

**ELÚZIA CASTRO PERES EMIDIO**

**Produção de Melanina pelo Fungo Termodimórfico  
*Paracoccidioides lutzii* e Análise da Melanina Como Fator de  
Virulência Sobre a Interface Infecção - Resposta Imune**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2016

**ELÚZIA CASTRO PERES EMIDIO**

**Produção de Melanina pelo Fungo Termodimórfico  
*Paracoccidioides lutzii* e Análise da Melanina Como Fator de  
Virulência Sobre a Interface Infecção - Resposta Imune**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

Versão original

São Paulo  
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Emidio, Elúzia Castro Peres.

Produção de melanina pelo fungo *termodimórfico Paracoccidioides lutzii* e análise da melanina como fator de virulência sobre a interface infecção: resposta imune / Elúzia Castro Peres Emidio. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Tabora.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Relação patógeno-hospedeiro, micoses sistêmicas e emergentes, fungos dimórficos patogênicos.

Versão do título para o inglês: Melanin productin by the dimorphic fungus *Paracoccidioides lutzii* and analysis of melanin as a virulence factor in the interface infection: immune response.

1. *Paracoccidioides lutzii* 2. Melanina 3. Fator de virulência 4. L-DOPA 5. Paracoccidioidomicose I. Tabora, Prof. Dr. Carlos Pelleschi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB03/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Elúzia Castro Peres Emidio.

Título da Dissertação: Produção de melanina pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides lutzii* e análise da melanina como fator de virulência sobre a interface infecção: resposta imune.

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil  
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **94** nas fls. **22** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Carlos Pelleschi Taborda**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Produção de Melanina pelo Fungo Temodimórfico Paracoccidioides lutzii e Análise da Melanina Como Fator de Virulência Sobre a Interface Infecção-Resposta Imune.*" do qual participam o(s) aluno(s) **Elúzia Castro Peres Emidio** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **27.08.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 28 de agosto de 2014.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES  
Vice- Coordenador- CEUA- ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE  
Secretária- CEUA - ICB/USP

*Ao meu marido Gustavo e meus filhos  
Lucas e Camila, pelo abrigo de todas as  
horas...*

*Aos amigos que estiveram comigo no  
desenvolvimento deste trabalho, pelo apoio e  
imensa generosidade...*

## *AGRADECIMENTOS*

*Agradeço sobretudo À Deus, pela vida e por sempre colocar em meu caminho pessoas maravilhosas...*

*Ao Professor Dr. Carlos Pelleschi Taborda, exemplo de dedicação e de excelência em pesquisa, coração de grande generosidade, minha eterna gratidão pelo acolhimento e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Obrigada pelos ensinamentos, incentivos e exemplos. Com certeza uma das pessoas mais especiais que Deus me concedeu a oportunidade de conhecer!*

*Ao Professor e amigo querido Dr. Daniel Assis Santos, pelo apoio e incentivo, pela confiança e também por me receber em seu laboratório, agradeço de coração a imensa ajuda.*

*Aos Professores Dr. Luiz R. Travassos, Dr. Benedito Corrêa, Dr. Gil Benard, Dra. Gilda Del Negro e a todos os professores do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo por tudo que me ensinaram durante este período.*

*À Professora Dra. Kelly Ishida, pela atenção e disponibilidade em ajudar sempre.*

*À Dra. Martha Urán, pela amizade e por todos os conselhos e ensinamentos, contribuindo na orientação deste trabalho e também com sua força admirável ensinando não apenas ciência, mas lições de vida!*

*À Dra. Mariana Doprado, amiga querida e profissional admirável, com seu dinamismo me ajudou na execução de vários experimentos e teve enorme paciência e generosidade, contribuindo com inúmeros ensinamentos e nas correções deste trabalho.*

*Ao Lucas Dias, pela amizade, pelo carinho que sempre dispensou a mim e à minha família. Grande amigo, que com sua enorme paciência e inteligência, contribuiu imensamente na realização deste trabalho.*

*Ao Dr. Rodrigo Holanda da UFMG, que também me acolheu com muita generosidade, contribuindo na execução dos experimentos com inúmeros ensinamentos.*

*Ao Dr. Julian, pesquisador e pessoa admirável, com quem também tive a oportunidade de conviver e aprender muito. Ele e sua esposa Nathália foram pessoas muito queridas que sempre me receberam com muito carinho.*

*À Dra. Glauce M. G. Rittner, que me recebeu no laboratório desde o primeiro momento com enorme carinho e atenção, e se tornou uma irmã muito querida nesse tempo de convivência.*

*À querida Shirlei A. Vieira Marques, por se tornar uma amiga maravilhosa, sempre cuidando de todos no laboratório e a todos incentivando e contagiando com sua imensa alegria. Obrigada pelos seus ensinamentos e por nunca medir esforços em me ajudar!*

*Ao amigo Leandro, pela companhia e amizade. Com você aprendi que o melhor aprendizado se faz com alegria.*

*À amiga Aline Santana, por sempre estar comigo e me lembrar do valor da oração.*

*Ao Diego Rossi, amigo com quem tive a oportunidade de trabalhar inicialmente, obrigada pelo apoio e por tudo que aprendi com você!*

*Ao amigo Cleison Taira, por sempre nos inspirar com sua dedicação e seriedade em tudo que faz!*

*Ao querido amigo Marcello Araújo, pelos ensinamentos, força, doçura e alegria.*

*À amiga Cristina Spadari, ou melhor, Cris, pelo carinho e atenção dispensados a mim e por me apresentar o chimarrão*

*À querida Zita que chegou ao laboratório com imensa disponibilidade em ajudar, sempre acolhendo todos com muito carinho.*

*Enfim, a todos os colegas e amigos do laboratório que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado, entre eles gostaria de lembrar Thor A. Sessa, Dra. Luciana Thomaz, Felipe Augusto, Oriana M. Nader.*

*A todos os colegas e amigos de Pós-Graduação do ICB-USP pelo convívio e apoio.*

*Ao técnico do biotério Sr. Carlos Augusto da Silva pelo cuidado dos animais.*

*Às secretárias da Pós-Graduação e do Departamento de Microbiologia, em especial à Sra Giselle pela competência e disponibilidade em ajudar.*

*Aos funcionários da Sala de Esterilização, em especial, Sr. José Gomes, pela colaboração e ensinamentos.*

*A todos os amigos e colegas do laboratório de micologia médica da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial aos professores Dr. Daniel Santos e Dra Maria Aparecida Stoianoff, Dra. Juliana, Dra Danielle, Thaís, Rafael, Marliete, Lorena, Hellem, Vanessa, Ludmila, Bianca, Noelly, Valquíria, Gustavo, Anderson, Douglas, Sônia e Dra Vanessa Vieira, muito obrigada pelo carinho com que me receberam e pelo apoio.*

*Aos professores da UFMG que abriram as portas de seu laboratório me ajudando: Professora Dra. Susana Johan e sua aluna Nívea, Professor Dr. Jaques e sua equipe, Professor Dr. Flaviano e sua aluna Ana Carolina, Professora Dra Patrícia Cisalpino e equipe. Também agradeço a Sra. Andrea do laboratório de Pós-Graduação da UFMG pela imensa atenção e suporte técnico.*

*Aos meus familiares, em especial ao meu pai José Galvão (sempre presente), sei que de onde está compartilha comigo esta alegria. Minha mãe Elúzia Maria pela força e sempre cuidar dos meus filhos com tanto amor. Aos meus irmãos Bruno e Renata, Sabrina e Renato pela amizade. De todo coração agradeço aos meus familiares, Tia Zilda, Lalado, Wanda, cunhados, sobrinhos, tios e primos, pela família que formamos, pelas oportunidades de crescimento. A todos meus amigos, em especial aos companheiros das Casas Espiritas Simão Pedro e Maria de Magdala. A todos que torceram por mim, minha sincera gratidão!*

*À Fundação CAPES pelo apoio financeiro.*

*A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.*

*Enfim, ao meu companheiro de vida, Gustavo, por estar sempre ao meu lado, e aos meus filhos Lucas e Camila, por sempre me incentivarem a ser uma pessoa melhor...*

### *A Pena e a Pedra*

*“Estava com uma pedra na mão e uma pena na outra.*

*Ao soltá-las, e observando ambas as quedas, me veio um pensamento,*

*- Não sei se compensa a solidez da pedra ante a fragilidade da pena,*

*É que a pena conhece vários caminhos além da linha reta. Além disto, apesar de não chegar primeiro, a pena, e não a pedra, vai muito mais longe. No seu trajeto, vai fazendo curvas para lá e para cá, sem pressa alguma. Parece que ela pressente que as belezas do caminho são, quem sabe, mais interessantes do que o alívio da chegada. Talvez por isso, a pena, ao contrário da pedra, não se machuca nem nada faz ferir quando cessa o seu movimento.”*

*Memórias de um Delírio*

*Luciano F. Barros*

## RESUMO

Emidio ECP. Produção de melanina pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides lutzii* e análise da melanina como fator de virulência sobre a interface infecção - resposta imune. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose granulomatosa sistêmica, que tem como agentes etiológicos fungos dimórficos do gênero *Paracoccidioides*. A produção de melanina por vários fungos interfere no mecanismo da patogênese, como ocorre na paracoccidioidomicose. Assim, o presente projeto visou avaliar a produção de melanina pelos isolados de *P. lutzii*, e seus efeitos *in vitro*, avaliando o processo de fagocitose. Os resultados obtidos durante este trabalho mostraram que os isolados de *P. lutzii* (Pb01, Pb66, ED01, Pb1578 e Pb8334) melanizam de formas diferenciadas entre eles e quando comparados com isolados de *P. brasiliensis* (Pb60855, Pb18 e Pbcão). Ensaio de fagocitose, realizados com macrófagos peritoneais isolados de camundongos C57BL/6 enfrentados com os isolados Pb18, Pb60855 e Pb01, mostraram que a melanina reduziu a porcentagem de fagocitose das leveduras não tratadas de Pb18 e Pb60855, e o contrário aconteceu com Pb01. As análises dos perfis proteicos observados por eletroforese e dos perfis enzimáticos analisados pelo sistema API<sup>®</sup>ZYM (BIOMÉRIEUX), dos isolados Pb18, Pb60855 e Pb01, permitiram identificar que o isolado Pb01 produz comparativamente uma menor quantidade de proteínas nas condições ensaiadas. A mesma observação foi feita com relação à atividade da enzima lacase.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides lutzii*. Melanina. Fator de Virulência. Paracoccidioidomicose.

