedeiros.

Objetivo Geral

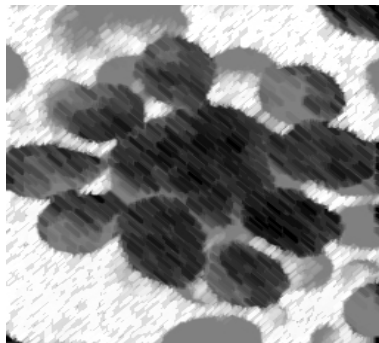
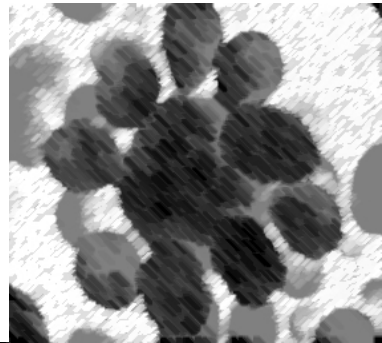
O objetivo do presente trabalho foi comparar a resposta imunológica na infecção induzida pelas leveduras dos isolados Pb01 e Pb18 do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* em modelo murino.

Objetivos específicos:

- Investigar as diferenças morfológicas entre os isolados Pb01 e Pb18;
- Observar a interação entre os macrófagos e os isolados Pb01 e Pb18;
- Caracterizar a resposta imune associada com modelos experimentais que mimetizam a doença natural, por meio da determinação de parâmetros imunológicos em diferentes vias de infecção.



Material e Métodos



Material e Métodos

1.1 Fungo

Os isolados do fungo *Paracoccidioides brasilienses* das linhagens Pb01 e Pb18, na sua morfologia leveduriforme, foram obtidos da micoteca do laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB) em meio Fava Netto sólido mantidos em estufa a 37°C, realizando-se a troca de meio a cada 15 dias.

1.2 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas com idades entre 8 a 12 semanas da linhagem C57Bl/6 os quais apresentam uma susceptibilidade intermediária a paracoccidioidomicose (Vaz *et al.*, 1992). Estes animais foram cedidos pelo biotério da Faculdade de Medicina da UnB e mantidos em condições controladas de luminosidade, com livre acesso à água e a uma dieta padrão do alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Os animais foram separados em 2 grupos (isolado Pb01 e isolado Pb18) com 20 indivíduos cada, para estabelecer a infecção sistêmica utilizou-se a via de infecção endovenosa. Na infecção pulmonar usou-se a via intratraqueal para inoculação 10^5 leveduras nos animais, subdividindo-os em 2 grupos (isolado Pb01 e isolado Pb18) com 10 indivíduos cada grupo. Além disso, realizou-se a infecção pela via intratraqueal em animais Balb/c com a inoculação de 10^6 leveduras do isolado Pb01, os quais também apresentam uma susceptibilidade à PCM similar à apresentada pelos camundongos da linhagem C57Bl/6 conforme descrição de Vaz e colaboradores (1992).

Os procedimentos realizados com os animais estão em acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê Brasileiro de Ética Animal (COBEA) e foram analisados e aceitos pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (anexo 1).

1.3 Manutenção da virulência dos isolados

A manutenção da virulência dos fungos foi feita como previamente descrito por Nascimento e colaboradores (2002), com adaptações. Uma solução de 5×10^6 células/mL de leveduras foi inoculada no peritônio de camundongos da linhagem C57Bl/6. Após 2 semanas infecção, sacrificou-se esses animais e os isolados fúngicos deles obtidos, foram utilizados na infecção dos animais de experimentação.

1.4 Morfometria dos isolados Pb01 e Pb18

Utilizou-se isolados na sua morfologia de levedura que cresceram em meio Fava Netto sólido por 7 dias, transferindo-os para crescer em meio BHI (Merck, Germany) líquido por 4, 5, 6 e 7 dias em gabinete incubação com agitação de 1,2G a 37°C. Após o período de crescimento, realizou-se a centrifugação (768,5G/5minutos) retirando-se sobrenadante e diluindo as células em 1mL PBS estéril. Usou-se uma alíquota de 10µL da solução de células mais 10µL do corante azul de algodão (Sano *et al.*, 1993) na preparação das lâminas, as quais foram observadas em microscópio óptico (Zeiss) para análise da morfometria das células de levedura, inclusive dos seus brotamentos. Mediu-se o maior diâmetro das células, já que estas possuem um formato circular/elíptico predominante. Para cada dia crescimento montou-se 2 lâminas de cada isolado fúngico, realizando-se a medida do diâmetro de 30 células leveduras e destas foram escolhidas 20 brotamentos para medição do diâmetro em cada lâmina.

1.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Soluções contendo separadamente os isolados de leveduras (Pb01 e Pb18) do fungo *P. brasiliensis* nas concentrações de 5×10^4 células/ml, foram cultivadas em meio BHI líquido e coletadas no 4º dia de crescimento. Após centrifugação 768,5G por 5 minutos, as soluções foram fixadas por 12 horas a 4°C em 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído e 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio (CACO) 0,1M, pH 7,2. Em seguida, o material foi submetido a duas lavagens de 10 minutos com tampão CACO. O material foi posteriormente pós-fixado por 1 hora em tetróxido de ósmio/ferricianeto de potássio seguido de 3 lavagens rápidas em tampão CACO e água destilada. Posteriormente, o material foi desidratado em séries cetônicas cujas concentrações foram de 30, 50, 70 e 90% de acetona, através de imersão em cada uma das soluções durante 15 min., e mais três vezes em acetona absoluta, por 10 minutos cada. Para a inclusão, foi adicionando resina Spurr às amostras de forma que estas foram imersas em acetona absoluta, na proporção (acetona: resina) de 3:1, 3:2, 1:1, 3:2 e 3:1, com intervalo de 12 horas entre cada troca e, a seguir, em resina pura por mais 12 horas (Batista *et al.*, 2006). O material foi emblocado de forma que a resina foi polimerizada em estufa a 70°C por 48 horas. Cortes ultrafinos, realizados com lâminas de vidro e de diamante, foram observados em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 operando a 80KV.

1.6 Protocolo do Co-cultivo dos macrófagos com os isolados *in vitro*

Utilizou-se a linhagem de macrófagos MH-S (ATCC, CRL-2019) os quais são derivados de macrófagos alveolares de camundongos Balb/c. Estas células foram cultivadas em placas de 24 orifícios cobertas com lamínulas na proporção de 3×10^4 células por poço em 1mL de meio RPMI1640 (Gibco, USA) suplementado com 2mM L-glutamina, 1mM piruvato de sódio, gentamicina 40mg/L e 10% soro bovino fetal inativado. Após 48 horas de cultivo em estufa a 37°C e 5% CO₂, recolheu-se o meio de cultura acrescentando novo meio RPMI 1640 com menor porcentagem (4%) de soro bovino fetal inativado.

Antes da infecção dos macrófagos, as leveduras retiradas do meio de cultura Fava Netto sólido após 7 dias de crescimento e foram ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo 20% soro fresco de camundongo e deixadas em estufa 37°C a 5% CO₂ por 30 minutos para opsonização (Tavares *et al.*, 2007). Posteriormente, realizou-se a infecção dos macrófagos com os isolados de levedura Pb01 e Pb18 na proporção de 5 macrófagos para cada levedura (Silva *et al.*, 2008), com finalidade determinar o índice fagocitose para cada isolado, assim como, a produção de NO pelos macrófagos após interação com as leveduras. Além disso, realizou-se a MET desta interação.

1.6.1 Índice de Fagocitose

Os macrófagos após serem infectados com isolados levedura foram incubados a 37°C a 5% CO₂ durante 6, 24, 48 horas, realizando-se triplicata dos experimentos para cada período. Ao termino do tempo co-cultivo, recolheu-se o meio de cultura RPMI, o qual foi centrifugado 492G/3minutos separando-se sobrenadante para dosagem de NO e as células fúngicas foram cultivadas em BHI para a contagem de CFU, representando os fungos não aderidos aos macrófagos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com 500µL PBS estéril e aquecido a 37°C com a finalidade de remover as leveduras aderidas aos macrófagos, porém não internalizadas pelos mesmos. Realizou-se o cultivo do sobrenadante das lavagens em meio BHI formando CFU denominado como fungos aderidos.

Posteriormente, as lamínulas foram fixadas, reveladas e coradas com a solução Panótico Rápido (Laborclin, Brasil) sendo que o tempo para cada passo foi de 5 segundos. Seguiu-se com as lavagens das lamínulas por 3 vezes com PBS antes de fixá-las nas lâminas (adaptado Coelho *et al.*, 2006). Foram analisadas as lâminas por meio de microscopia óptica (magnitude 1000x) e quantificando em cada lamina 100 macrófagos.

Desta forma, a capacidade fagocitária foi expressa pela porcentagem de macrófagos envolvidos na fagocitose das leveduras, como também, na porcentagem das leveduras aderidas nos macrófagos contados.

1.6.2 Dosagem Óxido Nítrico (NO)

A dosagem de Óxido Nítrico (NO) foi possível para todos os períodos de co-cultivo. Realizou-se como controle positivo na quantificação de NO, o cultivo dos macrófagos MH-S com o estímulo LPS (Sigma, USA) 1µg/mL (Krieg, 1995). O Óxido Nítrico (NO) decompõe-se em nitritos (NO₂) e nitratos (NO₃) no meio de cultura celular. A produção de NO₂ pelos macrófagos pode ser quantificada pelo ensaio colorimétrico da reação de Griess (Green *et al.*, 1981).

Na dosagem adicionou-se 100µl do sobrenadante de cultura de macrófagos cultivados em meio RPMI com isolados fúngicos por 6, 24, 48, 72 e 96 horas, com o mesmo volume do reagente de Griess composto por: NEED 0,1% [N-(1-Naphthyl)ethylenediamine - Sigma, USA] e 1% sulfanilamida diluída em 5% ácido fosfórico (H₃P0₄) (Nascimento *et al.*, 2002). As amostras foram lidas em leitor de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) com filtro de 540nm. Os resultados foram expressos em µM de NO₂ comparando-se a DO (Densidade Ótica) das amostras do experimento com a DO da curva padrão de NaNO₂ a qual possui variação de 3,125 a 200µmol (Bocca *et al.*, 1999; Nascimento *et al.*, 2002).

1.6.3 MET da interação macrófago com isolados do *P. brasiliensis*

No tempo 72 horas de interação dos macrófagos MH-S com os isolados das leveduras (Pb01 e Pb18), os macrófagos desprendiam-se do fundo da placa de cultura o que facilitou e possibilitou a realização da microscopia eletrônica de transmissão do co-cultivo. Seguiu-se a mesma descrição do item 1.5 para realização deste procedimento.

1.7 Preparação dos isolados para infecção via endovenosa e via intratraqueal nos animais experimentais

As leveduras recuperadas conforme item 1.3 foram cultivadas num volume 50mL de meio BHI (Merck, Germany) suplementado com 1,5% (g/100mL) dextrose e 0,04mg/mL gentamicina, em gabinete incubação com agitação de 1,2G a 37°C. Todo procedimento foi realizado em condições estéreis. Após período 5 dias, a solução foi centrifugada (492G/5min), as células foram lavadas 2 vezes com PBS e posteriormente

contadas as células com auxílio de hemocitometro. Preparou-se uma suspensão fúngica cuja concentração era 1×10^7 leveduras/mL e a viabilidade das células foi determinada pela utilização do corante vital Verde Janus 0,05% (Merck, Germany) (Dias *et al.*, 2004) resultando numa quantidade de células viáveis superior a 80%.

Na infecção sistêmica, os camundongos foram previamente anestesiados com solução de éter etílico 70% para a inoculação de 100 μ L desta suspensão dos isolados fúngicos pela via endovenosa do plexo venoso retro-orbital.

Na infecção pulmonar, os camundongos foram anestesiados com 100 a 200 μ L da solução [0,1mL xilagina -cloridrato 2(2,6xilidino)5,6dihidro-4H-1,3tiazina; Rompun, Bayer - e Ketamina 10% - cloridrato de ketamina; Agener, União Farmacêutica Nacional - diluídas em 0,8mL PBS estéril], seguindo-se uma relação 100 μ L da solução anestésica para cada 10g peso corpóreo dos animais. Após 10 minutos, realizou-se uma pequena incisão na pele próxima da região das glândulas tireóide e as camadas de tecidos foram separadas para expor a traquéia. Utilizando uma seringa de 1mL com calibre da agulha 30G dispensou-se 50 μ L de uma solução fúngica cuja concentração era de 1×10^5 leveduras para o isolado Pb18 e também para o isolado Pb01, e utilizou-se uma solução com maior concentração (1×10^6) de leveduras do isolado Pb01. Posteriormente, os animais foram suturados e mantidos cobertos por maravalha durante uma hora em ambiente aquecido (Cano *et al.*, 1995 e Pina *et al.*, 2006).

1.8 Protocolo experimental da infecção sistêmica *in vivo*

Após 15, 30 e 60 dias de infecção os animais foram sacrificados e avaliados em relação à evolução da doença por meio da quantificação das unidades formadoras de colônia no tecido pulmonar e análise histopatológica deste órgão. Avaliação da resposta imunológica foi feita através ensaio de proliferação celular e dosagem de anticorpos.

1.8.1 Unidades formadoras de colônia (CFU) do pulmão

Antes do sacrifício os animais foram anestesiados com solução de éter a 70% para retirada do sangue pela via retro-orbital e em seguida realizou-se o deslocamento cervical. Transferidos para fluxo laminar, os animais foram fixados na posição de decúbito dorsal em uma plataforma. Fez-se assepsia do tórax e abdômen com álcool etílico 70% para retirada dos órgãos como: baço e pulmão.

Retirou-se um pedaço de aproximadamente 2 cm² da região mediana de um dos lobos pulmonares para análise histopatológica. Os restos dos lobos foram pesados e

dilacerados assepticamente em 1mL de PBS estéril. O homogenato obtido, foi cultivado em meio sólido BHI (Merck, Germany) suplementado com 4% (v/v) de soro cavalo inativado (Gibco, USA); 5% (v/v) do filtrado do meio de cultura do isolado Pb192; 1,5% (g/100mL) de dextrose e a proporção 40mg/L do antibiótico gentamicina. Suplementos necessários para crescimento do fungo *P. brasiliensis*, conforme (Singer-Vermes *et al.*, 1992; Cano *et al.*, 1995). As placas de cultura foram incubadas em estufa a 37°C por até 15 dias quando foram contadas as CFU.

1.8.2 Histopatologia do pulmão

Os lobos pulmonares são os locais de preferencial deposição das leveduras do fungo *P. brasiliensis* (Linares e Friedman, 1972; Brummer *et al.*, 1993). Fragmentos de aproximadamente 2 cm² da região mediana de um dos lobos pulmonares foram coletados e fixados em solução de tampão fosfato com 10% de formol. Após fixação, os fragmentos foram desidratados em solução alcoólica de 70 a 100% de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em parafina. Realizaram-se cortes de 5µm de espessura os quais foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e alguns casos as lâminas também foram coradas com corante metenamina-nitrato de prata (Grocott) para visualização em microscópio óptico.

1.8.3 Ensaio de proliferação celular

O baço foi retirado de forma asséptica e dilacerado em meio RPMI 1640 (Gibco, USA) suplementado com 2mM L-glutamina, 1mM piruvato de sódio, 2-mercaptoetanol, gentamicina 40mg/L, 5% (v/v) de aminoácidos não essenciais (Sigma, USA) e soro bovino fetal (Bocca *et al.*, 1999). As células foram contadas com auxílio de hematocitometro e cultivadas em placas de cultura de células com 96 orifícios de fundo chato na proporção de 3x10⁵ células em 100µL/poço. Os linfócitos em cultivo foram estimulados por antígenos como: o mitógeno inespecífico concanavalina A (ConA) (0,4µg/ poço, Sigma); extrato protéico da parede do fungo *P. brasiliensis* (antígeno-específico) numa proporção de diluição de 100 e 500 vezes. Este experimento foi realizado em triplicada para cada estímulo num volume final de 100µL/poço.