## ABSTRACT

Emidio ECP. Melanin production by the dimorphic fungus *Paracoccidioides lutzii* and analysis of melanin as a virulence factor in the interface infection - immune response. [dissertation (Master in Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a granulomatous systemic mycosis, whose etiological agents are dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides*. Melanin production by various fungi interferes in the mechanism of pathogenesis, as in paracoccidioidomycosis. Thus, this project aimed to evaluate the production of melanin by isolates of *P. lutzii* and its *in vitro* effects by assessing the process of phagocytosis. The results obtained during this work showed that the isolates of *P. lutzii* (Pb01, Pb66, ED01, Pb1578 and Pb8334) produce melanin in different ways between them and also when compared with isolates of *P. brasiliensis* (Pb60855, Pb18 and Pbcão). Phagocytosis assays, were carried out with C57BL/6 mice peritoneal macrophages that were challenged with Pb18, Pb60855 and Pb01. Results showed that melanin reduced the percentage of phagocytosis of untreated yeast of Pb60855 and Pb18 and the opposite happened with Pb01. The analysis of the protein and enzymatic profiles, of the isolates Pb18, Pb60855 and Pb01, enabled to determine that the isolated Pb01 produces a smaller amount of proteins compared with Pb18 and Pb60855 in the tested conditions. The same observation was made in relation to the laccase enzyme activity.

**Keywords:** *Paracoccidioides lutzii*. Melanin. Virulence Factor. Paracoccidioidomycosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Perfis de melanização de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> .....	50
<b>Figura 2</b> - Micromorfologia das células leveduriformes melanizadas. ....	51
<b>Figura 3</b> - Curvas de crescimento e melanização dos isolados de <i>P. brasiliensis</i> (Pb60855).....	53
<b>Figura 4</b> - Curvas de crescimento e melanização dos isolados de <i>P. lutzii</i> . ....	54
<b>Figura 5</b> - Perfis de melanização dos isolados de <i>P. lutzii</i> Pb8334 (A) e Pb1578 (B) e foto mostrando a formação de grumos de Pb8334. ....	56
<b>Figura 6</b> - Culturas em presença de L-DOPA e L-Epinefrina.....	57
<b>Figura 7</b> - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas de <i>P. brasiliensis</i> ATCC 60855 (Pb60855) crescidas em meio sintético McVM com 1 mM de L-DOPA, por 10 dias.....	59
<b>Figura 8</b> - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas de <i>P. brasiliensis</i> ATCC 60855 (Pb60855) crescidas em meio sintético McVM com 0,8 mg/mL de L-Epinefrina, por 10 dias. ....	59
<b>Figura 9</b> - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas de <i>P. brasiliensis</i> ATCC 60855 (Pb60855) crescidas em meio sintético McVM com 1 mM de L-DOPA, por 10 dias.....	60
<b>Figura 10</b> - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas de <i>P. brasiliensis</i> ATCC 60855 (Pb60855) crescidas em meio sintético McVM com 0,8 mg/mL de L-Epinefrina, por 10 dias. ....	61
<b>Figura 11</b> - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas dos isolados Pb18, Pb01, Pb66 e Pb8334 em meio McVM com 1mM de L-DOPA, por 10 dias.....	62
<b>Figura 12</b> - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas dos isolados Pb18, Pb01, Pb66 e Pb8334 em meio McVM com 0,8 mg/mL de L-Epinefrina, por 10 dias. ....	63
<b>Figura 13</b> - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas dos isolados Pb60855, Pb cão, Pb1578 e ED01 em meio McVM com 1 mM de L-DOPA, por 10 dias.....	64
<b>Figura 14</b> - Atividade de Lacase dos isolados de Paracoccidioides .....	65
<b>Figura 15</b> - Análise do perfil proteico de antígenos sonicados e exoantígenos dos isolados de Pb01, Pb18, Pb339 e Pb60855.....	66

<b>Figura 16</b> - Condições de manutenção dos isolados para análise enzimática API <sup>®</sup> ZYM. ....	67
<b>Figura 17</b> - Análise da atividade enzimática de Pb01, Pb60855 e Pb18. ....	69
<b>Figura 18</b> - Porcentagem de fagocitose.....	70
<b>Figura 19</b> - Cargas fúngicas de pulmão (UFC) de camundongos BALB/c infectados com leveduras não melanizadas e melanizadas do isolado Pb18. ....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Isolados utilizados.....	42
<b>Tabela 2</b> – Porcentagens de melanização encontradas em culturas após 15 dias de incubação.....	52
<b>Tabela 3</b> - Porcentagem de melanização dos isolados cultivados em meio com L-DOPA e L-Epinefrina, por 10 dias. ....	58
<b>Tabela 4</b> - Análise colorimétrica das atividades enzimáticas pela técnica de API <sup>®</sup> ZYM (25 200 BIOMÉRIEUX). ....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - Molibdato de amônio tetrahidratado

°C – Graus Celcius

µg – micro gramas

µL – micro litros

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

AgSon - antígenos sonicados

aPI – inibição fotodinâmica antimicrobiana

BHI – *Brain Heart Infusion*

BSA - Soro Albumina Bovina

C' – complemento

Ca 12A - *Candida albicans* isolado 12A

$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – Cloreto de cálcio dihidratado

CIE – contraimunoelctroforese

CLR - receptores de lecitina tipo C

Cn ATCC 28957 - *Cryptococcus neoformans* isolado ATCC 28957

$\text{CO}_2$  – dióxido de carbono

$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – Sulfato de cobre pentahidratado

D-DOPA - D-3,4-dihidroxifenilalanina

DHN – dihidroxinaftaleno

ED01 - *Paracoccidioides lutzii* isolado ED01

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

ExoAg - exoantígenos

$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - Sulfato de ferro (II) e amônio P.A. hexahidratado

g - gramas

g - Relative Centrifugal Force

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

gp43 - glicoproteína de 43 kDa

gp70 - glicoproteína de 70 kDa

h – horas

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – Ácido Bórico

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

HSP - *heat shock proteins*

ID - Imunodifusão Dupla em gel de agarose

IF – Imunofluorescência

IFN-γ – Interferon gama

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgG4 – Imunoglobulina G isotipo 4

IgM - Imunoglobulina M

IL-1 – Interleucina 1

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-17A – Interleucina 17A

IL-17F – Interleucina 17F

IL-21 – Interleucina 21

IL-22 – Interleucina 22

IL-23 – Interleucina 23

ITS - *Internal transcribed spacer*

kDa – Quilodalton

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - Fosfato monopotássico

L – litros

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

LED - díodo emissor de luz

M – Molar

Mab 6D2 - anticorpos monoclonais contra melanina de *Cryptococcus neoformans*

Mab 8C3 – anticorpos monoclonais contra melanina de *Paracoccidioides brasiliensis*

MAbs - Anticorpos monoclonais

MALDI-TOF MS - *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry*

McVM - Mcveigh-Morton

mg – miligramas

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – Sulfato de magnésio heptahidratado