Após 48horas de incubação na estufa a 37°C e a 5% CO₂ adicionou-se 0,5µCi/poço de timidina tritiada [³H] TdR (Amersham, Arlington Heights) (Omarsdottir *et al.*, 2005). Após 16 horas, as células foram coletadas em uma membrana de filtro (Whatman, England) e a radioatividade do filtro foi determinada por um contador de cintilação β

líquida (Beckman, Packard LS Analyzer 6500), o qual expressa os resultados em contagem de pulsos por minuto (cpm). Os resultados foram expressos na forma de índice de proliferação que consiste na seguinte fórmula:

$$\text{Índice proliferação} = \frac{\text{cpm linfócitos obtidos animais infectados}}{\text{cpm linfócitos obtidos dos animais normais}}$$

1.8.4 Dosagem de anticorpos (IgG1 e IgG2a) pelo método ELISA

As amostras sanguíneas dos animais foram coletadas e identificadas, deixando em repouso por 4 horas antes de serem centrifugadas 492G/3min para obtenção do soro, o qual foi utilizado para dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a. Em parceria com laboratório do prof^o Dr^o Célio Lopes Silva (USP-Ribeirão Preto-SP, Brasil) realizou-se os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em placas de 96 orifícios (Nunc) sensibilizadas com 100µL do extrato protéico da parede do fungo *P. brasiliensis* na diluição de 1:50, por 12 horas a 4°C. Em seguida, os orifícios foram bloqueados com tampão fosfato acrescido de caseína a 2% durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, as amostras dos soros diluídas 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000 foram incubados por 2h a 37°C. Após este período, a placa foi lavada com tampão lavagem (fosfato mais 0,05% Tween20) e incubada com anticorpos específicos de camundongo para os isótopos IgG1 e IgG2a diluídos 1:5000 pelo período de 2h a 37°C. Seguiu-se com a lavagem das placas com tampão de lavagem por 7 vezes, para acrescentar H₂O₂ e a fenilenediamina desenvolvendo-se a reação. Interrompeu-se com 20µL de H₂SO₄ a 2N, realizando-se as leituras em filtro de 490nm na leitora de placas de ELISA (BIORAD, modelo 2550, CA,USA).

1.9 Protocolo experimental da infecção intratraqueal *in vivo*

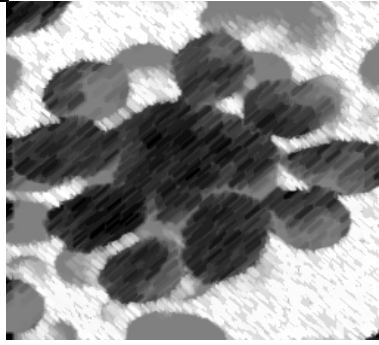
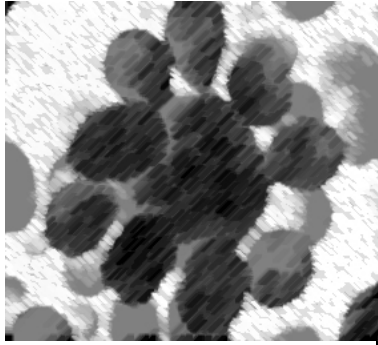
Avaliação da evolução da doença nos animais foi feita por meio do sacrifício destes após 15, 30 e 60 dias de infecção para quantificação das unidades formadoras de colônia no tecido pulmonar e análise histopatológica deste órgão, realizado conforme item 1.8.2. A análise da resposta imunológica foi feita através da dosagem de anticorpos e de óxido nítrico seguindo o mesmo protocolo descrito nos itens 1.8.4 e 1.6.2, respectivamente.

1.9.1 Recuperação dos isolados de levedura do pulmão

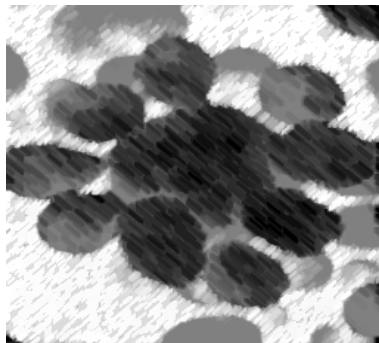
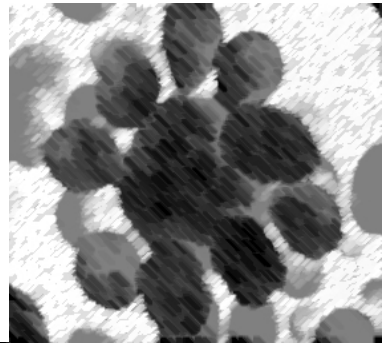
A determinação do número de microorganismos viáveis no pulmão dos animais infectados foi determinada pela contagem CFU nos períodos 15, 30 e 60 dias após infecção. Foram sacrificados 3 animais de cada grupo por período, seguindo os mesmos procedimentos descritos nos item 1.8.1. Removendo assepticamente o pulmão, o qual foi pesado e dilacerado em 1mL de PBS estéril. O homogenato formado foi centrifugado (768,5G por 5 minutos), retirando-se 100µL do sobrenadante para dosagem de NO (descrição item 1.6.2). O pellet formado foi diluído em 500µL PBS estéril e cultivado em placas contendo meio BHI que foram incubadas em estufa a 37°C por até 15 dias quando foram contadas as unidades formadoras de colônia (CFU) (Cano *et al.*, 1995 e Pina *et al.*, 2006).

1.10 Análise Estatística

Foi utilizada análise da variância (ANOVA) para determinar as diferenças entre os grupos experimentais, seguida pelo método pós-teste (Bonferroni *t test*). Testes e análises foram feitos pelo programa GraphPad Prisma versão 4.0 para Windows (San Diego, Califórnia, USA). Dados foram considerados significativos quando $p < 0,01$.



Resultados



Resultados

1- Comparações morfológicas entre os isolados Pb01 e Pb18 cultivados *in vitro*

As diferenças morfológicas entre isolados da mesma espécie ou de espécies diferentes são importantes para determinar a sua virulência e patogenicidade. Para analisar se, para os dois isolados estudados, estas diferenças também interferem na relação entre as leveduras e o hospedeiro, realizaram-se as análises morfológicas por microscopia óptica e eletrônica.

1.1-Análise morfométrica dos isolados

O intervalo dos diâmetros encontrados para os isolados Pb01 e o Pb18 estão representadas na **Tabela 1**. Observou-se que nos dias 4 e 5, os dois isolados apresentaram leveduras dentro do mesmo intervalo, e após o 5º dia de cultivo o Pb18 apresentou células com diâmetros maiores. Analisando o diâmetro médio destas leveduras, foi observado que as células do Pb01 apresentaram uma tendência de queda do diâmetro a partir do 5º dia de crescimento (**figura 1A**). Em relação aos brotamentos do Pb01, observou-se que não houve uma diminuição dos seus diâmetros de forma linear como observado nas células mães. Para as células do Pb18, observou-se que o 6º dia representa o período onde as leveduras (células mães) apresentaram o maior diâmetro quando comparado com os demais dias da cinética.

Os resultados corroboram com dados da literatura, os quais dizem que o diâmetro da célula mãe é uma grandeza inversamente proporcional ao diâmetro dos seus respectivos brotamentos (Del Negro *et al.*, 1982). Para o isolado de levedura Pb18, o 6º dia apresentou um pico no aumento do diâmetro da célula mãe e um forte decréscimo nos valores do diâmetro de seus brotamentos (**figura 1 e tabela 1**).

Analisando os resultados obtidos para os dois isolados, observou-se que ambos apresentam diferenças significativas em relação ao tamanho dos seus brotamentos. Pois, os brotamentos do Pb18 apresentam os maiores valores de diâmetro quando comparado com os brotamentos do Pb01 (**figura 1B e tabela 1**).

Avaliando a morfologia das células dos isolados observou-se que o Pb01 apresenta um formato circular predominante tanto para células como para seus brotamentos

(figura 2A, 2B e 3A), já o Pb18 apresenta células com formato circular e seus brotamentos apresentam uma morfologia elíptica (figura 2C, 2D e 3D).

Tabela 1: Morfometria do Pb01 e Pb18 no 4º, 5º, 6º e 7º dia de cultivo em meio BHI líquido.

Estrutura celular	4º dia		5º dia		6º dia		7º dia	
	Pb01	Pb18	Pb01	Pb18	Pb01	Pb18	Pb01	Pb18
Célula								
Diametro (µm)	10 - 25	10 - 26	10 - 22	8 - 22	9 - 20	8 - 30	8 - 16	12 - 30
Média	14,98	16,92	14,92	15,67	13,64	20	12,3	16,7
Desvio Padrão	3,2	4,03	3,05	3,5	3,2	4,5	2,4	3,8
Brotamento								
Diametro (µm)	0 - 14	0 - 27	0 - 14	0 - 24	0 - 14	0 - 30	0 - 13	0 - 30
Média	6,7	17,95	9,35	18,8	7,25	9,8	7,4	14,75
Desvio Padrão	2,72	6,16	2,62	2,91	3,0	6,65	2,78	6,87

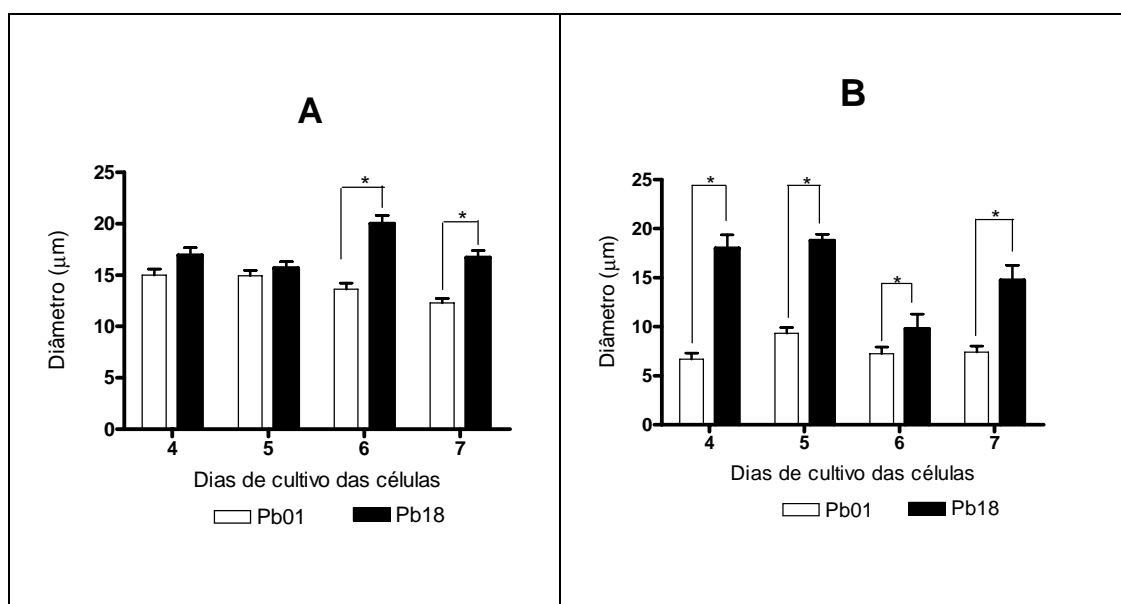


Figura 1: Gráficos que representam à média aritmética dos valores do diâmetro dos isolados de levedura Pb01 e Pb18. O gráfico (A) apresenta os valores do diâmetro das células dos isolados, ou seja, as células mães, e o gráfico (B) representa os valores do diâmetro dos brotamentos dos isolados de levedura. Experimentos realizados em duplicata e com diferença estatística de $p < 0,05$ * representa diferença estatística significativa entre os grupos Pb01 e Pb18.

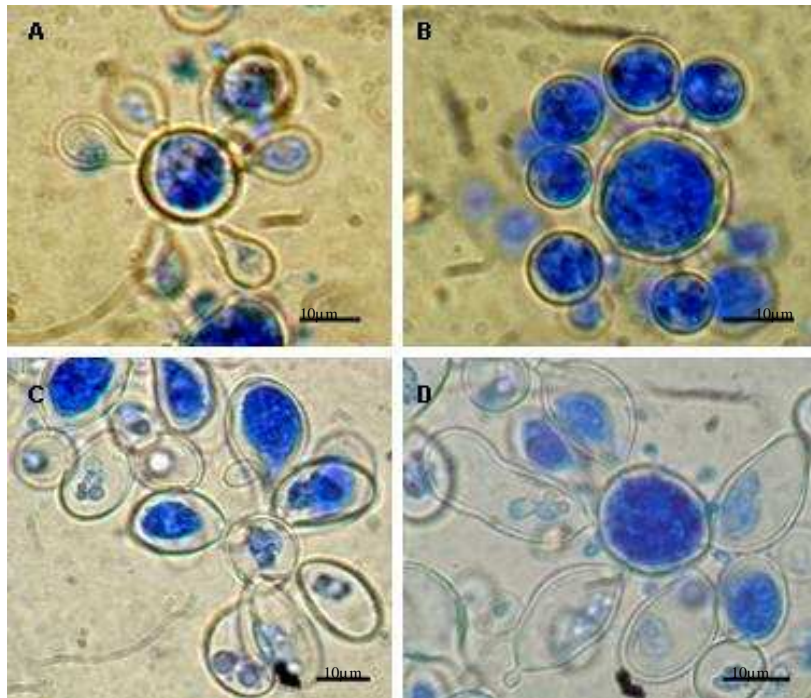


Figura 2: Imagens em microscopia óptica ilustrando as diferenças morfológicas entre o Pb01 e o Pb18, corados com azul de algodão. (A) e (B) ilustram o Pb01 no 4° e no 5° dia de crescimento respectivamente. (C) e (D) mostram respectivamente, o Pb18 no 4° e no 5° dia de crescimento. (Barra igual à 10µm, magnitude das imagens 1000x).

1.2 Microscopia Eletrônica Transmissão (MET) dos isolados

Com intuito de verificar se haveria alguma diferença na característica ultra-estrutural da parede celular, como espessura e constituição de microfibrilas entre as células de levedura dos dois tipos de isolados, realizou-se a caracterização ultra-estrutural das leveduras dos isolados Pb01 e Pb18.

Analisando as imagens da célula do Pb01 observou-se que a parede celular apresentou espessura variando entre 0,160 a 0,423µm (média = 0,31µm e SD = 0,08 **figura 3A**) enquanto que a espessura da parede celular dos brotamentos variou entre 0,106 a 0,200µm (média = 0,14µm e SD = 0,03 **figura 3C**). Para o Pb18, as imagens das células apresentaram uma parede celular com espessura de 0,149 a 0,237µm (média= 0,187µm e SD = 0,032 **figura 3B**). A parede celular dos brotamentos do Pb18 apresentou uma espessura de 0,047 a 0,064 (média = 0,05µm e SD = 0,01 **figura 3D**). Comparando-se os dois isolados, observou-se que a célula do Pb01 possui a parede celular 1,65 vezes mais espessa que a da célula do Pb18.

Os isolados apresentaram também diferenças significativas com relação à presença de microfibrilas, já que o Pb01 apresentou uma parede celular composta por microfibrilas de forma mais densa que o Pb18 (**figura 3C e 3D**). Estes dados corroboram com os resultados da morfometria, onde se observou uma disparidade no tamanho dos brotamentos entre os isolados, como também, diferenças nas suas morfologias.

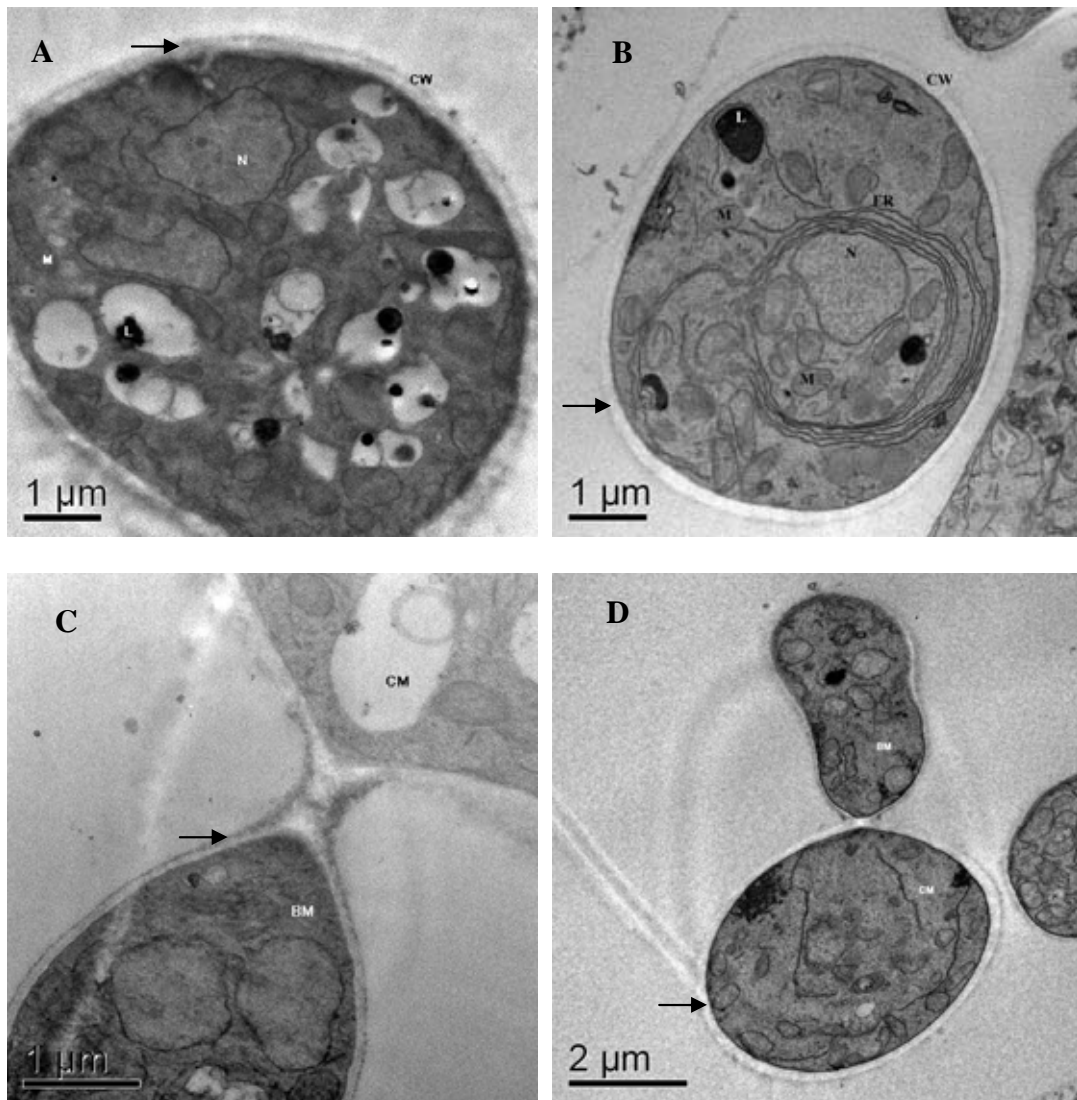


Figura 3: Eletromicrografias de transmissão do Pb01 e Pb18 do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Imagens A e C representam o Pb01, em B e D observa-se o Pb18. Imagens C e D demonstram o momento de separação entre a célula e seu brotamento dos isolados. Abreviações: (M) mitocôndria, (N) núcleo, (L) corpos de lipídeos, (ER) retículo endoplasmático, (CM) célula mãe, (BM) brotamento, (CW) parede celular. As setas indicam as microfibrilas da parede celular dos isolados. Magnitude A e C 30.000x; B 20.000x; D 15.000x.

2- Interação dos isolados Pb01 e Pb18 com macrófagos MH-S *in vitro*

2.1-Capacidade de fagocitose dos macrófagos

Considerando as diferenças morfológicas observadas entre os isolados, realizaram-se os ensaios de fagocitose para investigar se havia alguma diferença nas etapas de aderência, internalização e destruição das leveduras pelos macrófagos no período de 6, 24 e 48 horas de co-cultivo (**figuras 4 e 5**). Após 6 horas de co-cultivo, o isolado Pb01 apresentou uma maior adesão aos macrófagos quando comparado ao isolado Pb18. Com 24 horas de co-cultivo, esta relação se inverte e o Pb18 está mais aderido aos macrófagos do que o Pb01, porém com 48 horas os macrófagos apresentam mais células do Pb01 aderidos na sua superfície.

Em relação ao processo de fagocitose, os macrófagos MH-S internalizaram um número maior de leveduras do isolado Pb01 em todos os tempos analisados. O isolado Pb01 apresentou uma maior adesão e uma menor internalização com 6 horas de co-cultivo e esta relação foi invertida em 48 horas. Esta cinética não foi observada pelo Pb18 que apresentou uma maior percentagem de células aderidas do que internalizada em 6 e 24 horas de co-cultivo (**figura 4**).

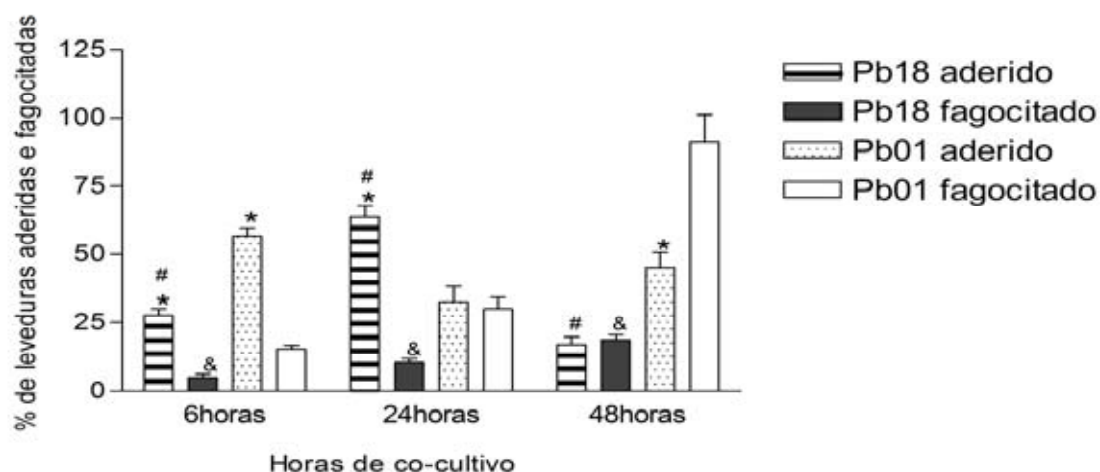


Figura 4: Capacidade de fagocitose dos macrófagos MH-S *in vitro* em relação ao Pb01 e Pb18. Macrófagos foram incubados com leveduras opsonizadas na proporção de 5:1 a 37°C e a 5% CO₂. Experimentos realizados em triplicata e com diferença estatística de $p < 0,001$ * representa diferença estatística significativa entre os grupos aderidos e fagocitados dos dois isolados; # representa a diferença entre os grupos aderidos dos dois isolados; e & representa a diferença entre os grupos fagocitados dos dois isolados.

Para confirmar os dados da aderência e fagocitose, realizou-se o cultivo dos sobrenadantes dos co-cultivos, em duas situações distintas: cultivo dos fungos não aderidos aos macrófagos e o cultivo dos fungos aderidos e não internalizados pelos macrófagos (**figura 5**). Com 6 horas de co-cultivo os dois isolados apresentaram um grande número de células não aderidas viáveis e um número similar de células aderidas viáveis. O Pb18 apresentou uma quantidade maior de células viáveis não aderidas e aderidas após 48 horas quando comparado com o Pb01, demonstrando que a internalização mais eficiente do Pb01 diminui as leveduras viáveis do meio de cultura.

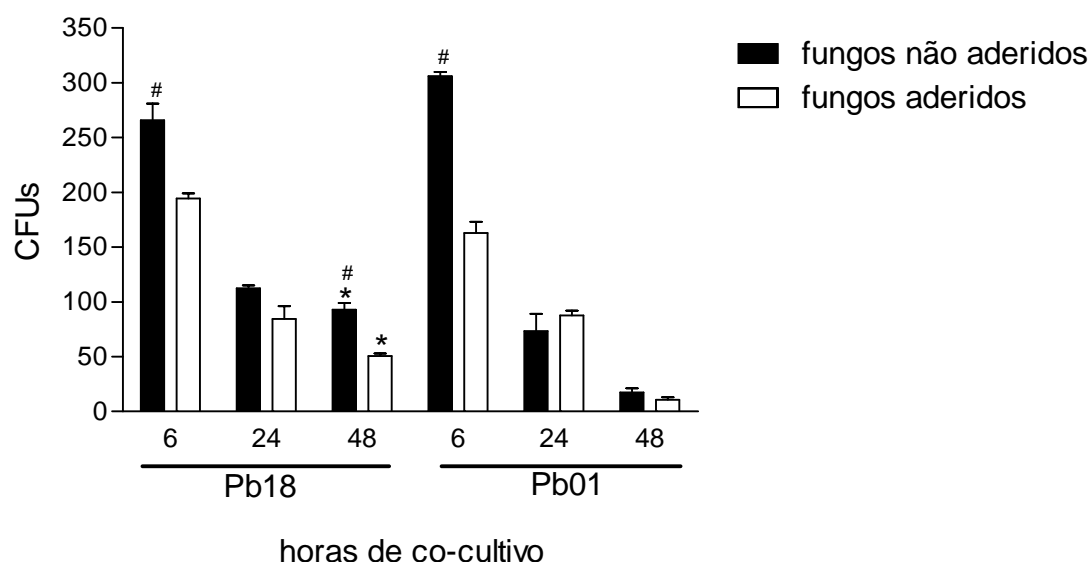


Figura 5: Viabilidade das células dos isolados nos ensaios de fagocitose. Barras hachuradas representam os fungos não aderidos e as barras em branco os fungos aderidos aos macrófagos. Experimentos realizados em triplicata e com diferença estatística de $p < 0,001$ # representa diferença estatística significativa entre os grupos dos fungos não aderidos e os grupos dos fungos aderidos de cada isolado; * representa diferença estatística significativa entre os grupos dos isolados Pb01 e Pb18 em cada ponto de co-cultivo.

2.2 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico é um mecanismo microbicida importante para a destruição do *P. brasiliensis*. Sendo assim, analisou-se a produção deste importante mediador pelos macrófagos MH-S nos tempos 6, 24, 48, 72 e 96 horas após co-cultivo pelo método colorimétrico da reação de Griess (Green *et al*, 1981) (**figura 6**).

Observa-se que até o período de 48 horas a produção de NO pelos macrófagos infectados com isolado Pb01 e Pb18 são similares. Após 72 horas de co-cultivo, os macrófagos infectados com os dois isolados aumentaram a produção de NO, fenômeno observado até o período 96 horas, porém os níveis deste mediador foram superiores para o isolado Pb01 do que para o Pb18 (**figura 6**).

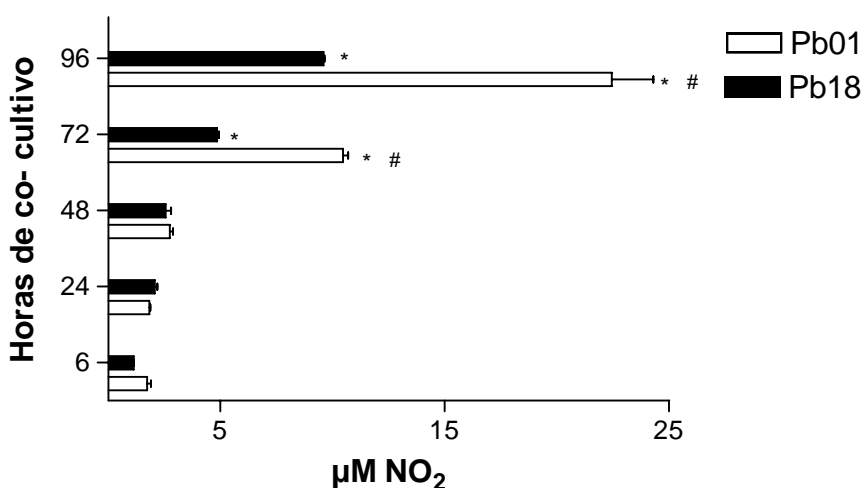


Figura 6: NO liberado pelos macrófagos MH-S em co-cultivo. Macrófagos foram infectados com as leveduras do fungo *P. brasiliensis* após 6, 24, 48, 72 e 96 horas, o sobrenadante do meio cultura foi coletado e quantificado as concentrações em micromolar (μM) NO₂ pela reação de Griess. Barras pretas representam o isolado Pb18 e Barras brancas o isolado Pb01. Os resultados apresentados no gráfico foram comparados com dados obtidos dos macrófagos estimulados com controle positivo. Experimentos realizados em duplicata e com diferença estatística em relação ao tempo 6 horas $p < 0,05$. # representa diferença estatística significativa entre os grupos Pb01 e Pb18 no mesmo período co-cultivo; * representa diferença estatística significativa de cada grupo comparado com o seu período de 6 horas co-cultivo.

2.3 Microscopia eletrônica transmissão da interação *P.brasiliensis* com células MH-S

A interação entre os macrófagos MH-S e o Pb01 ou Pb18 foi avaliada utilizando o MET, após 72 horas de co-cultivo (**figura 7**). Observou-se que os macrófagos são capazes de fagocitar as leveduras dos dois isolados, porém os macrófagos são mais velozes em ingerir o isolado Pb01, uma vez que foi evidenciado um maior número de leveduras dentro das células (**figura 7D**) quando comparada a mesma situação com o isolado Pb18 (**figura 7A**). Em algumas situações observou-se que a internalização de 5 leveduras ou mais pelos macrófagos induz a lise celular (**figuras 7C e 7D**).

As imagens apresentam uma diferença na coloração dos isolados que se encontram no interior da célula em relação aos aderidos à mesma (**figura 7B**) isto é ocasionado pela alta concentração óxido nítrico no interior celular, ou seja, dentro fagolisossomo.

3- Interação dos isolados Pb01 e Pb18 com o hospedeiro *in vivo*

Para analisar a capacidade de induzir uma infecção em modelo experimental utilizamos dois modelos de infecção dos fungos, por via endovenosa e intratraqueal.

3.1 – Via de infecção endovenosa

Os animais deste grupo foram infectados com leveduras dos dois isolados e a avaliação da evolução da doença nos camundongos foi feita através de sacrifício dos animais após 15, 30 e 60 dias de infecção para análise histopatológica das lesões e a quantificação da carga fúngica no tecido pulmonar. A resposta imunológica foi analisada através do ensaio de proliferação celular de esplenócitos e dosagem de anticorpos.

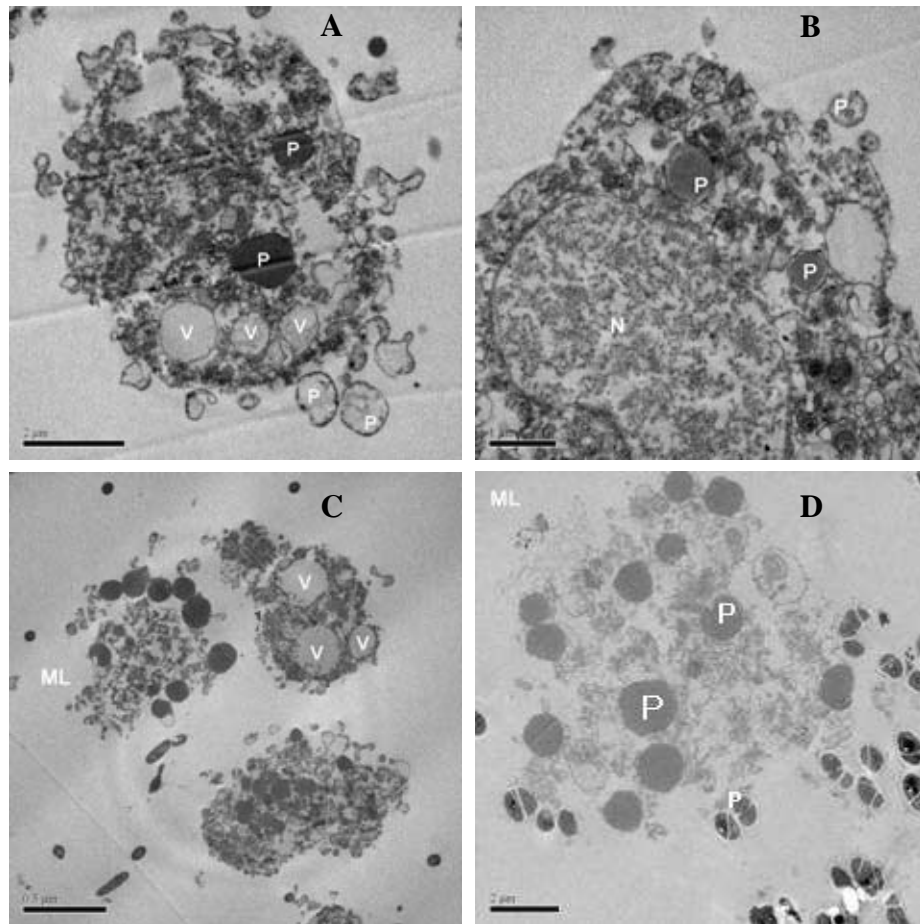


Figura 7: Microscopia eletrônica transmissão da interação das leveduras de *P.brasiliensis* com células MH-S após 72 horas. As imagens **A, **B** e **C** representam à interação do macrófago com o Pb18 e a imagem **D** com o Pb01. Abreviações: ML macrófago lisado; V-vacúolo; N-núcleo; P-isolados levedura. Magnitude **A** 15.000x; **B** 20.000x; **C** 5.000x; **D** 10.000x.**

3.1.1 - Análise histopatológica do pulmão dos animais dos dois grupos experimentais

A resposta inflamatória foi avaliada em cortes do pulmão, corados com HE, dos animais sacrificados após 15, 30 e 60 dias de infecção (**figura 8 e 9**).