mL - mililitros

mM – mili molar

MnSO<sub>4</sub>. 14H<sub>2</sub>O – Sulfato manganoso hidratado

MSPs - espectros de massa

NaCl – Cloreto de sódio

ng – nanogramas

NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> – Sulfato de amônio

NK - células natural *killer*

nm - nanômetro

*P. brasiliensis* – *Paracoccidioides brasiliensis*

*P. lutzii* – *Paracoccidioides lutzii*

PAMPs - padrões moleculares associadas ao patógeno

Pb cão – *Paracoccidioides brasiliensis* isolado cão

Pb01 – *Paracoccidioides lutzii* isolado 01

Pb1578 – *Paracoccidioides lutzii* isolado 1578

Pb18 – *Paracoccidioides brasiliensis* isolado 18

Pb339 – *Paracoccidioides brasiliensis* isolado 339

Pb60855 – *Paracoccidioides brasiliensis* isolado 60855

Pb66 – *Paracoccidioides lutzii* isolado 66

Pb8334 – *Paracoccidioides lutzii* isolado 8334

PBS – *Fosfate buffer saline*

PCM - paracoccidioidomicose

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

RPM – rotações por minuto

SD – sem L-DOPA

SDS-PAGE - gel de poliacrilamida-duodecil sulfato de sódio

SI - soro inativado

SNC – Sistema Nervoso Central

T CD25<sup>+</sup> - linfócitos T CD25 positivo

T CD4<sup>+</sup> - linfócitos T CD4 positivo

T CD8<sup>+</sup> - linfócitos T CD8 positivo

TB - *Trypan Blue*

TBO - azul de toluidina

TGF-β – Transforming Growth Factor Beta

Th - células T *helper* ou auxiliares

Th<sub>1</sub> - células T *helper* ou auxiliares do tipo Th<sub>1</sub>

Th<sub>17</sub> - células T *helper* ou auxiliares do tipo Th<sub>17</sub>

Th<sub>2</sub> - células T *helper* ou auxiliares do tipo Th<sub>2</sub>

TLRs - receptores semelhantes a *Toll*

TP - tuberculose pulmonar

Tregs - células T regulatórias

Tris-HCl - Tris(hidroximetil)aminometano – ácido clorídrico

UFC - unidades Formadoras de Colônias

UV – ultra-violeta

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – Sulfato de zinco heptahidratado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1 Aspectos gerais da Paracoccidioidomicose</b> .....	22
<b>1.2 Filogenia</b> .....	23
<b>1.3 Infecção e formas clínicas da PCM</b> .....	24
<b>1.4 Resposta imune</b> .....	27
<b>1.5 Diagnóstico</b> .....	29
<b>1.6 Tratamento</b> .....	31
<b>1.7 Fatores de virulência</b> .....	32
<b>1.8 Melaninas</b> .....	33
<b>1.9 Lacase fúngica</b> .....	36
<b>1.10 Melanina e Paracoccidioides</b> .....	37
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	40
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
<b>4.1 Meios de culturas utilizados</b> .....	41
<b>4.2 Isolados utilizados</b> .....	42
<b>4.3 Cultivo das leveduras de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i></b> .....	43
<b>4.4 Cultivo do bolor de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i></b> .....	43
<b>4.5 Curvas de crescimentos</b> .....	43
<b>4.6 Determinação da viabilidade das leveduras</b> .....	44
<b>4.7 Ensaio de fluorescência</b> .....	44
<b>4.8 Análise colorimétrica da atividade de lacase</b> .....	44
<b>4.9 Análise do perfil proteico</b> .....	45
<b>4.10 Análise de atividades enzimáticas através do teste de API<sup>®</sup>ZYM (BIOMÉRIEUX)</b> .....	46
<b>4.11 Ensaio de fagocitose</b> .....	46
<b>4.12 Ensaio in vivo: avaliação da carga fúngica em camundongos BALB/c infectados com leveduras melanizadas e não-melanizadas.</b> .....	48
4.12.1 Infecção intratraqueal (i.t.).....	48
4.12.2 Avaliação da carga fúngica no pulmão - UFC (Unidades Formadoras de Colônias).....	49
<b>4.13 Análise estatística</b> .....	49

<b>5 RESULTADOS</b> .....	50
<b>5.1 Determinação do perfil de melanização de isolados de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i></b> .....	50
<b>5.2 Micromorfologia das células leveduriformes melanizadas</b> .....	51
<b>5.3 Perfil de crescimento e melanização dos isolados de <i>P. lutzii</i> (Pb01, ED01, Pb66, Pb1578 e Pb8334) e de <i>P. brasiliensis</i> (Pb60855) em meio suplementado com 0,1mM e 1mM de L-DOPA e em meio sem L-DOPA (SD).</b> .....	53
<b>5.4 Ensaio de fluorescência</b> .....	57
<b>5.5 Atividade de lacase</b> .....	65
<b>5.6 Análise do perfil proteico</b> .....	66
<b>5.7 Análise de atividades enzimáticas pela técnica de API<sup>®</sup>ZYM (BIOMÉRIEUX)</b> .....	67
<b>5.8 Ensaio de fagocitose</b> .....	70
<b>5.9 Ensaio in vivo - avaliação da carga fúngica em camundongos BALB/c infectados com leveduras melanizadas e não-melanizadas.</b> .....	72
<b>6 DISCUSSÕES</b> .....	73
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	80
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	82

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais da Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica granulomatosa, que tem como agentes etiológicos os fungos do gênero *Paracoccidioides*. Provoca alterações principalmente nos pulmões, na pele, nas mucosas, nas glândulas supra-renais, e em órgãos do sistema reticuloendotelial, como fígado, baço, linfonodos e medula óssea, podendo atingir também outros órgãos e sistemas. Tem evolução crônica, podendo levar a morte. Atinge tanto indivíduos imunocomprometidos quanto imunocompetentes (1,2).

Uma das principais características desses fungos é o dimorfismo térmico, isto é, apresenta-se sob a forma de levedura à temperatura de 35°C a 37 °C , sendo esta a forma patogênica, encontrada nos tecidos. E à temperatura de 18 °C a 25°C observa-se a forma filamentosa, que caracteriza a forma saprofítica ou infectante (2,3).

A PCM é uma doença geograficamente restrita a áreas subtropicais da América Latina, com alta prevalência no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina. Sendo Brasil, o país com maior número de casos registrados. É uma doença relacionada a atividades ligadas ao solo e muito frequente em populações rurais (2-4).

A prevalência e a incidência desta doença são difíceis de serem estimadas, uma vez que a notificação de casos não é compulsória (5). Um estudo realizado no Brasil, no período de 1980 a 1995, mostrou uma incidência de 10 a 30 infecções por milhão de habitantes, com uma média de mortalidade de 1,45 por milhão de habitantes, por ano, o que torna esta doença a maior causa de mortalidade entre as micoses sistêmicas, destacando-se como oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva entre as infecciosas e parasitárias. Este estudo também mostrou que a doença prevaleceu como endemia nas áreas não metropolitanas, sendo os estados sul, sudeste e centro-oeste com maior número de casos; a taxa de mortalidade foi predominante em indivíduos do sexo masculino e o grupo etário entre 30-59 anos foi o mais atingido, seguido dos indivíduos com 60 anos ou mais. Também demonstrou que a taxa de mortalidade observada pode ser

considerada como indicador para definir a doença como importante agravo de saúde no Brasil (6).

A PCM foi descrita pela primeira vez em 1908 por Adolpho Lutz que identificou uma micose com formação de pseudococcídio ao avaliar lesões da mucosa oral de dois pacientes em São Paulo, diferenciando da micose descrita por Posadas e Wernicke, na Argentina, produzida por *Coccidioides* spp.. Assim, Lutz denominou esta nova micose como “hifoblastomicose americana”, porque todos ou quase todos os casos bem caracterizados procediam do continente americano (7).

Splendore, em 1912, também contribuiu com estudos mais aprofundados relacionados à morfologia e biologia do fungo, classificando-o dentro do gênero *Zymonema*, sendo então designado como *Zymonema brasiliensis* (8). Mas em 1930, Almeida observou diferenças entre o granuloma coccidióico causado pelo fungo *Coccidioides immitis*, nos Estados Unidos, e o granuloma da PCM, no Brasil, e propôs um novo gênero para o parasito brasileiro, *Paracoccidioides*, classificando-o em um novo gênero e espécie: *Paracoccidioides brasiliensis* (9).

## 1.2 Filogenia

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e através de novos estudos filogenéticos, os fungos do gênero *Paracoccidioides* receberam a classificação taxonômica que os engloba com os demais fungos termodimórficos (*Coccidioides posadasii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, e *Histoplasma capsulatum*), passando assim, à seguinte classificação: Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Pleomycetes*, Ordem *Onigenales*, Família *Onygenaceae*, Gênero *Ajellomyces* e Espécie *brasiliensis*, sendo então denominado *Paracoccidioides brasiliensis*, reportando à fase anamórfica do fungo. Até então, a fase teleomórfica era considerada desconhecida (10). Estudos recentes de genética populacional e genômica comparativa mostraram evidências dessa fase, evidenciando a habilidade desse fungo na produção de estruturas relacionadas à maquinaria sexual, indicando que a reprodução sexuada pode fazer parte do ciclo de vida de *Paracoccidioides* (11,12).

Estudos moleculares mostraram que isolados de *P. brasiliensis* de diferentes regiões apresentavam grande variabilidade genética (13). Assim, em 2006, oito regiões gênicas que estão presentes em 5 diferentes loci no genoma do fungo foram

escolhidas para tentar agrupar 65 isolados de *P. brasiliensis*. Baseados nesta análise, foi proposta a existência de três grupos filogenéticos distintos, sendo eles S1: grupo parafilético com 38 isolados da Argentina, Brasil, Peru e Venezuela e um isolado de pinguim da Antártida; PS2: grupo monofilético com seis isolados, sendo cinco do Brasil e um da Venezuela; PS3: grupo monofilético com 21 isolados da Colômbia (12,14).

Em estudo posterior, foram analisadas regiões codificantes e não codificantes de vários genes e de sequências ITS (do inglês *Internal transcribed spacer*) de 21 isolados de *P. brasiliensis*, sendo 14 destes isolados utilizados no estudo realizado por Matute e colaboradores (2006) e mais sete novos isolados. A maioria dos isolados foi agrupada nos clados S1 e PS3, e um isolado, Pb01, ficou separado dos demais grupos, na base do cladograma, revelando um isolado atípico altamente divergente das três espécies filogenéticas descritas previamente (14).

Em 2009, isolados latino-americanos foram avaliados a fim de comparar com o isolado Pb01, e através da metodologia de detecção de espécies filogenéticas por concordância genealógica foi identificado uma nova espécie composta pelos isolados "*Pb01-like*", que é altamente divergente dos três clados identificados anteriormente (S1, PS2 e PS3). Assim, considerando os dados filogenéticos moleculares, características morfológicas exclusivas e possivelmente um longo período de isolamento genético, os autores propuseram a descrição formal de uma nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides*, sugerindo a denominação de *Paracoccidioides lutzii*, para os isolados "*Pb01-like*", em homenagem ao Dr. Adolpho Lutz, quem primeiro descreveu a doença. O grupo "*Pb01-like*" é endêmico nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil (Rondônia, Mato Grosso e Goiás) e compartilha algumas áreas geográficas com o grupo S1(15).

A importância desta classificação radica no fato de que estudos comparativos, de genômica e proteômica, entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii* mostraram diferenças significativas que podem influenciar o quadro clínico da doença, o diagnóstico e o tratamento da paracoccidioidomicose (16–18).

### **1.3 Infecção e formas clínicas da PCM**

No meio ambiente, o fungo encontra-se na fase filamentosa e desenvolve-se preferencialmente em locais com solo de ótima permeabilidade, rico em matéria

orgânica, com vegetação abundante, próximos de cursos de água, com elevada umidade relativa, alto índice pluviométrico e temperaturas entre 18 a 28°C, que constituem condições ideais para esporulação do fungo e disseminação aérea, que ocorre durante o manejo do solo, especialmente nas atividades agrícolas, terraplenagem, preparo de solo, práticas de jardinagens, transporte de produtos vegetais, entre outros. (3,4,19).