Os animais inoculados por via endovenosa com leveduras do isolado Pb18 do fungo *P.brasiliensis* apresentaram resposta inflamatória progressiva no tecido pulmonar que está diretamente relacionada à disseminação e reprodução do fungo pelo organismo dos animais. Após 15 dias do curso de infecção (**figura 8A**) houve um leve comprometimento pulmonar caracterizado por um infiltrado localizado na região peribronquiovascular constituído de forma predominante por células mononucleares contendo algumas leveduras no seu interior, formando o granuloma.

Aos 30 dias de infecção, o comprometimento pulmonar foi mais extenso, caracterizado pela formação de múltiplos granulomas de diferentes tamanhos e que se localizam de forma difusa no parênquima pulmonar (**figura 8B**). Apresentando várias leveduras no interior das células gigantes e com poucas células epitelióides, porém há necrose no centro granuloma.

O comprometimento pulmonar acentuou-se com a progressão da infecção (60 dias). Apresentando granulomas confluentes e com predomínio de células epitelióides no seu interior envolvendo as numerosas leveduras do *P.brasiliensis* (**figura 8C**).

A reação inflamatória no tecido pulmonar em resposta à infecção via endovenosa com leveduras do isolado Pb01 não apresentou formação de granulomas como observado nos animais infectados com isolado Pb18. Mas, há evidências do processo inflamatório, pois houve um aumento do infiltrado linfocitário na região periobronquiovascular ao longo dos dias após infecção (**figura 9**). Os infiltrados inflamatórios são compostos por pequenas células mononucleares com pouca diferenciação morfológica e que apresentam características de núcleo arredondado e hipercromático. Realizou-se a coloração de Grocott das lâminas (**figura 9 A₁, B₁ e C₁**) para verificar a presença de fungos, porém os infiltrados inflamatórios não apresentaram nem vestígios de células mortas dos fungos.

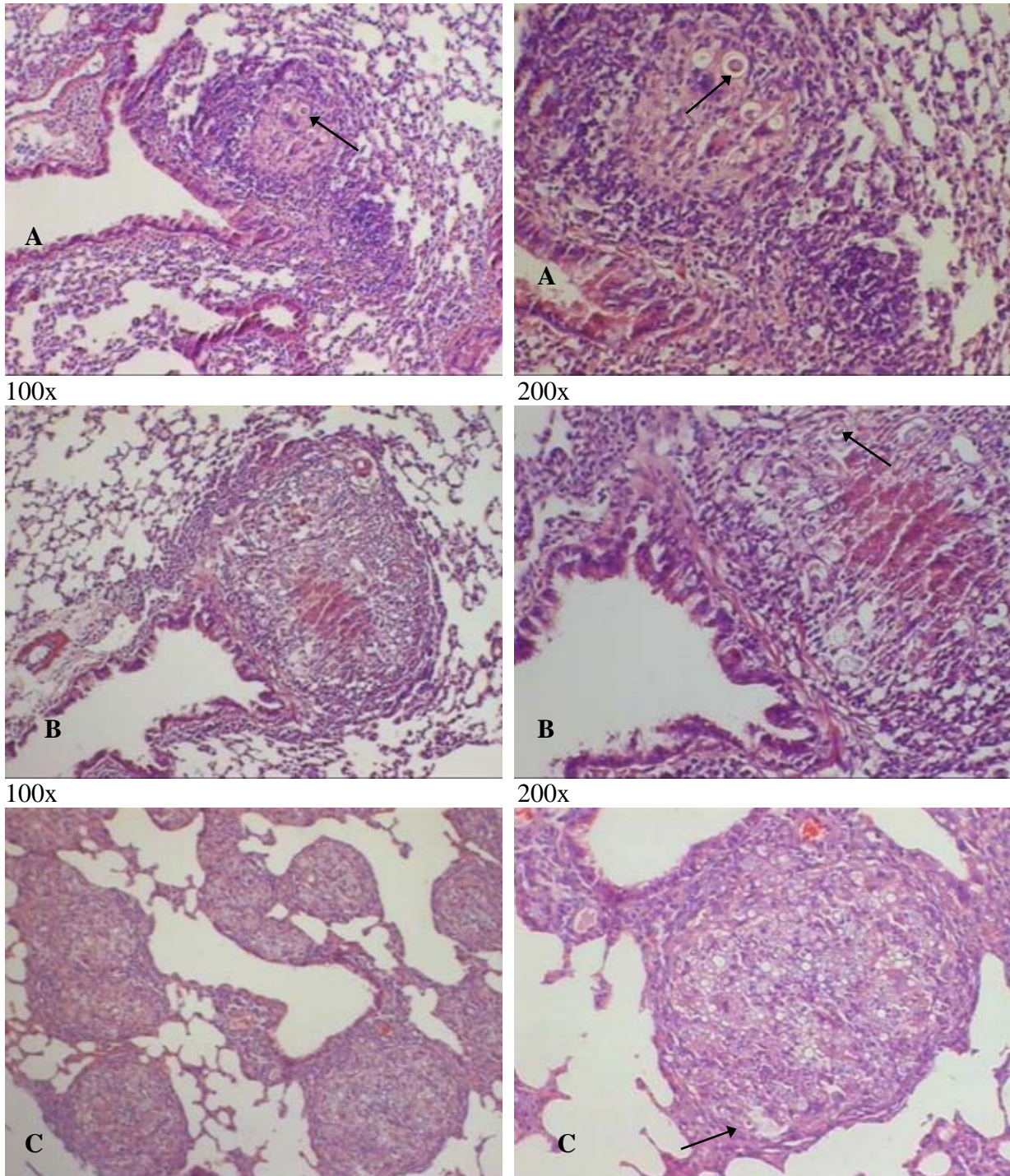


Figura 8: Fotomicrografias mostrando a evolução da lesão granulomatosa pulmonar ocasionada pela inoculação por via endovenosa de 1×10^6 leveduras do isolado Pb18. À esquerda as imagens possuem uma magnitude 100x e na direita de 200x. As fotomicrografias denominadas A, B e C representam respectivamente, animais infectados e sacrificados com 15, 30 e 60 dias após infecção. As setas indicam as leveduras do isolado Pb18 no interior do granuloma.

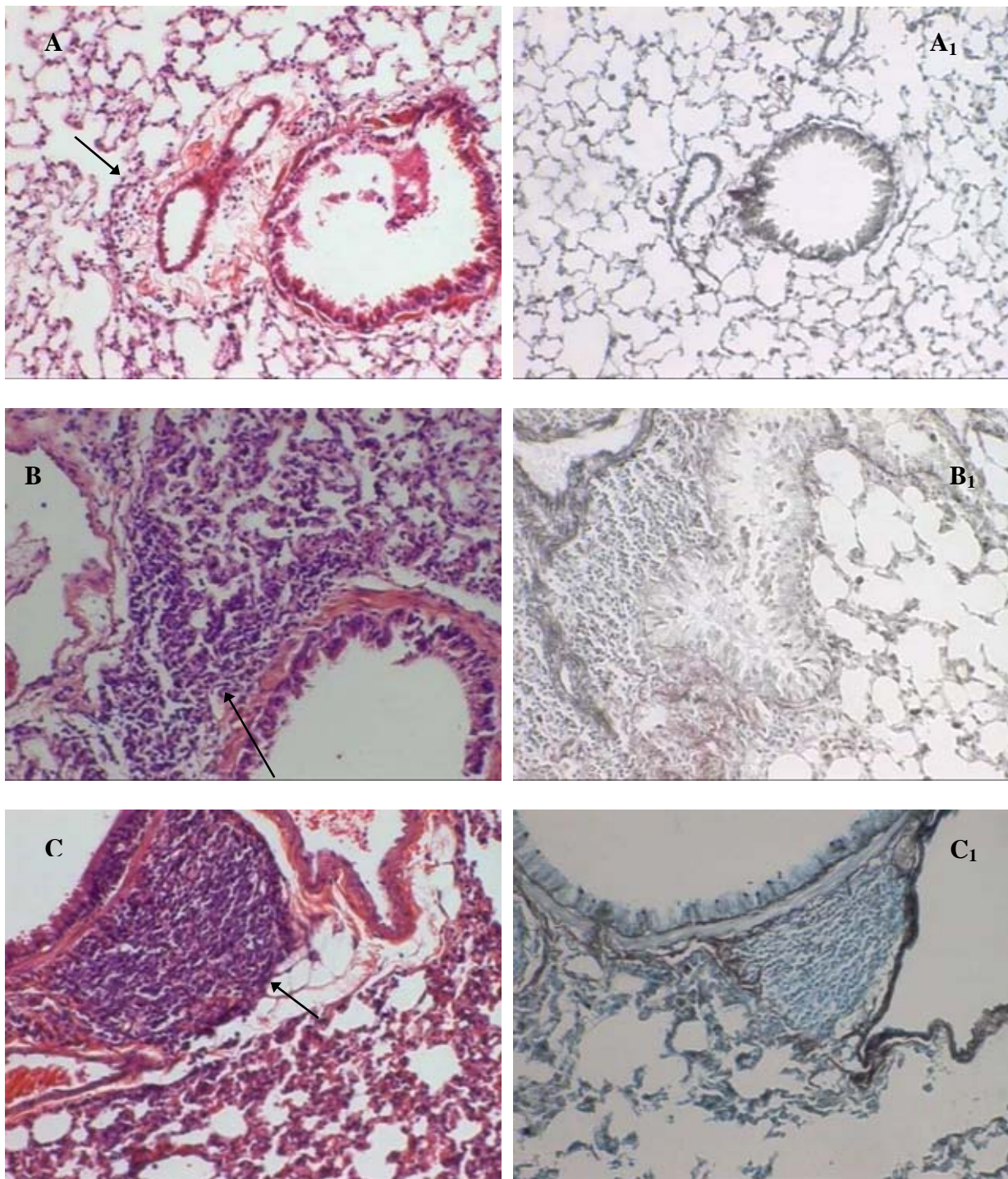


Figura 9: Fotomicrografia dos infiltrados inflamatórios induzido no pulmão dos animais infectados via endovenosa com isolado Pb01 do fungo *P. brasiliensis*. À esquerda as imagens (A, B e C) foram coradas com HE e na direita as imagens (A₁, B₁ e C₁) a coloração foi a Grocott. As imagens possuem uma magnitude 200x. As fotomicrografias denominadas A e A₁; B e B₁; C e C₁ representam respectivamente, animais infectados e sacrificados com 15, 30 e 60 dias após infecção. As setas indicam o infiltrado linfocitário na região periobronquiovascular.

3.1.2 Determinação do número de leveduras viáveis no tecido pulmonar

O grupo inoculado com isolado Pb01 houve crescimento das unidades formadoras de colônia somente para os pontos de 15 e 30 dias após infecção (**figura 10A**). Na avaliação da recuperação das colônias do fungo *P.brasiliensis* dos camundongos C57Bl/6 infectados com isolado Pb18 observa-se um aumento progressivo no número de unidades formadoras de colônia (CFU) recuperadas do pulmão destes animais até 60 dias após infecção (**figura 10B**). O grupo inoculado com isolado Pb18 obteve uma média de 160, 373 e 1115 colônias recuperadas do pulmão dos animais com um desvio padrão \pm 16, 12, 85 respectivamente após 15, 30 e 60 dias infecção. Diferindo da resposta do isolado Pb01, na qual houve uma média 1 colônia por animal sacrificado para pontos de 15 e 30 dias após infecção e nenhuma colônia foi recuperada com 60 dias.

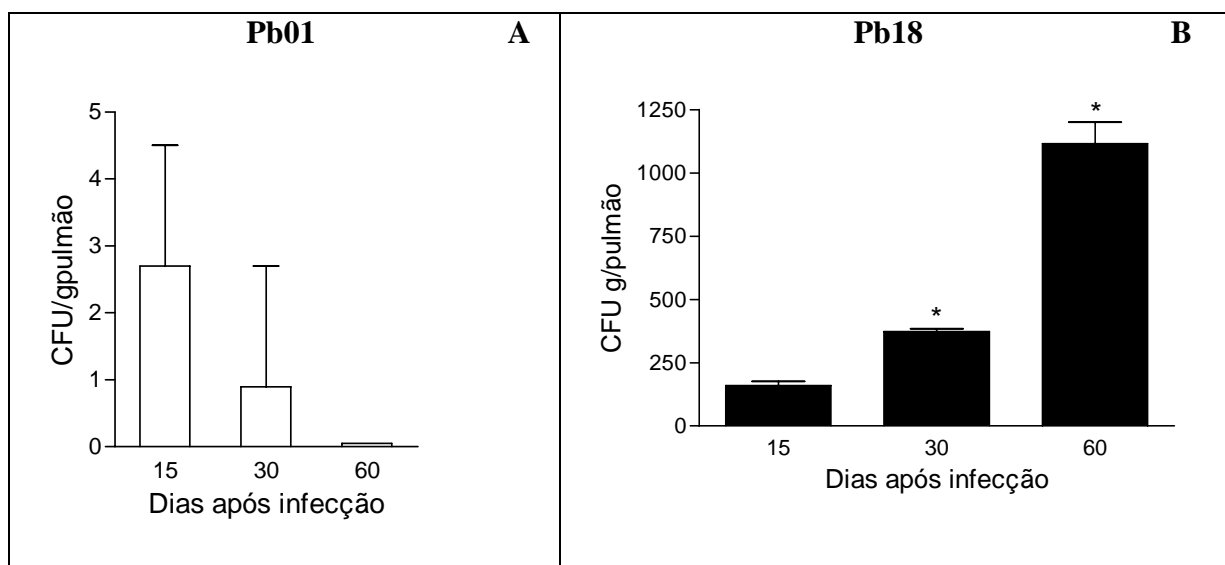


Figura 10: Cinética da recuperação das CFU do pulmão durante o curso da infecção sistêmica com os isolados Pb01 e Pb18. Os resultados foram expressos em CFU/grama de pulmão. (A) representa o grupo Pb01 e (B) o grupo Pb18. As barras representam a média \pm desvio padrão das unidades formadoras de colônias recuperadas dos 4 animais sacrificados por cada ponto experimental. * diferença estatística dos pontos analisados em relação ao ponto de 15 dias após sacrifício, com $p < 0,001$.