A infecção ocorre com a inalação de propágulos da fase micelial do fungo que, através da via respiratória, instalam-se primariamente nos alvéolos pulmonares. Nesse momento, o fungo converte-se à fase leveduriforme, transformação considerada fundamental para que a infecção se estabeleça. A partir deste ponto, o fungo pode se disseminar por via hematogênica e, ou, linfática para qualquer parte do organismo. A introdução cutânea direta do fungo, embora já documentada, é muito rara. Não existem evidências de transmissão inter-humana (2,20).

As mulheres são mais resistentes à doença, devido à presença do hormônio 17 $\beta$ -estradiol que inibe a transição do conídio ou micélio para levedura. Essa diferença hormonal e a maior exposição dos homens que mulheres no meio rural justificam a maior predominância da doença entre homens (4,21).

Alcoolismo, associado à desnutrição, e tabagismo estão frequentemente associados ao desenvolvimento da doença. Ao contrário de outras micoses sistêmicas, como criptococose, histoplasmose disseminada e candidíase, a PCM não é usualmente relacionada a doenças imunodepressoras. Entretanto, há casos de PCM associados à infecção pelo HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), neoplasias e, mais raramente, a transplantes de órgãos (5,19,20). O principal diagnóstico diferencial é com tuberculose pulmonar (TP), muito semelhante à PCM em relação às alterações radiográficas e às manifestações clínicas. TP e PCM podem comprometer um mesmo indivíduo, e essa associação ocorre em 5,5-19% dos casos, como mostrado em alguns estudos, tornando mais difícil o diagnóstico de ambas as doenças e ressaltando a importância da investigação paralela de TP e PCM (22,23).

A maioria dos indivíduos infectados desenvolvem infecção assintomática ou subclínica, em que há uma resposta imune específica e muitas vezes satisfatória no controle do processo infeccioso. Nestes casos, a sensibilização dos pacientes pode ser observada através do teste intradérmico com paracoccidioidina (polissacarídeo

extraído de células leveduriformes de várias amostras de *P. brasiliensis*) que se mostra positivo, tendo, assim, valor em inquéritos epidemiológicos (24–26).

No pulmão, o foco infeccioso inicial pode regredir com a destruição do fungo e formação de uma cicatriz estéril; pode regredir, porém, mantendo células leveduriformes quiescentes no interior de granulomas, com um longo período de latência; ou pode progredir, desenvolvendo sinais e sintomas com formas clínicas variadas dependentes de alguns fatores, como diferentes níveis de virulência das cepas ou falha no sistema imunológico do hospedeiro, principalmente pela depressão da imunidade celular (2,24,27).

A PCM tem duas formas clínicas progressivas: forma aguda ou sub-aguda (tipo juvenil) e forma crônica (tipo adulto). A forma aguda ou sub-aguda envolve de 3 a 5% dos casos, predominando em crianças e adolescentes, mas podendo eventualmente, acometer indivíduos até os 35 anos de idade. É caracterizada por ter um curso mais rápido (4 a 12 semanas) e ser mais severa, apresentando envolvimento principalmente do sistema reticuloendotelial, com presença de linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas. A forma crônica (tipo adulto) ocorre em mais de 90% dos casos, acometendo principalmente adultos, do sexo masculino, entre os 30 e 60 anos. A doença demora meses ou anos para se estabelecer e as manifestações pulmonares são os melhores indicadores desta forma da doença, que, na maioria dos casos, envolve mais de um órgão simultaneamente (apresentação multifocal), sendo pulmões, mucosas e pele os sítios mais acometidos (2,19,28).

Com a recente identificação do complexo de espécies crípticas do gênero *Paracoccidioides*, muitos questionamentos surgem com relação a possíveis diferenças na forma clínica da PCM, causada por *P. brasiliensis* ou *P. lutzii*, e diferenças sorológicas que possam impactar no diagnóstico. A análise de alguns estudos, realizados anteriormente, mostraram que pacientes da região central do Brasil, onde *P. lutzii* é endêmico, desenvolvem mais comumente a forma clínica linfoabdominal, diferentemente das formas clínicas que ocorrem com pacientes do sul e sudeste, onde *P. brasiliensis* é endêmico (11).

## 1.4 Resposta imune

O estabelecimento da doença, sua disseminação e gravidade dependem de fatores inerentes ao próprio fungo, como fatores de virulência, composição antigênica, volume do inóculo e, principalmente, dos fatores ligados ao hospedeiro, relativos à sua habilidade de desenvolver uma resposta imune eficaz. O fungo é capaz de produzir antígenos metabólicos que interagem com o sistema imune do hospedeiro, provocando uma resposta imunológica altamente complexa e multifatorial (28).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra as infecções fúngicas e vários mecanismos constitutivos de defesa estão presentes em locais de interação contínua com o patógeno e incluem a função de barreira da pele e das superfícies das células epiteliais das mucosas do trato respiratório, trato gastrointestinal e trato genito-urinário. Assim, a ativação de proteínas de complemento, a atividade microbicida de células natural *killer* (NK) e fagócitos, a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas desempenham um papel importante na resposta do hospedeiro ao patógeno, no foco inicial da infecção (29).

As células fagocíticas reconhecem estruturas que são características de patógenos e que não estão presentes em células do hospedeiro, chamadas padrões moleculares associadas ao patógeno (PAMPs). Este reconhecimento ocorre através de receptores presentes na membrana celular, como por exemplo, os receptores semelhantes a *Toll* ou TLRs (do inglês *Toll-like receptors*) e receptores de lecitina tipo C ou CLR. Os TLRs são capazes de reconhecer e induzir sinais que resultam na expressão de genes da resposta imune inata e na produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias que regulam a resposta imune adaptativa (30). Entretanto, apesar dos TLRs promoverem resposta imunológica contra agentes infecciosos, modelos experimentais sugerem que leveduras do fungo *Paracoccidioides* penetram em macrófagos do hospedeiro através dos receptores TLR2 e TLR4. Assim, a interação entre o TLR e o patógeno *Paracoccidioides* é considerada um mecanismo de escape desenvolvido pelo fungo para garantir sua sobrevivência dentro das células fagocitárias (31).

Indivíduos saudáveis, que entram em contato com o fungo, podem resolver a infecção no local de inoculação a partir de uma resposta imune inata eficiente e do desenvolvimento de resposta imune celular efetiva, geralmente associada a padrões

de resposta regulada por células T *helper* (Th) ou auxiliares do tipo Th<sub>1</sub>, caracterizada pela síntese de citocinas, como IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-12 que ativam macrófagos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, resultando na formação de granulomas compactos. A organização desta resposta imune celular permite o controle da replicação do fungo, com formação de granulomas densos, mas formas quiescentes podem persistir no interior do granuloma (19,32).

Pacientes infectados que evoluem para doença apresentam depressão da resposta tipo Th<sub>1</sub> e desenvolvem outros padrões de respostas imunológicas, como resposta regulada por células T *helper* do tipo Th<sub>2</sub>, com aumento dos níveis de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, que corresponde à resposta não protetora, sendo ineficiente para conter a propagação da infecção. A resposta imune humoral contra o fungo não é efetiva. Caracteriza-se pela produção de altos títulos de anticorpos das classes IgG4, IgA e IgE, associadas ao predomínio de citocinas supressoras do granuloma como IL-4, IL-5 e TGF- $\beta$ , além de intensa eosinofilia, sendo observada em pacientes com as formas mais graves da PCM, o que reforça o papel não protetor da resposta do tipo Th<sub>2</sub> (32).

Os pacientes com a forma crônica ou moderada da doença apresentam um padrão de resposta intermediário entre Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>. As células T regulatórias (Tregs) com fenótipo CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> são importantes no controle da resposta imune. A ausência destas células está associada à exacerbação da resposta inflamatória (32).

Um novo subconjunto de células T *helper*, as chamadas células Th<sub>17</sub>, foi descrito e tem sido caracterizado pela produção de um perfil de citocinas distinto, denominadas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. Estas citocinas, em especial a IL-17, desempenham uma importante função no recrutamento de neutrófilos e alguns monócitos, para o sítio da infecção, promovendo uma inflamação neutrofílica que leva à ingestão e morte do patógeno. O acoplamento do receptor Dectina-1 nas células dendríticas por produtos fúngicos, estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-6, IL-1 e IL-23, por essas células, e esta combinação de citocinas induz a expansão de células Th<sub>17</sub>, que apresenta um papel protetor para o hospedeiro, especialmente frente a infecções fúngicas (33,34).

## 1.5 Diagnóstico

Existem diversas metodologias empregadas para o diagnóstico da PCM, mas o método considerado padrão ouro é a observação direta do fungo ou seu isolamento em meio de cultura a partir de fluidos biológicos (escarro, lavado broncoalveolar, secreções) e tecidos (raspados de lesões e biópsias), em que é possível observar a fase leveduriforme, com formas arredondadas, parede espessa de duplo contorno com gemulação lateral múltipla ou com aspecto de roda de leme. Porém, quando isto não é possível, diversos ensaios sorológicos são utilizados para detectar a infecção, além de constituírem importantes ferramentas para o monitoramento do tratamento (2,35,36).

Os ensaios sorológicos mais comumente empregados são a Imunodifusão Dupla em gel de agarose (ID) e a contraímunoelctroforese (CIE). O teste de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ainda é pouco utilizado nos centros de referência do Brasil. Estes ensaios para a detecção de anticorpos apresentam limitações devido à reatividade cruzada, principalmente frente a soros de pacientes com histoplasrose, doença de Jorge Lobo, aspergilose e candidíase. Os principais antígenos utilizados são a gp43, uma glicoproteína de 43 kDa, cuja presença é majoritária em extratos de *P. brasiliensis*, e gp70 (uma glicoproteína de 70 kDa) (4,36–39).