3.1.3 - Capacidade linfoproliferativa dos animais com infecção sistêmica

Os linfócitos em cultivo foram estimulados por antígenos como: Concanavalina A – ConA (Sigma, USA), extrato protéico da parede do fungo *P. brasiliensis* numa proporção diluição de 100 e de 500 vezes (Pb1:100; Pb1:500) para quantificar a imunocompetência celular. Estes ensaios *in vitro* de proliferação celular antígeno-específica detectam principalmente respostas celulares dos linfócitos T. A quantificação da proliferação foi realizada através da análise da incorporação de timidina exógena marcada com trítio na síntese do DNA das células em cultivo por meio da utilização equipamento contador de cintilação β que faz a contagem de pulsos por minuto (cpm).

Na **figura 11** observa-se o índice de proliferação dos 2 grupos experimentais (Pb01 e Pb18) com uma diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre os dois isolados para 15 dias após infecção. Desta forma, os animais inoculados com o Pb01 possuem uma maior capacidade de linfoproliferar do que os com isolado Pb18 no período de até 15 dias após infecção. Porém, no decurso do tempo de infecção a capacidade linfoproliferativa dos animais infectados com Pb01 se iguala a dos animais inoculados com Pb18.

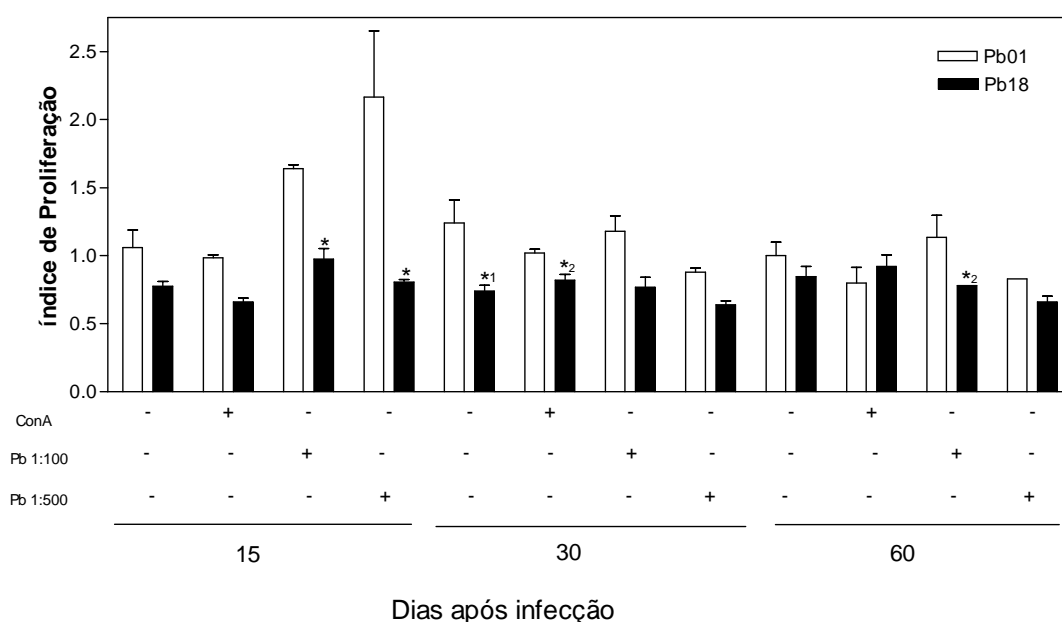


Figura 11: Resultados dos índices de proliferação dos esplenócitos obtidos dos animais infectados com isolados Pb01 e Pb18. As culturas de linfócitos cultivadas com diferentes estímulos: RPMI; Con-A; Pb1:100 e Pb1:500. Experimentos realizados em triplicata, * representa a diferença estatística significativa entre os grupos Pb01 e Pb18 com $p < 0,001$; *¹ com $p < 0,01$ e *² com $p < 0,05$.

3.1.4 - Quantificação das imunoglobulinas

Os anticorpos constituem um importante mecanismo de defesa do hospedeiro nas infecções por microorganismos. Biagioni e colaboradores (1984) realizaram um estudo e verificaram a presença do isotipo IgG anti- *P.brasiliensis* em 98% dos casos de humanos com PCM. Assim, decidiu-se dosar os isotipos IgG1 que é um anticorpo do padrão da resposta Th2 e IgG2a a qual é do padrão Th1 para investigar se a resposta imune dos animais infectados com os isolados Pb01 e Pb18 é polarizada para certo padrão células T auxiliares (Th) de forma igual ou diferente entre os grupos experimentais. Deste modo, analisou-se a presença de IgG1 e IgG2a (**tabela 2**).

Durante todo o período analisado, o isolado Pb01 induziu uma produção menor de anticorpos do isotipo IgG1 do que o isolado Pb18. Em relação ao isotipo IgG2a o grupo Pb01 apresentou uma maior concentração desta imunoglobulina nos tempos 15 e 30 dias após infecção quando comparado com Pb18. Com 60 dias de infecção, houve uma inversão nos níveis da imunoglobulina analisada.

Tabela 2: Dosagem dos isotipos IgG1 e IgG2a da imunoglobulina IgG no soro animais infectados.

Dias após infecção	IgG1		IgG2a	
	Isolado Pb01	Isolado Pb18	Isolado Pb01	Isolado Pb18
15	0,003	0,045	0,022	0,007
30	0,23	0,049	0,086	0,024
60	0,024	0,44	0,061	0,082

Resultados expressos estão na diluição 10x dos soros dos animais infectados, DO = 492nm.

3.2-Via de infecção intratraqueal

Com intuito de verificar a patogenicidade do isolado Pb01, resolveu-se fazer uma infecção localizada no pulmão, por meio da inoculação das leveduras na traquéia dos animais, os quais foram subdivididos em 3 grupos: • infectados com 10^5 leveduras isolado Pb18 e • do Pb01 usou-se animais da linhagem C57Bl/6, • infectados com 10^6 leveduras do Pb01 usou-se animais da linhagem Balb/c. Analisou-se a evolução da doença nos camundongos por meio do sacrifício destes animais após 15, 30 e 60 dias de infecção para análise histopatológica do tecido pulmonar, como também, para quantificar a carga fúngica neste tecido. Avaliou-se a resposta imunológica através da dosagem de anticorpos no soro dos animais e de óxido nítrico no tecido pulmonar.

3.2.1-Recuperação das Unidades Formadoras de Colônia do tecido pulmonar

No grupo infectado com 10^5 leveduras do isolado Pb01 não se obteve recuperação de CFU, desta forma, comparou-se o CFU/g pulmão dos animais balb/c inoculados com 10^6 leveduras do isolado Pb01 em relação aos animais C57Black/6 inoculados com 10^5 leveduras do isolado Pb18 (**figura 12**). Pode-se observar que a recuperação de fungos viáveis do tecido pulmonar dos animais infectados com isolado Pb18 é superior ao dos inoculados com Pb01, o qual não apresentou CFU/g pulmão após 15 dias de infecção. Enquanto o grupo Pb18 possui uma média de 36, 48 e 64 CFU por animal sacrificado respectivamente após 15, 30 e 60 dias infecção (**figura 12B**), o grupo Pb01 apresenta uma média de 9,6 e de 4,6 CFU para 30 e 60 dias após infecção (**figura 12A**).

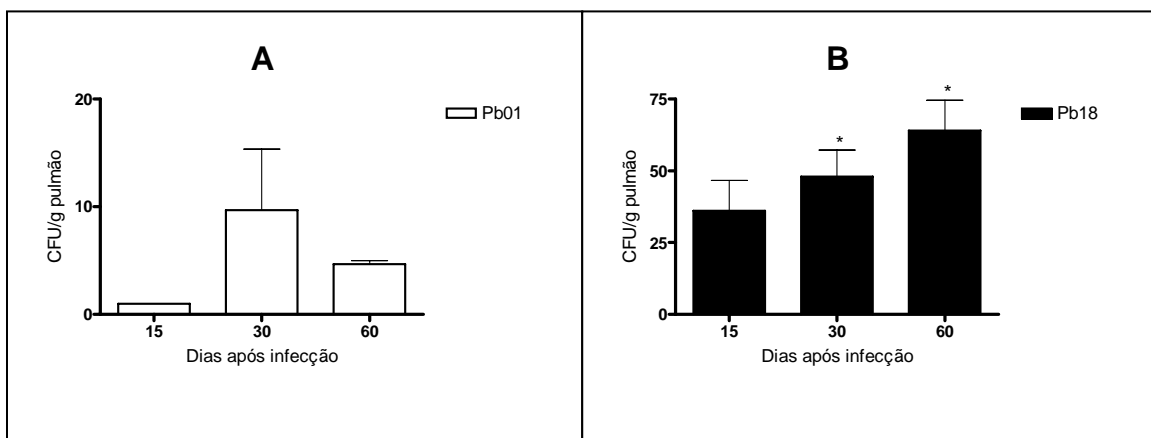


Figura 12: Cinética de recuperação das CFU/g pulmão durante o curso da infecção intratraqueal com os isolados Pb01 e Pb18. As barras representam a média \pm desvio padrão das unidades formadoras de colônias recuperadas dos 3 animais sacrificados por cada ponto experimental. (A) representa grupo infectado com 10^6 leveduras do isolado Pb01 e (B) representa grupo infectado com 10^5 leveduras do isolado Pb18. * diferença estatística dos pontos analisados em relação ao período de 15 dias após sacrifício, com $p < 0,01$.

3.2.2-Análise histopatológica do tecido pulmonar

A paracoccidiodomicose provocada pelo isolado Pb18 tende a evoluir com decurso do tempo de infecção. Realizou-se o estudo histopatológico do pulmão nesta forma de infecção, e o grupo Pb18 apresentou a mesma situação descrita no item 3.1.1 e na **figura 8**. Porém, o grupo Pb01 apresentou um infiltrado inflamatório pulmonar mais denso e intenso ao longo do tempo infecção situado na região peribronquiovascular (**figura 13**), mas, sem a formação de granulomas e também, sem a presença de leveduras como demonstrado na coloração Grocott das lâminas (**figura 13 A₁, B₁ e C₁**).

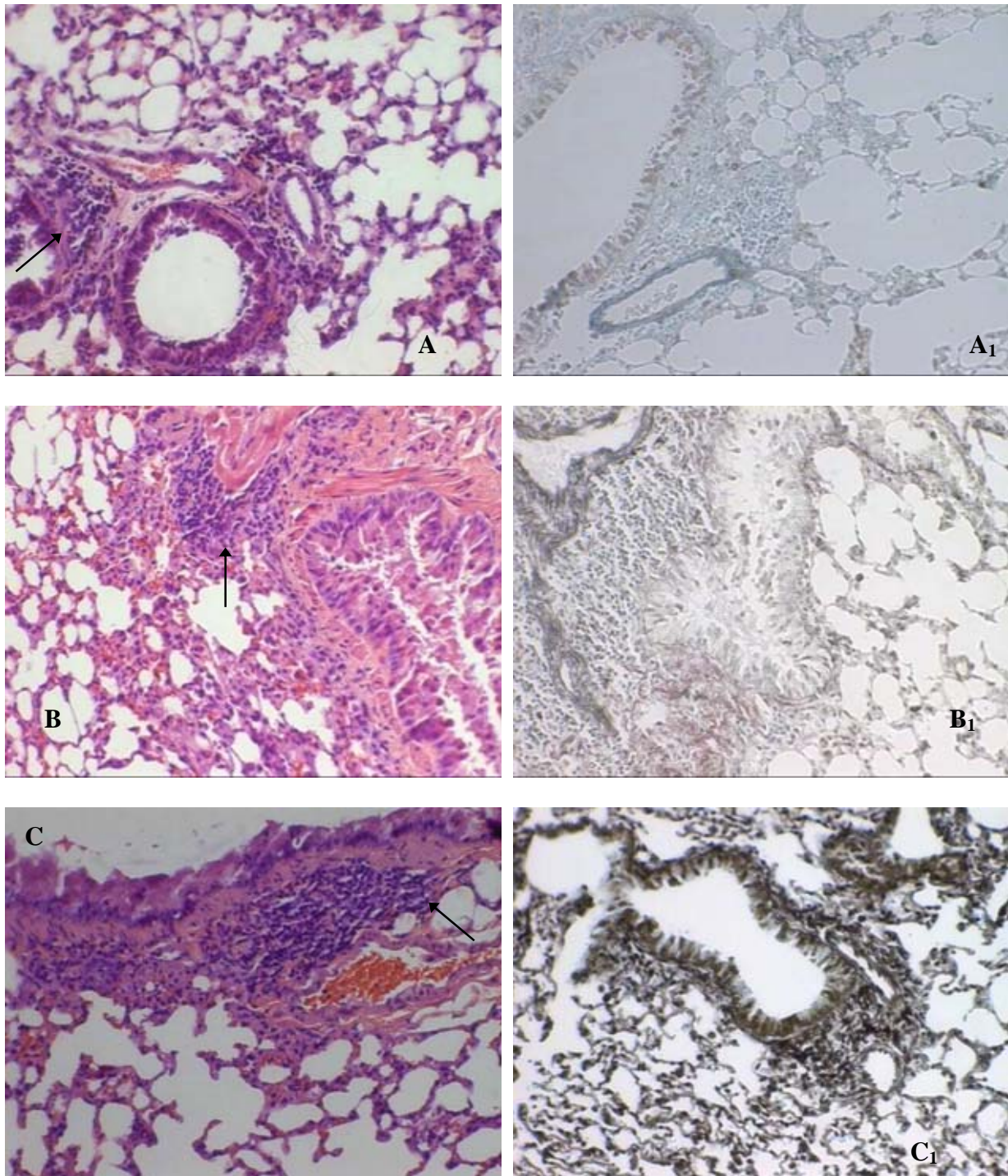


Figura 13: Fotomicrografia dos infiltrados inflamatórios induzido no pulmão dos animais infectados via intratraqueal com 10^6 leveduras do isolado Pb01. À esquerda as imagens (A, B e C) estão coradas com HE e na direita as imagens (A₁, B₁ e C₁) a coloração é a Grocott. As imagens possuem uma magnitude de 200x. As fotomicrografias denominadas A e A₁; B e B₁; C e C₁ representam respectivamente, animais infectados e sacrificados com 15, 30 e 60 dias após infecção. As setas indicam o infiltrado linfocitário na região periobronquiovascular.

3.2.3-Dosagem de NO e dos anticorpos IgG1 e IgG2a

Em relação ao óxido nítrico (NO) observa-se na **figura 14** que a produção deste composto para os grupos experimentais da infecção intratraqueal aumenta no decurso do tempo infecção. O grupo de animais Balb/c infectados com 10^6 leveduras do isolado Pb01 apresentou uma produção média de $122\mu\text{M NO}_2$ em 15 dias e de $128\mu\text{M NO}_2$ para 30 dias infecção. Estando estes valores acima da média do grupo de animais C57Bl/6 infectados com 10^5 leveduras do isolado Pb18 para estes mesmos pontos, pois com 60 dias após infecção a média deste grupo é de $137\mu\text{M NO}_2$ ficando um pouco acima do grupo Pb01 10^6 leveduras a qual foi de $133\mu\text{M NO}_2$. Isto pode ter ocorrido devido a menor carga fúngica pulmonar no grupo Pb01 10^6 em relação ao Pb18 10^5 , como também, a diferença da linhagem dos animais experimentais usados nestes dois grupos.

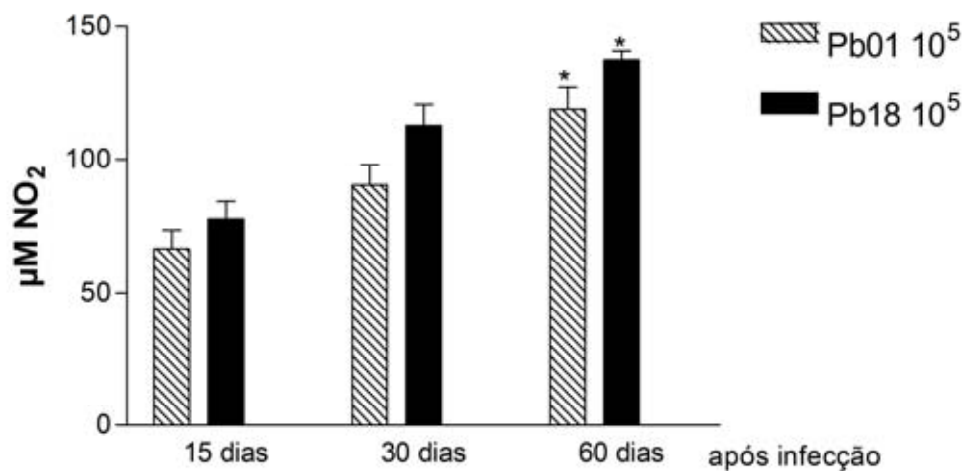


Figura 14: NO liberado nos pulmões dos animais C57Bl/6 infectados intratraquealmente. Barras hachuradas representam animais infectados com 10^5 leveduras do isolado Pb01; Barras pretas são os inoculados 10^5 leveduras do isolado Pb18. Experimentos realizados em triplicata, * representa a diferença estatística em relação ao tempo 15 dias, com $p < 0,05$.