Estudos recentes têm mostrado que a alta variabilidade antigênica do complexo de espécies do gênero *Paracoccidioides* (S1, PS2, PS3 e *P. lutzii*) pode ser responsável pelo número relevante de resultados falso-negativos no diagnóstico sorológico. Existe um elevado número de pacientes provenientes da região centro-norte do Brasil com PCM e que apresentam baixa ou nenhuma imunorreatividade. Testes de imunodifusão com antígenos produzidos a partir do isolado Pb339 (*P. brasiliensis*) de São Paulo e reagidos com soros de pacientes do Mato Grosso tiveram baixa positividade. Recentemente, testes sorológicos confirmaram que soros de pacientes com PCM causado por *P. lutzii* são capazes de reconhecer antígenos celulares de *P. lutzii*. No entanto, soros de pacientes com PCM causada por *P. brasiliensis* não reconhecem ou reconhecem fracamente antígenos de *P. lutzii*. Evidenciando, desta forma, a necessidade de padronização de novos antígenos, especialmente de *P. lutzii*, visando melhorar os métodos diagnósticos (11,40).

O emprego de técnicas moleculares também tem mostrado resultados promissores, sendo a técnica de PCR a mais utilizada. Um dos alvos mais amplamente estudado é o gene da Gp43. Gomes et al. (2000), empregando o par de iniciadores PC2-PC6, específico para este gene, observou uma positividade de 100% na detecção de DNA de *P. brasiliensis* em amostras de saliva de 11 pacientes portadores da forma crônica da PCM e que apresentavam comprometimento pulmonar. Mostrando, assim, que a técnica de PCR pode ser utilizada como uma alternativa interessante na obtenção de um diagnóstico sensível e confiável da PCM (41).

Entretanto as técnicas moleculares constituem métodos mais caros, demorados e que exigem mão de obra especializada. E num contexto em que a ecologia do fungo e os aspectos clínicos específicos de cada espécie, *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, permanecem ainda não esclarecidos, outros métodos diagnósticos têm sido pesquisados no intuito de solucionar o impasse da dificuldade de se introduzir técnicas moleculares na rotina e a utilização de testes sorológicos, uma vez que ainda não há um perfil antigênico padronizado para cada espécie, e a alta variabilidade antigênica entre elas leva frequentemente a falhas no diagnóstico. Assim, uma técnica que vem sendo recentemente explorada é a MALDI-TOF MS (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry*) (42).

A ionização e dessorção a laser assistida por matriz é uma técnica de ionização branda utilizada em espectrometria de massa, que permite a análise de biomoléculas e grandes moléculas orgânicas, tem sido aplicada com sucesso em laboratórios clínicos em todo o mundo, mostrando-se como uma ferramenta metodológica alternativa, rápida e precisa para a identificação de fungos. Almeida e colaboradores, em 2015, analisaram 22 isolados, previamente identificados por PCR e sequenciamento, e os principais espectros de massa (MSPs) para *P. brasiliensis* e *P. lutzii* foram estabelecidos. Assim, demonstraram que MALDI-TOF MS pode ser um método de escolha para a diferenciação de espécies dentro do gênero *Paracoccidioides*, beneficiando estudos clínicos e laboratoriais e determinando possíveis diferenças entre as doenças causadas por estas duas espécies, além de ser uma técnica fácil de ser incorporada na rotina laboratorial e que não exige extensa formação de mão de obra (42).

## 1.6 Tratamento

O tratamento da PCM é relativamente difícil, exigindo uma terapia prolongada para obter um resultado bem sucedido e evitar recidivas da doença. Dependendo da terapia estabelecida para cada caso, o tratamento pode durar muitos meses até cerca de 5 anos, o que frequentemente leva ao abandono pelo paciente, e consequente recidiva da doença (43,44).

Muitas drogas são úteis, incluindo, sulfonamidas, anfotericina B, derivados azólicos (cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol e posaconazol) e terbinafina. As sulfonamidas são as drogas clássicas utilizadas para o tratamento, especialmente a combinação sulfametoxazol-trimetoprim que é a alternativa mais utilizada na terapêutica ambulatorial dos pacientes com PCM, por ser eficaz, bem tolerada, apresentar menor custo, e também é mantida por longo período para evitar recidivas da doença. O itraconazol tem se mostrado como a melhor opção para tratamento das formas clínicas leve a moderada. Nas formas mais avançadas a droga de escolha é a anfotericina B, ou a combinação sulfametoxazol-trimetoprim por via intravenosa (19,44).

O voriconazol também é eficaz para o tratamento da PCM leve e moderada, e apresenta boa tolerabilidade. Voriconazol e fluconazol podem ser usados em pacientes com neuro PCM, pois ambos apresentam boa penetração no SNC. Entretanto, o voriconazol apresenta custo muito elevado. A terbinafina pode ser uma alternativa ao itraconazol, uma vez que se verificaram semelhanças na atividade *in vitro* (4,44).

Até o momento, os dados *in vitro* não confirmaram a susceptibilidade de *Paracoccidioides* à nova classe de antifúngicos, equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina). Entretanto, Rodríguez-Brito e colaboradores, em 2010, verificaram que a caspofungina induz mudanças físicas e deterioração citoplasmática em ambas as fases fúngicas. Observaram uma inibição da fase leveduriforme de 20 a 65% e na fase filamentosa de 75 a 82%. O efeito da caspofungina parece estar relacionado à composição de  $\beta$ -(1,3)-glucano presente na parede celular do fungo, que encontra-se em maior quantidade na fase filamentosa e em proporções bem menores na fase leveduriforme, o que justifica a diferença nos valores de inibição encontrado para cada fase (44,45).

Os corticosteróides devem ser considerados para utilização em associação com a terapia de antifúngicos, em pacientes com formas graves e disseminadas de PCM, na tentativa de reduzir as intensas reações inflamatórias teciduais (46).

A toxicidade da anfotericina B é bastante conhecida, e tanto para ela quanto para as sulfonamidas e os azólicos, mesmo com um tratamento bem planejado, a carência de respostas, as recidivas e os óbitos ocorrem entre muitos dos pacientes tratados. Assim, a utilização de vacinas ou tratamentos alternativos como a transferência passiva de anticorpos monoclonais específicos para antígenos ou fatores de virulência de *Paracoccidioides* spp., poderia melhorar a eficiência da quimioterapia e encurtar os períodos de tratamento. Ainda não existe uma vacina licenciada para humanos, porém, em modelos experimentais, a utilização de peptídeos e antígenos fúngicos, em protocolos de vacinação terapêutica, realizados em nosso laboratório, mostrou-se eficiente (39,47).

### 1.7 Fatores de virulência

Os fatores de virulência são moléculas próprias de um patógeno, que proporcionam uma capacidade de adaptação no hospedeiro, auxiliando na aderência, na colonização, na disseminação e na habilidade do fungo para resistir à ambientes hostis e escapar dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro, permitindo, assim, o estabelecimento da infecção (48).

Entre os fatores de virulência do fungo *Paracoccidioides* spp., podemos destacar a termotolerância, capacidade de crescimento a 37 °C . Esta resistência às mudanças de temperatura também está relacionada com a síntese de proteínas de choque térmico ou HSP (do inglês *heat shock proteins*), que parecem desempenhar um papel importante não só na termo-adaptação, mas também na transição de micélio para levedura (48).

O dimorfismo é uma característica que depende da alteração de temperatura e / ou de nutrientes e favorece a instalação fúngica e a resistência contra agressões do hospedeiro. No caso de *Paracoccidioides* esta característica parece estar estreitamente relacionada com a síntese de glucano. Na forma micelial há uma predominância de  $\beta$ -(1,3)-glucano enquanto que na forma de levedura o polissacarídeo principal é  $\alpha$ -(1,3)-glucano.  $\alpha$ -(1,3)-glucano confere maior rigidez à

parede celular e conseqüentemente, maior resistência frente aos mecanismos de defesa do hospedeiro (49,50).

A adesão fúngica nos tecidos do hospedeiro desempenha um papel crítico na infecção, possibilitando a colonização e disseminação do patógeno no organismo hospedeiro. Assim, o antígeno imunodominante, gp43 também é considerado um fator de virulência pelas suas propriedades de aderência à laminina, importante componente da matriz extracelular do hospedeiro. Muitas enzimas, com participação em diferentes vias metabólicas, também se encontram envolvidas no processo de aderência das células fúngicas às células do hospedeiro. Fosfolipase B, PbHad32p, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) e enolase têm sido associadas com a aderência inicial do fungo às células epiteliais alveolares e aos macrófagos, sendo consideradas como importantes fatores de virulência (11).

Várias enzimas hidrolíticas como lipases, proteinases e fosfolipases que desempenham um papel importante no metabolismo fúngico, também estão envolvidas na patogênese da infecção, causando danos para as células hospedeiras e o fornecimento de nutrientes para o fungo num ambiente restrito (48). Alguns estudos têm mostrado que a análise do perfil enzimático pode contribuir para determinar a espécie do fungo e também no reconhecimento do perfil de resistência a antifúngicos, sugerindo que cepas resistentes apresentam um perfil enzimático maior que cepas sensíveis (51).

A produção de melanina é outro fator de virulência de grande importância, pois confere a capacidade de proteção contra agressões geradas pelo sistema imune do hospedeiro e proteção contra agressões ambientais (52,53).

## **1.8 Melaninas**

As melaninas são pigmentos ubíquos na natureza, amplamente distribuídas em todos os reinos biológicos. São estruturas químicas amorfas formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou indólicos. A composição exata das subunidades desses polímeros não é bem conhecida, assim, a identificação da melanina é baseada em características físicas. Em geral possuem cor tipicamente escura, marrom ou preta, mas pode apresentar outras cores como vermelho ou amarelo. São hidrofóbicas, de alto peso molecular, com carga negativa e são

insolúveis na maior parte das substâncias. São responsáveis pela coloração de plantas e animais, sendo encontradas na pele, olhos, cabelos, penas, ovos, cutículas de insetos, a tinta de cefalópodes e na parede e citoplasma de muitos microrganismos. Em humanos estes pigmentos também são encontrados fora da pele, na substância negra dos neurônios e hepatócitos (52,54).