Analisou-se a presença das imunoglobulinas IgG1 e IgG2a nas amostras do soro dos animais infectados intratraquealmente (**tabela 3**). Para os animais infectados com 10^5 leveduras do isolado Pb01 observa-se que as concentrações de IgG1 são maiores até 30

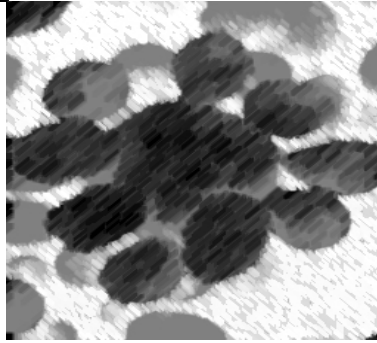
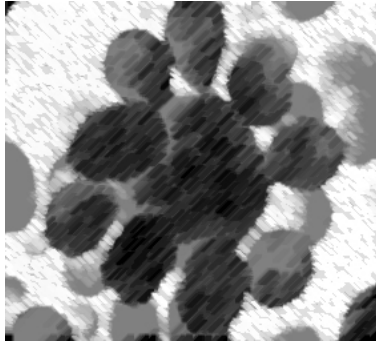
dias após infecção e depois decaem. Enquanto, as concentrações de IgG2a aumentam progressivamente no período analisado. Para os animais infectados com 10^5 leveduras do isolado Pb18, observamos uma produção similar, porém com níveis mais elevados de IgG1.

Os animais Balb/c infectados com 10^6 leveduras do isolado Pb01 pela via intratraqueal apresentaram um padrão de produção de isótipos misto, ou seja, elevadas concentrações tanto de IgG1 como de IgG2a. O mesmo padrão de produção de isótipos foi observado para animais infectados com 10^6 leveduras do isolado Pb18 pela via endovenosa (**dados não apresentados**).

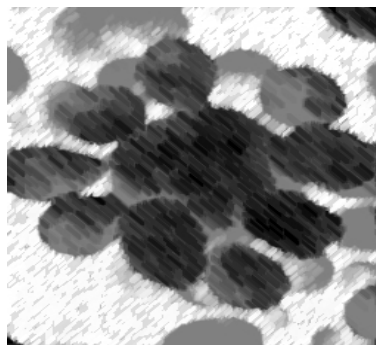
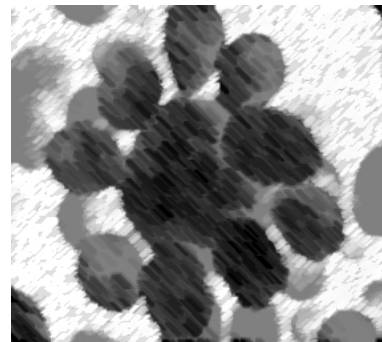
Tabela 3: Dosagem dos isótipos IgG1 e IgG2a no soro animais C57Bl/6 infectados pela via intratraqueal com 10^5 leveduras

Dias após infecção	IgG1		IgG2a	
	Pb01 10^5	Pb18 10^5	Pb01 10^5	Pb18 10^5
15	0,021	0,04	0,005	0,021
30	0,042	0,079	0,013	0,025
60	0,020	0,038	0,019	0,028

Resultados expressos estão na diluição 10x dos soros dos animais infectados, DO = 492nm.



Discussão



Discussão

O conceito de espécies filogenéticas, o qual detecta divergência genética entre grupos através do sequenciamento de *multi-locus* representada pela concordância na genealogia de genes, é o método mais apropriado para reconhecimento de espécies de fungos (Theodoro *et al.*, 2008). Matute (2006) demonstrou a existência de pelo menos 3 espécies filogenéticas no gênero *Paracoccidioides* (S1, PS2, PS3) já que era classificado taxonomicamente como espécie clonal (Morais *et al.*, 2000). Seus resultados seguiram para tentar detectar especiação críptica por meio da concordância ou não na genealogia de genes em relação à filogenia de seqüências genes nucleares, como foi realizado para o fungo *Neurospora*.

O fungo *P. brasiliensis* apresenta isolados com diferentes características fenotípicas relacionadas ao crescimento; morfologia de micélios; produção de conídios; transição de micélio para levedura; microscopia da levedura em relação ao tamanho e a forma desta célula com os de seus brotamentos; virulência e manifestações clínicas (Theodoro *et al.*, 2008). Variações na virulência e na expressão genética do *P. brasiliensis* vêm sendo demonstradas entre seus isolados que se situam nos grupos filogenéticos S1 e PS2 (Hebeler-Barbosa *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2005). O isolado Pb18 está incluso dentro do grupo S1, porém o isolado Pb01 está separado dos isolados que se agrupam nos 3 grupos filogenéticos S1, PS2, PS3, como exemplo de integrantes destes grupos podemos citar isolados Pb339, Pb2 e DASYPUS respectivamente (Carrero *et al.*, 2008). Revelando uma diferença significativa entre o isolado Pb01 e os isolados dos 3 diferentes grupos genéticos, este fato corrobora com estudo (Teixeira, 2008) o qual sugere que Pb01 representa uma nova espécie no gênero *Paracoccidioides*. Além disso, Carrero *et al.*, 2008 e Teixeira, 2008 classificaram este isolado junto com outros isolados como uma nova espécie filogenética – Pb01-like – para o fungo *P. brasiliensis*.

Estas recentes descobertas de espécies crípticas do fungo *P. brasiliensis*, como também, de uma nova espécie para gênero *Paracoccidioides* aumenta a importância de correlacionarem os isolados conhecidos por meio de marcadores moleculares para fins de diagnóstico. Esta separação genética entre os grupos pode resultar no acúmulo de algumas diferenças nas estratégias para sobrevivência no hospedeiro, como também, no meio saprobiótico (Theodoro *et al.*, 2008). Além disso, características micológicas como morfologia e virulência são necessárias para compreender se as diferenças

genéticas e patogênicas observadas entre os isolados do gênero *Paracoccidioides* podem resultar em diferenças nas formas clínicas da PCM apresentadas pelo hospedeiro.

Neste trabalho, utilizaram-se as características morfológicas dos isolados Pb01 e Pb18 para auxiliar na compreensão da resposta imune induzida por estes isolados em modelo murino. Fato este inovador, já que a literatura científica aborda a virulência como principal característica fenotípica correlacionada com os aspectos imunológicos (Franco *et al.*, 1993; Singer-Vermes *et al.*, 1994; Mollinari-Madlum *et al.*, 1999; Camargo *et al.*, 2000). Observou-se que as células do isolado Pb01 possuem uma menor média nos valores do diâmetro das leveduras tanto na célula mãe, como dos seus brotamentos e com predomínio da forma circular, ao se comparar com os dados do isolado Pb18 que tiveram uma maior média nos valores do diâmetro e a forma variando de circular a elíptica. Em relação à espessura da parede celular as leveduras do Pb01 apresentaram-se mais espessas que as do Pb18.

Estes resultados podem explicar alguns pontos na capacidade dos macrófagos MH-S de fagocitarem de forma mais rápida e em maior quantidade as leveduras do Pb01 em relação ao Pb18 nos experimentos *in vitro*. Além disso, nos ensaios *in vivo* nota-se que a relação do tamanho do inóculo utilizado na infecção dos animais experimentais teve uma influência direta com aumento do processo inflamatório no pulmão, visto que o isolado Pb18 gerou a formação de granulomas no tecido pulmonar ao longo dos dias estudados. Sanchez e colaboradores (2008) estudaram as diferenças fenotípicas ligadas a morfologia e virulência em 2 espécies do gênero *Cryptococcus* (*C. neoformans* e *C. gattii*) e a influência destas características fenotípicas na patogenicidade dos fungos. Observaram através de microscopia diferenças morfológicas no tamanho das cápsulas entre as espécies, sendo que *C. gattii* possui uma cápsula maior o que influencia na forte patogenicidade quando comparado com *C. neoformans* (Torres-Rodríguez *et al.*, 2003). Este fato corrobora com nossos resultados em relação ao fungo *P. brasiliensis*, no qual isolado com maior tamanho possui uma maior patogenicidade.

Pesquisas desenvolvidas com o fungo do gênero *Cryptococcus*, também abordam a virulência de diferentes isolados deste fungo como principal característica fenotípica correlacionada com os aspectos imunológicos desenvolvidos pelos hospedeiros para combater a infecção. Blackstock e colaboradores (1999) observaram uma regulação da resposta imune de forma diferencial entre um isolado virulento e outro com baixa virulência do fungo *C. neoformans*.

Adesão do microorganismo patogênico no tecido hospedeiro é considerado ponto crucial no processo de colonização e disseminação do parasita no organismo. Este processo de invasão induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos leucócitos do hospedeiro com intuito de inibi-lo. Assim, a produção de ROS gerada pela resposta imune na infecção pelo *P. brasiliensis*, ocasiona um estresse oxidativo na célula fúngica que induz a perda da homeostasia celular (Campos *et al.*, 2005). Portanto, a sobrevivência de fungos patogênicos no hospedeiro depende da capacidade da célula fúngica de evadir da resposta imune do hospedeiro.

Os macrófagos são considerados peças centrais na imunidade anti-*P. brasiliensis*, pois eles podem conter a infecção fúngica. Porém, também podem ser utilizados pelos fungos como ambiente propício para sua multiplicação e disseminação no organismo do hospedeiro (Benarde, 2008). Observamos este fato nos experimentos *in vitro* com macrófagos infectados com isolado Pb18 onde possivelmente os macrófagos facilitaram a multiplicação deste isolado no meio intracelular e nos ensaios *in vivo* eles podem ter auxiliado na disseminação do Pb18 pelo tecido pulmonar dos animais experimentais. Mas, na relação dos macrófagos com isolado Pb01 nos ensaios *in vitro* ocorreu uma redução na multiplicação das leveduras no meio intracelular e nos experimentos *in vivo* a infecção dos animais ocasionada pelo isolado Pb01 foi contida.

Estes resultados estão em acordo com os dados de Soares e colaboradores (2001) que ao utilizarem macrófagos provenientes de pessoas saudáveis quando foram infectados com isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18) tiveram uma limitada atividade *in vitro* contra o fungo, porém, nos infectados com isolado menos virulento (Pb265) não se observou esta limitação na atividade do macrófago. Tavares e colaboradores (2007) estudaram o perfil transcricional do *P. brasiliensis* em resposta à fagocitose por macrófagos murinos, observaram que após 6 horas de interação, o fungo induziu nos macrófagos a transcrição de genes relacionados à atividade pró-inflamatória e de fagocitose, e este apresentou a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e nutricional.

A análise do transcriptoma do *Paracoccidioides brasiliensis* revelou que este patógeno possui diferentes vias de combate as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNI) que o hospedeiro produz, como por exemplo: catalases; superóxido dismutase; glutathiona peroxidase e citocromo c peroxidase (Felipe *et al.*, 2005). Além disso, na interação *P. brasiliensis*-hospedeiro, o fungo está em vantagem, pois os genes que codificam a produção de ROS pelas células imunes do hospedeiro promovem a

ativação das enzimas da via combate aos ROS no fungo. Mas, a capacidade microbicida dos macrófagos está relacionada com a produção de RNI, dentre estas espécies, o NO é o mais potente agente citotóxico (MacMicking *et al.*, 1997) e participa da morte de *P. brasiliensis* (Gonzalez *et al.*, 2000).

Óxido nítrico é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase a partir do aminoácido L-arginina. Souto e colaboradores (2000) demonstraram que há uma relação direta entre a produção de NO pelos macrófagos e a presença das citocinas TNF- α e IFN- γ , se a concentração destas decair ocorre uma diminuição na geração de NO. Sendo que o TNF- α está associado com atividade fungicida dos macrófagos em relação ao *P. brasiliensis* (Calvi *et al.*, 2003). O óxido nítrico possui um papel protetor, pois atua como molécula efetora da citotoxicidade dos macrófagos e também, pode atuar como regulador da resposta inflamatória (Gonzalez *et al.*, 2000). Este papel do NO foi evidenciado nos ensaios *in vitro* dos macrófagos infectados com isolado Pb01, onde a concentração de NO teve um aumento exponencial ao longo das horas de co-cultivo ocasionando uma diminuição da viabilidade das leveduras recuperadas após interação com os macrófagos.

Bocca e colaboradores (1998 e 1999) relataram que NO possui um papel secundário que pode ocasionar a imunossupressão. Este fato corrobora com os dados de Nascimento e colaboradores (2002) que relacionam a produção persistente de NO com a susceptibilidade à infecção por *P. brasiliensis*. Na infecção sistêmica dos animais inoculados com isolado Pb18, observou-se uma menor capacidade linfoproliferativa em todos os tempos analisados em relação ao isolado Pb01. Entretanto, na infecção intratraqueal houve uma produção e liberação contínua de NO que foi aumentando gradativamente ao longo dos dias de infecção, podendo este fato explicar a imunossupressão observada na outra forma de infecção.

O curso da infecção ocasionada pelo *P. brasiliensis* depende da virulência deste fungo, como também, da resistência natural do hospedeiro à infecção. Teixeira e colaboradores (1987) infectaram animais considerados resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis* (A/SN) e susceptíveis (B10.A) com isolado virulento (Pb18) e não virulento (IVIC Pb267) e observaram um rápido estado de imunossupressão nos animais susceptíveis infectados com Pb18 e nos inoculados com IVIC Pb267 não houve esta rápida imunossupressão, que somente começou a surgir após 12 semanas de infecção. Observou-se estes mesmos acontecimentos nos experimentos de capacidade linfoproliferativa dos animais com infecção sistêmica, sendo que camundongos

inoculados com Pb01 apresentaram até 4 semanas após infecção uma maior capacidade linfoproliferativa, mais posteriormente esta capacidade decaiu tornando-se similar com a do Pb18.

Benarde (2008) observou que o déficit na resposta linfoproliferativa aos mitógenos, como também, aos antígenos de *P. brasiliensis* pode ser ocasionado pela deficiência na imunidade celular dos pacientes com PCM, pois a falta de um adequado sinal co-estimulatório pode ocasionar anergia das células T nestes indivíduos.

Zacharias e colaboradores (1986) realizaram um estudo comparativo da histopatologia e da imunologia em animais infectados endovenosamente com 3 tipos de isolados de *P. brasiliensis* (Pb18, Pb192 e Pb265, que apresentam diferenças em relação à virulência). Seus resultados demonstraram que o isolado Pb265 não induziu a formação de granuloma no pulmão e nem a produção de anticorpos, além disso, a imunidade celular foi significativamente baixa quando comparada com os outros dois isolados. Os granulomas induzidos pelo Pb18 e também, pelo Pb192 apresentaram-se ricos em fungos, mas com diferenças entre si nas quantidades de células mononucleares. Porém estes isolados tiveram similaridades nas respostas imunes humoral e celular contra *P. brasiliensis*. Devido a estes fatos, os autores consideraram isolado Pb265 não virulento e os outros dois isolados virulentos (Zacharias *et al.*, 1986).

Na análise histopatológica do pulmão tanto na infecção sistêmica como na infecção intratraqueal nos animais inoculados com o isolado Pb18, houve uma resposta inflamatória progressiva na formação de granulomas no tecido pulmonar com decurso do tempo infecção. Porém, os animais inoculados com Pb01 nas duas formas de infecção não houve a formação de granulomas, somente a presença de infiltrados inflamatórios localizados próximos da região peribronquiovascular, os quais foram tornando-se mais densos e intensos ao longo tempo infecção. Estes dados corroboram com os resultados obtidos na recuperação das CFU/g pulmão nos dois tipos de infecção para ambos isolados, sendo que o grupo Pb18 houve um aumento progressivo no decurso da infecção sistêmica e da intratraqueal nas quantidades de colônias recuperadas. Mas, para isolado Pb01 ocorreu uma diminuição na quantidade CFU/g pulmão recuperada no decorrer da infecção sistêmica. Na infecção intratraqueal do grupo Pb01 foi necessário aumentar concentração do inóculo de infecção 10 vezes em relação ao do grupo Pb18 para conseguir recuperar as CFU/g pulmão. Após 15 dias de infecção não se conseguiu recuperar as colônias, 30 dias foi o ponto com a maior

quantidade de CFU recuperada para este grupo e aos 60 dias houve um decréscimo na quantidade de CFU recuperada do tecido pulmonar.

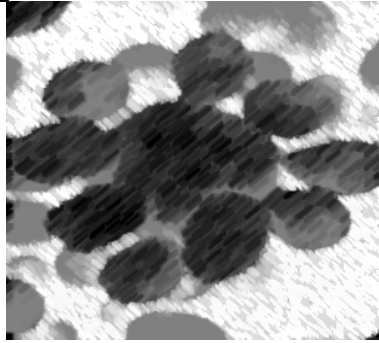
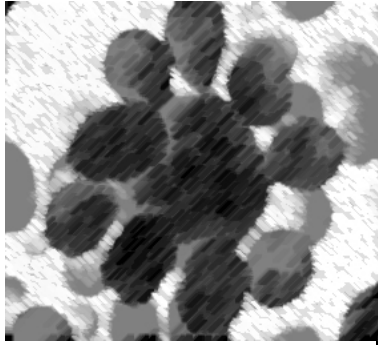
Uenotsuchi e colaboradores (2006) observaram que as diferenças na virulência das linhagens do fungo *Sporothrix schenckii* e no estado imune do hospedeiro podem contribuir com as diferentes formas de manifestações clínicas desta micose. Investigaram a interação entre monócitos derivados das células dendríticas com 2 duas linhagens (uma de origem visceral e outra cutânea) deste fungo. Observaram que a linhagem cutânea induziu uma forte resposta Th1 com uma alta ativação dos monócitos, enquanto a visceral induziu uma mínima ativação dos monócitos, como também, uma fraca resposta Th1 (Uenotsuchi *et al.*, 2006).

As células Th1 secretam citocinas que ativam os macrófagos. Além disso, a produção de citocinas por estas células possui um papel na regulação da expressão do tipo de imunoglobulina. A secreção de IFN γ por estas células participa na indução da expressão do tipo IgG2a em murinos (Kun *et al.*, 2001). Observou-se na infecção sistêmica dos animais inoculados com isolado Pb01 uma resposta imunológica com uma tendência a resposta de padrão Th1, e na infecção intratraqueal houve uma resposta imunológica de padrão misto (Th1 e Th2). Mas, nos dois tipos de infecção os animais inoculados com Pb18 houve uma tendência em relação à resposta Th2.

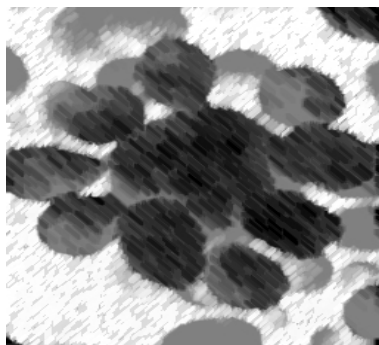
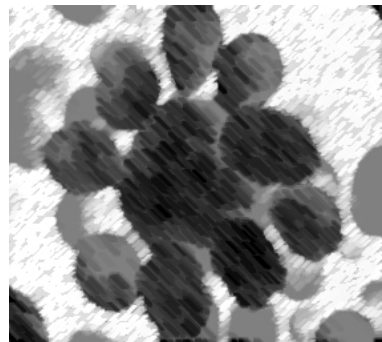
As diferenças morfológicas e patogênicas observadas entre isolado Pb01 e Pb18 podem ser possivelmente devido às diferenças na expressão gênica de cada isolado estudado. Já que o isolado Pb01 apresenta 32,94Mb de comprimento da sequência completa do genoma e o número de genes deste genoma que predizem códigos para a síntese de proteínas é entorno de 9,132. O isolado Pb18 apresenta um menor comprimento da sequência completa do genoma (29,95Mb), como também, uma menor quantidade de genes (8,741) que predizem códigos para a síntese de proteínas (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/GenomeStats.html).

Diferentes apresentações clínicas da PCM podem ser ocasionadas pela virulência dos isolados de *P. brasiliensis* no qual hospedeiro foi infectado. Estudos sobre a biologia do fungo estão começando a direcionar quais mecanismos e moléculas existentes entre os diferentes isolados de *P. brasiliensis* podem estar associadas com a virulência e a patogenicidade de cada tipo de isolado, como também, podem ajudar a elucidar os mecanismos de susceptibilidade e de resistência apresentados pelos modelos animais em determinados tipos infecção induzida por diferentes isolados.

O desenvolvimento de novas drogas antifúngicas está buscando utilizar as pesquisas moleculares sobre a composição da parede celular dos diferentes isolados fúngicos, com intuito de construir drogas antifúngicas altamente específicas. Desta forma, a utilização do método do diagnóstico molecular para investigar o tipo de isolado fúngico que o paciente com PCM foi infectado, facilitará a prescrição do melhor e mais específico medicamento antifúngico. Assim, o conhecimento sobre a morfologia, patogenia e genética de cada isolado do gênero *Paracoccidioides* possivelmente poderá auxiliar no diagnóstico, como também, no tratamento dos pacientes com PCM. Portanto, uma das possíveis perspectivas que este trabalho pode deixar, é a realização de um estudo sobre a composição da parede celular do isolado Pb01 para verificar a presença e quantidade de α -1,3-glucana e de α -manana comparando com dados relativos de outros isolado, pois estes componentes se relacionam com o grau de virulência e o poder patogênico de um isolado. Além disso, utilizar uma linhagem mais susceptível a PCM, ou seja, a linhagem B10.A como modelo experimental de PCM induzida pelo isolado Pb01 comparando-se com a PCM induzida por um outro isolado do grupo filogenético Pb01-like.

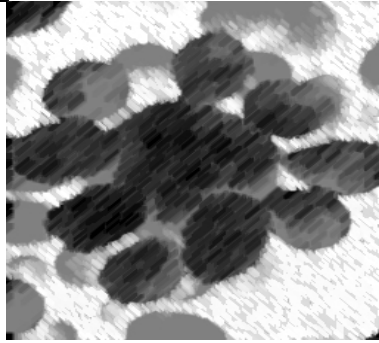
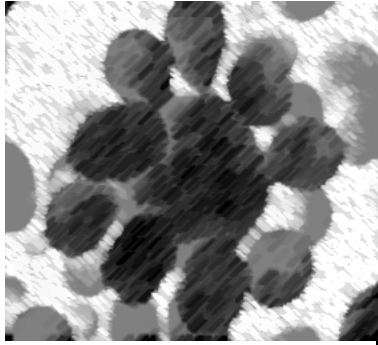


Conclusão

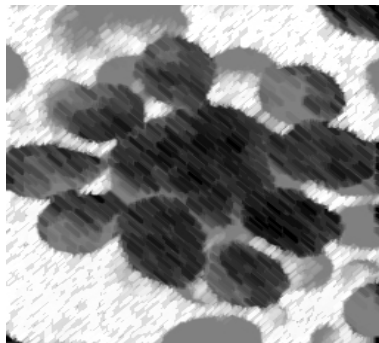
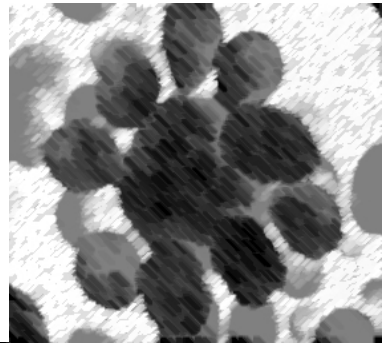


Conclusão

O isolado Pb01 apresenta um menor tamanho e uma parede celular mais espessa em relação ao isolado Pb18. Estes fatores influenciaram na interação do isolado Pb01 com os macrófagos (MH-S), que fagocitaram de forma mais rápida e em maior quantidade as leveduras Pb01, como também, induziu uma maior produção de NO pelos macrófagos quando comparado com isolado Pb18. O isolado Pb01 induziu nos animais experimentais utilizados neste trabalho uma resposta imunológica mais efetiva, possivelmente devido a sua característica de ser mais imunogênico do que Pb18. Desta maneira, o isolado Pb01 possui uma menor patogenicidade em relação ao isolado Pb18. Estes dados sobre o isolado Pb01 corroboram com as pesquisas sobre a nova espécie críptica a Pb01-like para espécie *Paracoccidioides brasiliensis*.



Referências bibliográficas



Referências bibliográficas

- Albornoz M.C.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural to soil in Venezuela. *Sabouraudia* 1971, 9: 248-253.
- Almeida F. Estudos comparativos do granuloma coccidio nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. *An. Fac. Med. São Paulo* 1930, 5: 125-141.
- Bastos K.P., Bailão A.M., Borges C.L., Faria F.P., Felipe M.S.S., Silva M.G., Martins W.S., Fiúza R.B., Pereira M., Soares C.M. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol.* 2007, 7: 29.
- Batista W.L., Matsuo A.L., Ganiko L., Barros T.L., Veiga T.R., Freymüller E., Puccia R. The *PbMDJI* Gene belongs to a conserved *MDJI/ LON* Locus in Thermodimorphic pathogenic fungi and encodes a Heat Shock Protein that localizes to both the mitochondria and cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryotic Cell* 2006, 5: 379-390.
- Benarde G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 2008, 165: 209-221.
- Biagioni L.M.J., Souza M.J., Chamma L.G., Mendes R.P., Marques S.A., Mota N.G.S., Franco M. Serology of paracoccidioidomycosis and Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1984, 78: 617-621.
- Bialek R., Ibricevic A., Fothergill A., Begerow D. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38: 3190-3193.
- Blackstock R., Buchanan K.L., Adesina A.M., Murphy J.W. Differential regulation of immune responses by highly and weakly virulent *Cryptococcus neoformans* isolates. *Infect. Immun.* 1999, 67: 3601- 3609.

Blotta M.H., Camargo Z.P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. J. Clin. Microbiol. 1993, 31: 671-676.

Blotta M.H.S.L., Mamoni R.L., Oliveira S.J. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999, 61: 390-394.

Bocca A.L., Hayashi E.E., Pinheiro A.G., Furlanetto A.B., Campanelli A.P., Cunha F.Q., Figueiredo F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis* infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. J. Immunol. 1998, 161: 3056-3063.

Bocca A.L., Silva M.F., Silva C.L., Cunha F.Q., Figueiredo F. Macrophage Expression of Class II Major Histocompatibility Complex Gene Products in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected Mice. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999, 61: 280-287.

Bretscher P.A. An hypothesis to explain why cell-mediated immunity alone can contain infections by certain intracellular parasites and how immune class regulation of the response against such parasites can be subverted. Immunol. Cell Biol. 1992, 70: 343-351.

Broad Institute. Genome Statistics: *Paracoccidioides brasiliensis*. Disponível em: <http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/GenomeStats.html>. Acesso em: 25 novembro 2008.

Brummer E., Castaneda E., Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin. Microbiol. Rev. 1993, 6: 89-117.

Brummer E., Sun S.H., Harrison J.L., Perlman A.L., Philpott D.E., Stevens D.A. Ultrastructure of Phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in Nonactivated or Activated Macrophages. Infection and Immunity 1990, 58: 2628-2636.

- Calich V.L., Kipnis T.L., Mariano M., Neto C.F., Dias da Silva W.D. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* *in vitro*: its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection. Clin. Immunol. Immunopathol. 1979, 12: 21-30.
- Calvi S.A., Soares A.M., Peraçoli M.T., Mendes R.P. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. Microbes Infect. 2003, 5: 107-113.
- Camargo Z.P., Franco M.F. Current Knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Rev. Iberoam. Micol. 2000, 17: 41-48.
- Campos E.G., Jesuino R.S.A., Dantas A.S., Brígido M.M., Felipe M.S.S. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. Genet. Mol. Res. 2005, 4: 409-429.
- Cano L.E., Singer-Vermes L.M., Vaz C.A.C., Russo M., Calich V.L.G. Pulmonary Paracoccidioidomycosis in Resistant and Susceptible Mice: Relationship among Progression of Infection, Bronchoalveolar Cell Activation, Cellular Immune Response, and Specific Isotype Patterns. Infect. Immun. 1995, 63: 1777-1783.
- Carrero L.L., Niño-Vega G., Teixeira M.M., Carvalho M.J.A., Soares C.M.A., Pereira M., Jesuino R.S.A., McEween J.G., Mendoza L., Taylor J.W., Felipe M.S.S., San-Blas G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. Fungal Genet. Biol. 2008, 45: 605-612.
- Carvalho K.C., Ganiko L., Batista W.L., Morais F.V., Marques E.R., Goldman G.H., Franco M.F., Puccia R. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. Microb. Infect. 2005, 7: 55-65.
- Chequer-Bou-Habib D., Oliveira-Neto M.P., Ferreira da Cruz M.F., Galvão Castro B. The possible role of circulating immune complexes in the deficiency of cell mediated immunity in paracoccidioidomycosis. Braz. MJ. Med. Biol. Res. 1989, 22: 205-212.

- Chojniak R., Vieira R.A., Lopes A., Silva J.C., Godoy C.E. Intestinal paracoccidioidomycosis simulating colon cancer. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2000, 33: 309-312.
- Cock A.M., Cano E.L., Vélez D., Aristizábal B.H., Trujillo J., Restrepo A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. *Scielo* 2000, 42: 59-66.
- Coelho L.I.A.R.C., Paes M.G., Souza J.U., Oliveira R.S. Diagnóstico Parasitológico de Leishmanioses por Método de Coloração Alternativo. *News Lab* 2006, 75:184-188.
- Corredor G.G., Peralta L.A., Castaño J.H., Zuluaga J.S., Henao B., Arango M., Tabares A.M., Matute D.R., McEwen J.G., Restrepo A. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol.* 2005, 43: 275-280.
- Coutinho Z.F., Silva D., Lazéra M., Petri V., Oliveira R.M., Sabroza P.C., Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública* 2002, 18: 1441-1454.
- Del Negro G., Lacaz C.S., Fiorillo A.M. Paracoccidioidomicose: Blastomicose sul-americana. 2 ed. São Paulo: Sarvier-Edusp, 1982. 283 p.
- Dias M.F.R.G., Filgueira A.L., de Souza W. A Morphological and Cytochemical Study of the Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and Neutrophils. *Microscopy and Microanalysis* 2004, 10: 215-223
- Diniz S.N., Cisalpino P.S., Koury M.C., Andrade G.M., Nogueira M.G., Goes A.M. *In vitro* human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. *Microbes. Infect.* 1999, 1: 353-360.

- Farias M.R., Werner J., Muro M.D., Marques S.A., Marques M.E.A., Franco M.F. Canine Paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 2005, 47: 64.
- Fava-Netto C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na Blastomicose Sul-Americana com antígenos polissacarídicos. Arq. Cirurg. Clin. Exp. 1955, 18:197-254.
- Felipe M.S.S., Andrade R.V., Arraes F.B., Nicola A.M., Maranhão A.Q., Torres F.A., Silva-Pereira I., Pocas-Fonseca M.J., Campos E.G., Moraes L.M., Andrade P.A., Tavares A.H., Silva S.S., Kyaw C.M., Souza D.P., Pereira M., Jesuino R.S., Andrade E.V., Parente J.A., Oliveira G.S., Barbosa M.S., Martins N.F., Fachin A.L., Cardoso R.S., Passos G.A., Almeida N.F., Walter M.E., Soares C.M., Carvalho M.J., Brigido M.M. PbGenome Network Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. J. Biol. Chem. 2005, 280: 24706-24714.
- Ferreira M.S., Freitas L.H., Lacaz C.da.S., Del Negro G.M., de Melo N.T., Garcia N.M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. J. Med.Vet. Mycol. 1990, 28: 253-256.
- Franco M., Peraçoli M.T., Soares A., Montenegro M.R., Mendes R.P., Meira D.A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. Curr. Top. Med. Micol. 1993, 5: 115-149.
- Franco M., Lacaz C.L.S., Restrepo A.M., Del Negro G. In Paracoccidoimycosis. Boca Ratón, C.R.C. Press., 1994.
- Franco M., Sano A., Kera K., Nishimura K., Takeo K., Miyaji M. Clamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 1989, 31:151-157.