Em fungos, são encontrados duas classes de melanina, dependendo da sua via biossintética: a via da **poliquetídeo-sintetase**, com formação da DHN-melaninas, melaninas de dihidroxinaftaleno, sintetizadas a partir de substratos que são produzidos endogenamente, sendo acetil-CoA ou malonil-CoA as moléculas precursoras; e a via das **fenoloxidasas** ou **laccases**, com formação das melaninas derivadas da L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) ou levodopa. Neste caso a L-DOPA é um precursor exógeno e sofre oxidação catalisada pela enzima fúngica laccase (52,55).

Como todas as melaninas naturais, as melaninas fúngicas apresentam estruturas em grande parte desconhecida, porque estes pigmentos são amorfos e muitas vezes são recuperados a partir de fontes naturais e intimamente associados com outros materiais celulares. Assim, o tipo de melanina que ocorre naturalmente, se derivada da oxidação por L-DOPA ou DHN, é incerto (52,56).

Os fungos podem também usar uma vasta variedade de substratos, maximizando a sua capacidade de produzir melanina. Assim, outras catecolaminas podem servir de substratos como a dopamina, um neurotransmissor monoaminérgico, produzido pela decarboxilação da dihidroxifenilalanina (DOPA), a norepinefrina, a epinefrina e a D-DOPA (D-3,4-dihidroxifenilalanina) ou dextrodopa. Também podem ser citadas algumas substâncias derivadas de plantas como flavonóides e ácido cafeico ou derivadas do metabolismo de bactérias como o ácido homogentísico (55). Em, 2008, Urán e colaboradores mostraram que leveduras de *P. brasiliensis* sintetizam melanina *in vitro* utilizando dois substratos diferentes, L-DOPA e L-epinefrina (57).

As melaninas podem ser encontradas nas camadas interiores ou exteriores da parede celular fúngica, dependendo da espécie. Por exemplo, em *Cryptococcus neoformans* a melanina é encontrada na camada mais interna da parede celular, perto da membrana. Em *Candida albicans*, a melanina pode ser encontrada na camada mais externa e no fungo filamentoso patógeno de planta *Gaeumannomyces graminis* está no meio da parede celular (55,58).

Em mamíferos, as melaninas são sintetizadas em células especializadas denominadas melanócitos, dentro de organelas semelhantes aos lisossomos, os melanossomas. Evidências recentes sustentam a hipótese de que melanossomas fúngicos também existem. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células de *Fonsecaea pedrosoi* mostraram organelas internas com matrizes fibrilares semelhantes aos melanossomas de mamíferos, o que também foi observado em *Candida albicans*, *Cladosporium carrionii* e *Hormoconis resina* (55,59,60).

A produção de melaninas pelos fungos constitui um fator de virulência de grande importância, pois confere a capacidade de proteção contra agressões geradas pelo sistema imune do hospedeiro. Assim, as melaninas são moléculas imunologicamente ativas que podem: 1) ativar o sistema do complemento; 2) conferir resistência contra fagocitose, interferindo na capacidade de *burst* oxidativo dos macrófagos, na produção de óxido nítrico, na fagocitose do fungo e até mesmo, inibindo a apoptose de macrófagos após a fagocitose de células melanizadas; 3) atuar na modulação de citocinas, alterando ou até mesmo inibindo sua produção; 4) gerar uma resposta efetiva de anticorpos; 5) podem contribuir de forma importante na invasão tecidual de plantas (52,53,55,61,62).

As melaninas também conferem proteção contra agressões ambientais, como por exemplo, proteção contra as alterações de osmolaridade e temperatura do meio, contra agentes oxidantes, pois são quelantes com alta afinidade por metais e radicais livres, contra a ingestão por amebas e nematodos presentes no ambiente, contra radiações, inclusive UV (52–54,62).

Uma evidência clássica da proteção contra radiação foi mostrada por Zhdanova (2000), com a detecção do crescimento extensivo de fungos nas paredes e outras estruturas das partes internas da usina nuclear de Chernobyl, danificada após acidente catastrófico em 1986. A comparação das espécies que crescem sob a contaminação radioativa revelou uma dominância de espécies contendo melanina, principalmente nos locais altamente contaminados (63).

Muitos estudos mostraram que fungos melanizados são mais resistentes à terapia antifúngica em comparação com fungos não melanizados. O aumento da resistência às drogas por células melanizadas pode ser atribuído à capacidade de ligação das drogas à melanina, constituindo um sério problema no tratamento das doenças fúngicas (53,55). Entre tantos exemplos disponíveis na literatura, pode ser citado um estudo realizado por Duin e colaboradores (2002), mostrando que células

melanizadas de *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* são menos susceptíveis ao tratamento com anfotericina B e caspofungina. No caso desses dois fungos, é confirmada a melanização em tecidos de mamíferos durante o processo infeccioso. Duin (2002) também sugere que drogas que inibem a melanização poderiam agir sinergicamente com anfotericina B e caspofungina no tratamento dessas micoses (64).

### **1.9 Lacase fúngica**

As lacases fazem parte de um grupo de enzimas denominadas fenoloxidasas, juntamente com as catecol-oxidases ou tirosinases, que catalisam a oxidação de uma grande variedade de compostos fenólicos e aminas aromáticas, utilizando oxigênio molecular como aceptor de elétrons. São amplamente distribuídas na natureza, sendo produzidas por uma grande variedade de plantas, fungos, bactérias e insetos. São caracterizadas por conter quatro átomos de cobre no sítio catalítico (65,66).

Foram descobertas pela primeira vez na seiva da árvore de laca japonesa, *Rhus vernicifera*. Desde então, várias isoformas foram encontrados em vários basidiomicetos e ascomicetos, e são descritas como proeminentes fatores de virulência, muitos estudos apontam para o aumento de sua expressão em resposta aos mecanismos de defesa do hospedeiro (67).

As lacases fúngicas apresentam potencial redox superior às laccases bacterianas ou vegetais, e constituem o mais comum componente do sistema lignolítico dos fungos, com funções de extrema relevância na natureza. Deste modo, as lacases fúngicas estão envolvidas na degradação da lenhina ou lignina, que é uma molécula orgânica, amorfa, associada com a celulose na parede celular de plantas; na remoção de compostos fenólicos potencialmente tóxicos que surgem durante a degradação de lignina; e na produção de radicais livres do oxigênio, sugerindo novas utilizações desta enzima em processos degradativos, com importantes aplicações em biotecnologia e indústria, abrangendo diversos segmentos, como têxtil, de papel e celulose, alimentícia e processos de biorremediação (65,68).

### 1.10 Melanina e *Paracoccidioides*

Gomez e colaboradores (2001) documentaram, pela primeira vez, o processo de melanização de *P. brasiliensis* em conídios e leveduras. Detectaram a presença de uma enzima com atividade semelhante à lacase em extratos proteicos de *P. brasiliensis*. Observaram a melanização de leveduras em tecidos de camundongos infectados, utilizando anticorpos monoclonais contra melanina de *C. neoformans*, e isolaram *ghosts* de melanina destes tecidos infectados, evidenciando que conídios e leveduras de *P. brasiliensis* podem produzir melanina ou compostos similares com a melanina *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo foi observado também que micélios e conídios produzem melanina quando cultivados *in vitro*, em meio mínimo e na ausência de compostos fenólicos, sugerindo que a melanização pode ocorrer naturalmente na natureza (69).

Da Silva et al. (2006) mostraram que células melanizadas de *P. brasiliensis* isolado Pb18 são mais resistentes ao ataque por macrófagos alveolares e peritoneais, e são menos susceptíveis a drogas antifúngicas, em especial a anfotericina B (70). Em 2009, Da Silva e colaboradores observaram, em modelo murino experimental, maior aumento da carga fúngica em infecções com células melanizadas de Pb18 quando comparada com infecções por células não melanizadas. Além disso, as células melanizadas foram mais resistentes ao ataque de produtos químicos gerados pelos macrófagos, como as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, confirmando, assim, que células melanizadas apresentam maior resistência à fagocitose (71).

Em 2011, Urán et al., desenvolveram, pela primeira vez, anticorpos monoclonais contra melanina de *P. brasiliensis*, identificando 5 imunoglobulinas G1 (IgG1), até então as primeiras imunoglobulinas G anti-melaninas reportadas, e 4 imunoglobulinas M (IgM). Os nove anticorpos monoclonais reconheceram melanina em células de *P. brasiliensis*, cultivadas *in vitro*, na presença de L-DOPA e em células de tecido de pulmão infectado. Também apresentaram reação cruzada com partículas purificadas de melanina-like de outros fungos e de melanina comercial, como a melanina de *Sepia officinalis*. Amostras de pacientes e camundongos infectados com PCM foram analisadas e anticorpos IgG anti-melanina foram detectados em soros e lavados bronco-alveolares, através da técnica de ELISA

(*enzyme-linked immunosorbent assay*). Assim, esses resultados mostraram que a melanina de *P. brasiliensis* é uma estrutura imunologicamente ativa que induz uma forte resposta humoral IgG, tanto em humanos como em camundongos, e fortalece as evidências de que ocorre melanização durante a PCM (72).

Em 2015, Baltazar et al., mostraram que a produção de melanina por células de leveduras de *P. brasiliensis* possui função protetora durante tratamento por inibição fotodinâmica antimicrobiana (aPI), usando azul de toluidina (TBO) como fotossensibilizador e um díodo emissor de luz (LED) de 630 nm, junto ao tratamento com drogas antifúngicas como o itraconazol e a anfotericina B. A terapia de inibição fotodinâmica induz a produção de produtos biológicos prejudiciais para o agente patogênico, como espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, causando a morte celular e, conseqüente eliminação do patógeno. Os resultados sugeriram que a melanina se liga às drogas, alterando sua atividade antifúngica, e também atua como um eliminador de espécies reativas de oxigênio e do óxido nítrico, corroborando com resultados observados por Da Silva et al. (2009) (73).