- Franco M.F., Montenegro M.R., Mendes R.P., Marques S.A., Dillon N.L., Mota N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of clinical forms. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1987, 20:129-132.
- Garcia N.M., Del Negro G.M., Heins-Vaccari E.M., de Melo N.T., de Assis C.M., Lacaz C.da.S. *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1993, 35: 227-235.
- Gezuele E. 1989. Aislamiento de *Paracoccidioides sp.* de heces de um pinguino de la Antártida. Proceedings IV International Symposium on Paracoccidioidomycosis, Caracas, Venezuela, April 10-14. Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas (IVIC) Abstract B-2.
- Gonzalez A., de Gregori W., Velez D., Restrepo A., Cano L.E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect. Immun.* 2000, 68: 2546-2552.
- Green L.C., Wagner D.A., Ruiz de Luzureaga K., Istfan N., Young V.R., Tannenbaum S.R. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981, 78: 7764-7768.
- Grose E., Tamsitt J.R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia* 1965, 4: 124-125.
- Guého E., Leclerc M.C., Hoog G.S., Dupont B. Molecular taxonomy and epidemiology of *Blastomyces* and *Histoplasma* species. *Mycoses* 1997, 40: 69-81.
- Hebeler-Barbosa F., Morais F.V., Montenegro M.F., Kuramae E.E., Taylor J.W., Montes B., McEwen J.G., Puccia R., Bagagli E. Sequence comparison of the internal transcribed spacer regions and gp43 in *Paracoccidioides brasiliensis* from patients and armadillos *Dasypus novemcinctus*. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41: 5735-5737.
- Hosken N.A., Shibuya K., Heath A.W., Murphy K.M., O'Garra A. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J. Exp. Med.* 1995, 182: 1579-1584.

- Kashino S.S., Fazioli R.A., Cafalli-Favati C., Meloni-Bruneri L.H., Vaz C.A., Burger E., Singer L.M., Calich V.L. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J. Interferon Cytokine Res.* 2000, 20: 89-97.
- Krieg A.M., Yi A., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995, 374:546-549.
- Kun Li, Jieh-Juen Yu, Chiung-Yu Hung, Lehmann P.F., Cole G.T. Recombinant Urease and Urease DNA of *Coccidioides immitis* Elicit an Immunoprotective Response against Coccidioidomycosis in Mice. *Infection and Immunity* 2001, 69: 2878-2887.
- Kunkel S.L., Lukacs N.W., Strieter R.M., Chensue S.W. Th1 and Th2 responses regulate experimental lung granuloma development. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* 1996, 13: 120-128.
- Lacaz C.S., Porto E., Martins J.E.C. Paracoccidioidomycose. *Micologia Médica* 1991, 248-292.
- Leao R.C., Mendes E. Paracoccidioidomycosis, neoplasia and associated infections. *Allergol. Immunopathol.* 1980, 8: 185-188.
- Leclerc M.C., Phillippe H., Guého E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J. Med. Vet. Mycol.* 1994, 32: 331-341.
- Linares L.I., Friedman L. Experimental Paracoccidioidomycosis in Mice. *Infection and Immunity* 1972, 5: 681-687.
- Londero A.T. Paracoccidioidomycose. Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. *J. Pneumol.* 1986, 12: 41-57.

- Londero A.T., Melo I.S. Paracoccidioidomycosis in childhood: A critical review. *Mycopathologia* 1983, 82: 49-55.
- MacMicking J., Xie Q.W., Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 1997, 15: 323-350.
- Manns B.J., Baylis B.W., Urbanski S.J., Gibb A.P., Rabin H.R. Paracoccidioidomycosis: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* 1996, 23: 1026-1032.
- Maria do Rosário R. Silva. Dados sobre Pb01. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <rosário@iptsp.ufg.br> em 1º setembro 2008.
- Martinez R., Moya M.J. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. *Rev. Saúde Pública* 1992, 26: 12-16.
- Matute D.R., McEween J.G., Montes B.A., San-Blas G., Bagagli E., Rauscher J.T. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* 2006, 23: 65-73.
- McEwen J.G., Garcia A.M., Ortiz B.L., Botero S., Restrepo A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res.* 1995, 26: 305-306.
- Mendes E., Raphael M. Impaired delayed hypersensitivity in patients with South American Blastomycosis. *J. Allergy.* 1971, 47: 17-22.
- Mendes-Gianini M.J.S., Moraes R.A., Ricci T.A. Proteolytic activity of 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1990, 32: 384-385.
- Molinari-Madlum E.E.W.I., Felipe M.S.S., Soares C.M.A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med. Mycol.* 1999, 37: 269-276.

- Montenegro M.R. Formas clínicas da Paracoccidioidomicose. Rev. Inst. Med. Trop. 1986, 281: 203-204.
- Morais F.V., Barros T.F., Fukada M.K., Cisalpino P.S., Puccia R. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Clin. Microbiol. 2000, 38: 3960-3966.
- Morais F.V., Barros T.F., Fukada M.K., Cisalpino P.S., Puccia R. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Clin. Microbiol. 2000, 38: 3960-3966.
- Moscardi-Bacchi M., Brummer E., Stevens D.A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. J. Med. Microbiol. 1994, 40: 159-164.
- Mota N.G., Rezkallah-Iwasso M.T., Peracoli M.T., Audi R.C., Mendes R.P., Marcondes J., Marques S.A., Dillon N.L., Franco M.F. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1985, 79: 765-772.
- Nascimento F.R.F., Calich V.L.G., Rodriguez D., Russo M. Dual Role for Nitric Oxide in Paracoccidioidomycosis: Essential for Resistance, but Overproduction Associated with Susceptibility. The Journal of Immunology 2002, 168: 4593-4600.
- Negróni P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. Prensa Méd. Argent. 1966, 53: 2381-2382.
- Nogueira M.E., Mendes R.P., Marques S.A., Franco M. Complement-mediated-lysis detection of antibodies in paracoccidioidomycosis: a preliminary study. Braz. J. Med. Biol. Res. 1986, 19: 241-247.
- Nunes L.R., Costa de Oliveira R., Leite D.B., da Silva V.S., dos Reis Marques E., da Silva Ferreira M.E., Ribeiro D.C., de Souza Bernardes L.A., Goldman M.H., Puccia R., Travassos L.R., Batista W.L., Nobrega M.P., Nobrega F.G., Yang D.Y., de Bragança

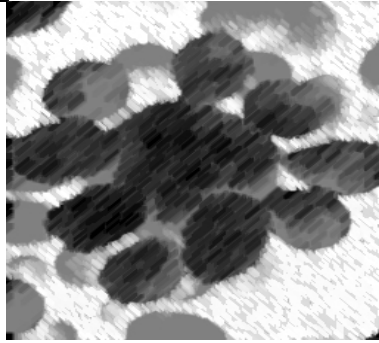
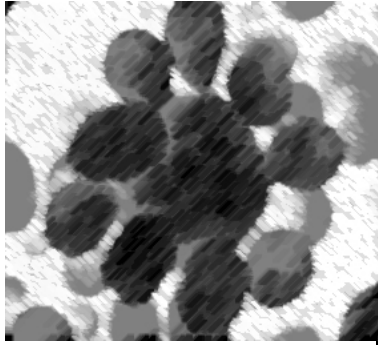
- Pereira C.A., Goldman G.H. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell* 2005, 4: 2115-2128.
- Omarsdottir S., Freysdottir J., Barsett H., Smestad Paulsen B., Olafsdottir E.S. Effects of lichen heteroglycans on proliferation and IL10 secretion by rat spleen cells and IL10 TNF- α secretion by rat peritoneal macrophages *in vitro*. *Phytomedicine* 2005 12: 461-467.
- Paniago A.M., Aguiar J.I., Aguiar E.S., Pereira G.R., Londero A.T. Paracoccidioidomycosis: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no estado do Mato Grosso do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003, 36: 455-459.
- Pfeiffer C., Murray J., Madri J., Bottomly K. Selective activation of Th1- and Th2-like cells *in vivo*--response to human collagen IV. *Immunol. Rev.* 1991, 123:65-84.
- Pina A., Saldiva P.H.N., Restrepo L.E.C., Calich V.L.G. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *Journal of Leukocyte Biology* 2006, 79: 1202-1213.
- Restrepo A., McEwen J.G., Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.* 2001, 39: 233-241.
- Restrepo A., Robledo M., Giraldo R., Hernandez H., Sierra F. The gamut of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Med.* 1976, 61: 33-41.
- Restrepo A., Salazar M.E., Cano L.E., Stover E.P., Feldman D., Stevens D.A. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 1985, 46: 346.
- Restrepo-Moreno A., Schneidau Jr.D. Nature of the skin-reactive principle in culture filtrates prepared from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Bacteriology* 1967, 93:1741-1748.

- Rivitti E.A., Aoki V. Deep Fungal Infections in Tropical Countries. Clin. Dermatol. 1999, 17:171-190.
- Salem-Izacc S.M., Jesuino R.S., Brito W.A., Pereira M., Felipe M.S.S., Soares C.M. Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stage-specific forms and during cellular differentiation. J. Méd. Vet. Mycol. 1997, 35: 205-211.
- San-Blas G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent: *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Med. Vet. Mycol. 1993, 31: 99-113.
- San-Blas G., Niño-Vega G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. Mycopathologia 2008, 165: 183-195.
- San-Blas G., Nino-Vega G., Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. Med. Mycol. 2002, 40: 225-242.
- Sánchez A., Escandón P., Castañeda E. In vitro determination of virulence factors activity associated with several *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. Rev. Iberoam. Micol. 2008, 25: 145-149.
- Sano A., Kurita N., Iabuki K., Coelho R., Takeo K., Nishimura K., Miyaji M. A comparative study of four different staining methods for estimation of live yeast form cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycopathologia, 1993 124: 157-161.
- Silva S.P., Borges-Walmsley M.I., Pereira I.S., Soares C.M., Walmsley A.R., Felipe M.S.S. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Mol. Microbiol. 1999, 31: 1039-1050.
- Silva S.P., Felipe M.S.S., Pereira M., Azevedo M.O., Soares C.M.A. Phase transition and stage-specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Exp. Mycol. 1994, 18: 294-299.

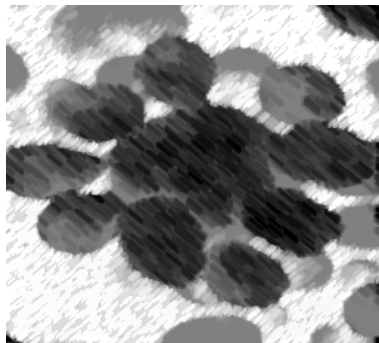
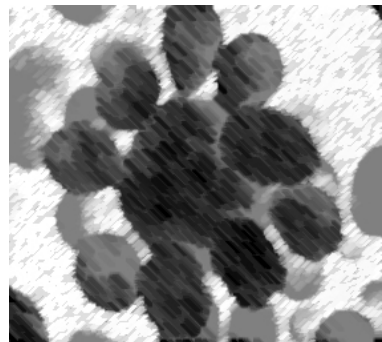
- Silva S.S., Tavares A.H., Passos-Silva D.G., Fachin A.L., Teixeira S.M., Soares C.M., Carvalho M.J., Bocca A.L., Silva-Pereira I., Passos G.A., Felipe M.S.S. Transcriptional response of murine macrophages upon infection with opsonized *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Microbes and Infection* 2008, 10: 12-20.
- Silva-Vergara M., Martinez R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Micopathol.* 1999, 144: 131-133.
- Silva-Vergara M.L., Martinez R., Chadu A., Madeira M., Freitas-Silva G., Leite M. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá State of Minas Gerais, Brazil. *Med. Mycol.* 1998, 36: 37-42.
- Singer-Vermes L.M., Burger E., Calich V.H., Modesto-Xavier L.H., Sakamoto T.N., Sigizaki M.F., Meira D.A., Mendes R.P.. Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in an experimental murine model. *Clin Exp Immunol* 1994, 97: 113-119.
- Singer-Vermes L.M., Burger E., Russo M., Vaz C.A., Calich V.L. Advances in experimental paracoccidioidomycosis using an isogenic murine model. *Arch. Med. Res.* 1993, 24: 239-245.
- Singer-Vermes LM, Ciavaglia MC, Kashino SS, Burger E, Calich VL. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 1992; 30: 261-4.
- Soares A.M.V.C., Calvi S.A., Peraçoli M.T.S., Fernandez A.C., Dias L.A., Anjos A.R. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high and low virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology* 2001, 102: 480-485.
- 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.* 2000, 156: 1811-1820.

- Sposto M.R., Mendes-Giannini M.J., Moraes R.A., Branco F.C., Scully C. Paracoccidioidomycosis manifesting as oral lesions: clinical, cytological and serological investigation. *J. Oral Pathol. Med.* 1994, 23: 85-87.
- Svidzinski T.I., Miranda Neto M.H., Santana R.G., Fischman O., Colombo A.L. *Paracoccidioides brasilienses* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1999, 41: 279-283.
- Tavares A.H.F.P., Silva S.S., Dantas A., Campos E.G., Andrade R.V., Maranhão A.Q., Brígido M.M., Passos-Silva D.G., Fachin A.L., Teixeira S.M.R., Passos G. A.S., Soares C.M.A., Bocca A.L., Carvalho M.J.A., Silva-Pereira I., Felipe M.S.S. Early Transcriptional Response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon Internalization by Murine Macrophages. *Microbes and Infection* 2007, 9: 583-590.
- Teixeira H.C., Calich V.L., Singer-Vermees L.M., D'Imperio-Lima M.R., Russo M. Experimental paracoccidioidomycosis: early immunosuppression occurs in susceptible mice after infection with pathogenic fungi. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1987, 20: 587-589.
- Teixeira M.M. Tipagem molecular e evolução do gênero *Paracoccidioides*. 2008. 156 f. Dissertação de mestrado em patologia molecular – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Distrito Federal - Brasil.
- Teixeira M.M., De Carvalho M.J.A., Dantas A.S., Felipe M.S.S. The hsp70 gene presents sequence differences among isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 2005, 14: 47-48.
- Tendrich M., Luca V., Tourinho E.K., Wanke B., Cuba J., Buescu A., Vaisman M., Pereira A.A., el-Andere W., Wajchenberg B.L. Computed tomography and ultrasonography of the adrenal glands in paracoccidioidomycosis. Comparison with cortisol and aldosterone responses to ACTH stimulation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991, 44: 83-92.

- Theodoro R.C., Bagagli E., Oliveira C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fungal Genetics and Biology* 2008, 45: 1284–1291.
- Torres-Rodríguez J.M., Morera Y., Baró T., Corominas J.M., Castañeda E. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an immunocompetent mouse model. *Med. Mycol.* 2003, 41: 59-63.
- Uenotsuchi T., Takeuchi S., Matsuda T., Urabe K., Koga T., Uchi H., Nakahara T., Fukagawa S., Kawasaki M., Kajiwara H., Yoshida S., Moroi Y., Furue M. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *Int. Immunol.* 2006, 18: 1637-1646.
- Vaz C.A.C., Mackenzie D.W.R., Hearn V.M., Camargo Z.P., Singer-Vermes L.M., Burger E., Calich V.L.G. Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis. *Clin. Exp. Immunol.* 1992, 88: 119-123
- Zacharias D., Ueda A., Moscardi-Bacchi M., Franco M., San-Blas G. A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *J. Med. Vet. Mycol.* 1986, 24: 445-454.



Anexos





UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 28 de agosto de 2007

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “ANÁLISE COMPARATIVA DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DAS CEPAS DE LEVEDURA PB18 E PB01 DO FUNGO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*”, UNBDOC nº 33798/2007, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Profa. Anamélia Lorenzetti Bocca
Coordenadora do CEUA