Os estudos destacados demonstram que *P. brasiliensis* é capaz de sintetizar melanina *in vitro* e *in vivo*, e corroboram com demais estudos na importância da melanina como fator de virulência. Assim, a produção de melanina por vários fungos interfere no mecanismo da patogênese, como ocorre na paracoccidioidomicose.

## 2 JUSTIFICATIVA

Estudos sobre a ação da melanina nos mecanismos de defesa do sistema imunológico são fundamentais para ampliar e aprofundar os conhecimentos sobre a PCM e, também, elucidar os mecanismos de evasão do sistema imune pelo fungo. Em trabalhos anteriores, realizados em nosso laboratório, foi documentada a capacidade de melanização por leveduras de *P. brasiliensis* Pb18 e seus efeitos no processo de fagocitose *in vitro* (70,71). Assim, o presente projeto visou avaliar e documentar a produção de melanina pelos isolados de *P. lutzii*. Também foram estudados os efeitos da melanina *in vitro*, avaliando seus efeitos no processo de fagocitose e *in vivo*, durante infecção em modelo experimental.

### 3 OBJETIVOS

1. Documentar a capacidade de melanização *in vitro* das leveduras de *P. lutzii*, isolados Pb01, ED01, Pb8334, Pb66 e Pb1578.
2. Detectar a presença de melanina através da imuno-microscopia de fluorescência, utilizando anticorpos monoclonais anti-melanina de *P. brasiliensis* (8C3) e *C. neoformans* (6D2).
3. Avaliar a atividade de lacase nos diferentes isolados de *P. lutzii* estudados.
4. Analisar o perfil proteico dos isolados Pb01, Pb18 e Pb60855 por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).
5. Avaliar os perfis enzimáticos, das fases de bolor e de leveduras dos isolados Pb01, Pb18 e Pb60855, pelo sistema API<sup>®</sup>ZYM (BIOMÉRIEUX).
6. Verificar o envolvimento da melanina no processo da fagocitose em cultura de macrófagos peritoneais ativados com IFN- $\gamma$ , utilizando leveduras dos isolados Pb01, Pb18 e Pb60855 melanizadas e não melanizadas.
7. Avaliar a carga fúngica em camundongos BALB/c infectados com leveduras melanizadas e não-melanizadas de *P. lutzii* (Pb01) comparativamente com isolados de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb60855).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Meios de culturas utilizados

- Meio sólido quimicamente definido Mcveigh-Morton (McVM) modificado por Restrepo e Jiménez (1980) (74), contendo: glicose (10 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5 g/L) (Merck, Frankfurter, Darmstadt, Alemanha),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L) (Merck),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,15 g/L) (Sigma-Aldrich),  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  (2 g/L) (Merck), L-asparagina (2g/L) (Sigma-Aldrich), L-cistina (2 g/L) (Sigma-Aldrich), suplemento de vitaminas (10 mL/L) e suplemento contendo elementos traços (1 mL/L).

Suplemento de vitaminas, em 100 mL de solução: tiamina (6,0 mg), niacina (6,0 mg), pantotenato de cálcio (6,0 mg), inositol (1,0 mg), biotina (1,0 mg), riboflavina (1,0 mg), ácido fólico (10,0 mg), choline (10,0 mg), pirodoxina (10,0 mg).

Suplemento contendo elementos traços, em 100 mL de solução:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (5,7 mg) (Sigma-Aldrich),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (15,7 mg) (Sigma-Aldrich),  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (140,4 mg) (Sigma-Aldrich),  $\text{MnSO}_4 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$  (8,1 mg) (Sigma-Aldrich),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (3,6 mg) (Sigma-Aldrich),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (79,2 mg) (Sigma-Aldrich).

O meio foi suplementado com Ágar-ágar 1,5% (BD Difco™, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) quando foi necessário. O pH foi ajustado para 5,5 ou 7,0 dependendo do experimento realizado. Foi suplementado com 1 mM de L-DOPA (Sigma-Aldrich) ou com 0,8 mg/mL de L-Epinefrina (Sigma-Aldrich) para melanização dos isolados estudados.

- Ágar BHI (BD Difco™), suplementado com L-asparagina (0,14%) e tiamina (0,01%).
- Ágar Sabouraud Dextrose (BD Difco™).

## 4.2 Isolados utilizados

Os isolados de *P. brasiliensis*, *P. lutzii* e os isolados de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* estão descritos na Tabela 1, e foram obtidos da micoteca do Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo.

**Tabela 1** - Isolados utilizados

Gênero e espécie	Nome(s) do(s) isolado(s)	Principais características
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<b>Pb60855 (ATCC60855)</b>	Isolado do grupo filogenético PS3. É um isolado colombiano, conhecido pela sua produção de conídios, usado em modelos de fibrose pulmonar experimental.
	<b>Pb18</b>	Isolado do grupo filogenético S1, amplamente utilizado em modelos experimentais em estudos imunológicos, conhecido como o isolado de maior virulência.
	<b>Pb cão</b>	Isolado de amostra clínica de cão, pertencente ao grupo filogenético PS2.
	<b>Pb339</b>	Isolado do grupo filogenético S1, apresenta elevada expressão e secreção de gp43, antígeno imunodominante e molécula muito utilizada em diagnóstico.
<i>Paracoccidioides lutzii</i>	<b>Pb01</b>	O primeiro dos isolados de <i>P. lutzii</i> a ser estudado, também usado na produção de antígenos para diagnóstico em zonas endêmicas.
	<b>Pb66</b>	Isolado ' <i>Pb01-like</i> '.
	<b>ED01</b>	Isolado ' <i>Pb01-like</i> '.
	<b>Pb1578</b>	Isolado ' <i>Pb01-like</i> '.
	<b>Pb8334</b>	Isolado ' <i>Pb01-like</i> '.
<i>Candida albicans</i>	<b>Ca 12A</b>	Isolado clínico. Utilizado como controle negativo nos testes de Lacase. Não produtor de melanina, conforme observado por Da Silva et. al. (2006) (69).
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<b>Cn ATCC 28957</b>	Utilizado como controle positivo nos testes de Lacase.

### 4.3 Cultivo das leveduras de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

As leveduras de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* foram cultivadas em Ágar BHI (BD Difco™), suplementado com asparagina e tiamina, por 7 dias, a 37 °C, e transferidas para o meio sólido quimicamente definido Mcveigh-Morton (McVM) modificado por Restrepo e Jiménez (1980) (74), incubados por 7 dias, a 37 °C. Em seguida, foram transferidas para o meio líquido quimicamente definido (McVM), também elaborado conforme Restrepo e Jiménez (1980) (pH 5,5), na presença ou na ausência de 1,0 mM de L-DOPA (L-3,4 – dihidroxifenilalanina), por 15 dias, a 37 °C , sob agitação constante (150 RPM). As culturas foram protegidas da luz, para prevenir a fotopolimerização da L-DOPA. Os isolados Pb18 e Pb60855 foram utilizados como controles positivos, uma vez que o perfil de melanização desses isolados já foi descrito em estudos anteriores.

### 4.4 Cultivo do bolor de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

A fase de bolor dos isolados foi mantida em meio sólido McVM, a temperatura de 18 °C e umidade de 68%.

### 4.5 Curvas de crescimentos

Foram realizadas para isolados de *P. lutzii* conforme descrito em Úran et al. (2008) (57).  $1,5 \times 10^6$  unidades micóticas/mL dos isolados Pb01, ED01 e Pb66 foram inoculadas em meio líquido McVM (pH 5,0), na ausência e na presença de L-DOPA nas concentrações de 0,1 mM e 1,0 mM. Frações, de cada cultivo, dos dias 3, 6, 9, 12 e 15 foram coletadas e avaliadas quanto ao perfil de crescimento e melanização, através da determinação do número de células melanizadas e não melanizadas por visualização e contagem por microscopia óptica, em câmara de Neubauer.

#### 4.6 Determinação da viabilidade das leveduras

A viabilidade das leveduras foi determinada através do corante azul de *Trypan Blue Stain* 0.4% (Sigma-Aldrich), por microscopia óptica.

#### 4.7 Ensaio de fluorescência

A técnica foi realizada como descrito em Youngchim et al., 2004 (74). Brevemente, leveduras cultivadas na presença de 1,0 mM de L-DOPA ou 0,8 mg/mL de L-Epinefrina, por 10 dias, a 37 °C , sob agitação de 150 RPM, foram fixadas em lâmina de vidro por citocentrifugação e bloqueadas *overnight* com solução de bloqueio BSA (Soro Albumina Bovina) 5% em PBS, a 4 °C. Anticorpos monoclonais (MAbs) foram diluídos em PBS, aplicados e incubados por 1 hora, a 37 °C . Após lavagens com PBS, foram aplicados os anticorpos secundários e incubados por 1 hora a 37 °C . Após lavagens, foram aplicados 2 µL de glicerol diluído em PBS na proporção 1:1, e após serem recobertas com lamínulas, as amostras foram analisadas em microscópio de imunofluorescência EVOS FL – AMG. Foram utilizados anticorpos monoclonais (Mab) contra melanina de *Paracoccidioides brasiliensis* (Mab 8C3) e contra melanina de *Cryptococcus neoformans* (Mab 6D2) (72). Os anticorpos anti-imunoglobulinas Alexa Fluor® 488 *goat anti-mouse* IgM e IgG (Life Technologies) foram utilizados como anticorpos secundários, sendo anti-IgG, quando utilizado Mab8C3, e anti-IgM, quando utilizado Mab6D2.

#### 4.8 Análise colorimétrica da atividade de lacase

A análise colorimétrica da atividade de lacase foi realizada conforme o protocolo descrito em Da Silva et al. (70) com algumas modificações. As células leveduriformes foram inicialmente cultivadas em meio BHI líquido (BD Difco™) a 37 °C . Após 7 dias de crescimento, foram lavadas três vezes com PBS e ressuspensas em meio McVM líquido com glicose. As leveduras foram incubadas por 48 horas, a 37 °C sob agitação constante de 150 RPM. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com meio McVM líquido sem glicose, ressuspensas

neste mesmo meio e incubadas por 48 horas adicionais, nas mesmas condições citadas acima. Finalizado o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e o número de células foi ajustado para  $10^8$  células/mL para cada isolado, através da contagem em câmara de Neubauer, e esta suspensão foi centrifugada, o sobrenadante desprezado e sobre os pellets obtidos foram acrescentados 900 µl de tampão acetato de sódio a 0,1M e pH 5,0, em seguida foram adicionados 100 µl de uma solução tampão acetato de sódio contendo 10 mM de ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)] (Sigma-Aldrich). As células de cada isolado na presença de ABTS foram incubadas por 2 horas, nas mesmas condições citadas. Na etapa final, as células foram centrifugadas e foi realizada a leitura do sobrenadante a 420 nm em espectrofotômetro.

#### **4.9 Análise do perfil proteico**

Os isolados de *P. lutzii* (Pb01) e *P. brasiliensis* (Pb18, Pb60855 e Pb339) foram cultivados em meio McVM, sob agitação de 150 RPM, a 37 °C, por 7 dias. Após o tempo de crescimento, o sobrenadante foi separado da massa celular por centrifugação a 2500 RPM por 30 minutos. Os sobrenadantes livres de células ou exoantígenos foram filtrados em membrana de 0,25 µm e concentrados por liofilização. O teor de proteínas do liofilizado foi determinado pelo método de Bradford e o conteúdo proteico foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida-duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12%, aplicando-se no gel 20 µg do conteúdo de cada sobrenadante (diluídos em tampão Tris-HCl, com 2% de SDS e 2,5% de mercaptoetanol, pH6,5). Os géis foram submetidos a uma voltagem de 100 mV por 2 h, e posteriormente foram corados com solução de AgNO<sub>3</sub>. Os padrões de massa molecular utilizados foram: SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range (BIO-RAD, EUA) e Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare, EUA). O mesmo foi realizado para a massa celular após sonicação.

#### **4.10 Análise de atividades enzimáticas através do teste de API<sup>®</sup>ZYM (BIOMÉRIEUX)**

Inicialmente as culturas foram realizadas a partir de 1 grama de inóculo (massa fúngica) em 150 mL de meio McVM, pH 7,0. As culturas de bolor foram incubadas por 15 dias a 18 °C e 150 RPM, e as culturas de leveduras por 7 dias a 37 °C e 150 RPM. Os sobrenadantes foram preparados após centrifugação (2500 RPM por 30 minutos) e filtrados em membrana de 0.25 µm.

Os exoantígenos, tanto da fase de bolor quanto de levedura, de *P. lutzii* (Pb01) e *P. brasiliensis* (Pb18, Pb60855) foram analisados quanto à produção de algumas enzimas relacionadas ao metabolismo de macromoléculas (carboidratos, lipídeos e proteínas). Essa determinação foi feita através do teste comercial API<sup>®</sup>ZYM (25 200 BioMérieux), um método de determinação colorimétrico e semi-quantitativo de atividade enzimática. O kit consiste em uma régua contendo 19 micropoços impregnados com substratos específicos para determinação das seguintes enzimas: Fosfatase alcalina, Esterase (C4), Esterase lipase (C8), Lipase (C14), Leucina arilamidase, Valina arilamidase, Cistine arilamidase, Tripsina, Quimotripsina, Fosfatase acida, Naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α-galactosidase, β-galactosidase, β-glucuronidase, α-glucosidase, β-glucosidase, N-acetil-β-glucosaminidase, α-manosidase, α-fucosidase. Uma cúpula adicional sem quaisquer substratos é incluído na régua e serve como controle negativo. Os exoantígenos ou o meio McVM (controle negativo) foram aplicados nos micropoços e incubados à 37 °C em câmara úmida por 4 horas. Os resultados foram lidos de acordo com as instruções fornecidas na bula pelo fabricante, observando três diferentes intensidades na formação de cor, que estão diretamente relacionados à quantidade de enzima. Isto é, quanto maior a intensidade da cor, maior a quantidade de enzima presente.

#### **4.11 Ensaio de fagocitose**

Macrófagos peritoneais de camundongos machos C57BL/6, de 8 semanas, foram obtidos por lavagem peritoneal realizada com 10 mL de NaCl 0,9%. Os macrófagos foram contados em câmara de Neubauer, ajustados a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino

(SFB). 0,5 mL desta suspensão foram transferidas para placas de cultura celular de 24 poços. As células foram incubadas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas para permitir a aderência dos macrófagos na placa. Em seguida, o meio foi trocado por meio fresco com adição de IFN- $\gamma$ , 40 ng/mL, (BD-Pharmingen) para promover a ativação dos macrófagos. A incubação foi realizada por 16 horas, a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, os macrófagos foram infectados, com leveduras dos isolados Pb01, Pb60855 e Pb18 melanizados e não melanizados em uma proporção de macrófago:levedura 10:1 (4 x 10<sup>4</sup> leveduras por poço). As leveduras foram previamente marcadas com 100  $\mu$ g/mL de FITC durante 1 h, a 4 °C, lavadas 2 vezes com NaCl 0,9% e ressuspensas em meio RPMI com 10% de SFB. A interação macrófago:levedura foi realizada a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 horas. Após incubação, os macrófagos foram gentilmente lavados duas vezes com PBS, e as células aderidas na placa foram desaderidas após exposição ao gelo, utilizando meio frio fresco e um raspador de células de borracha. As células foram transferidas para tubos, centrifugadas durante 10 min, 400 x g, 4 °C, e os pellets foram marcados com anticorpo monoclonal anti-F4/80 - *anti-mouse* F4/80 Antigen APC (eBioscience, San Diego, CA, USA), durante 30 min a 4 °C. Após marcação, as células foram lavadas duas vezes em PBS, suspensas em 200  $\mu$ L de PBS acrescido de 1% de soro fetal bovino (FBS) e analisadas imediatamente em citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). Os dados foram analisados utilizando o programa de software FlowJo (Árvore Star, Ashland, OR, EUA). O procedimento descrito acima foi realizado em duplicata e com leveduras sem tratamento, tratadas previamente com fatores do complemento (Leveduras + C') e tratadas com soro inativado (Leveduras + SI).

Para a distinção entre leveduras internalizadas e ligadas à superfície (leveduras de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* marcadas com FITC), foi utilizado azul de trypan (TB) (*Trypan Blue*, 250  $\mu$ g/mL, Sigma Aldrich) para extinguir a fluorescência verde da superfície dos macrófagos. A técnica de TB foi realizada como descrito por Busetto e colaboradores, em 2004, com pequenas modificações (75). Os ensaios de fagocitose foram realizadas como descrito acima e as células aderentes/ingeridas foram medidas usando os canais FL1 e FL4 do citômetro FACSCalibur. As suspensões de células foram então tratadas num banho de gelo com 0,1 mL de uma solução preparada de TB em tampão citrato 0,1 M, pH 4,0, reduzindo dessa forma o pH das amostras e otimizando o efeito de extinção de fluorescência pelo TB. Após 1

min de incubação em banho de gelo, as amostras foram novamente analisadas. Macrófagos marcados com anticorpo monoclonal anti-F4/80 foram fechados, e os canais de FL1 e FL3 usados para discriminar leveduras ingeridas (fluorescência verde, FL1) de aderentes (fluorescência vermelha, FL3).

#### **4.12 Ensaio in vivo: avaliação da carga fúngica em camundongos BALB/c infectados com leveduras melanizadas e não-melanizadas**

##### 4.12.1 Infecção intratraqueal (i.t.)

O inóculo contendo  $2 \times 10^6$  leveduras/50 $\mu$ l/animal foi obtido com as leveduras de Pb01, Pb60855 e Pb18 crescidas na ausência (leveduras não melanizadas) e na presença de L-DOPA 1 mM (leveduras melanizadas), durante 10 dias a 37 °C , sob agitação 150 RPM. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada com o corante azul de *Trypan*. Todos os procedimentos para a infecção intratraqueal foram realizados com os animais (camundongos BALB/c) devidamente anestesiados com uma solução contendo 80 mg/kg de ketamina (União Química, Brasil) e 10 mg/kg de xilazina (União Química, Brasil). Quando os animais apresentaram-se insensíveis à dor, uma pequena incisão longitudinal na pele do pescoço foi realizada, e a traqueia foi exposta, e, com o auxílio de uma seringa de 1 mL, a suspensão de leveduras foi injetada. Imediatamente após a infecção, a incisão foi suturada e os camundongos foram mantidos aquecidos até acordarem da anestesia. Os camundongos foram mantidos por um período de 3 semanas até o sacrifício, que foi realizado através do deslocamento cervical após serem anestesiados. Os animais foram criados em condições SPF (*Specific Pathogen Free*), no biotério de camundongos isogênicos do Instituto de Pesquisas Nucleares (IPEN), e mantidos no biotério de animais de experimentação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo.

#### 4.12.2 Avaliação da carga fúngica no pulmão - UFC (Unidades Formadoras de Colônias)

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, os pulmões foram extirpados e pesados imediatamente. Com o auxílio de um homogeneizador manual, as células foram rompidas por maceração em 1 mL de PBS. A suspensão extraída dos pulmões (volume de 200  $\mu$ L) foi plaqueada em meio de BHI suplementado com 4% de soro fetal bovino, 5% de sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* isolado 192 e estreptomicina/penicilina 10 IU/mL (Cultilab, Brasil). As placas foram mantidas a 37 °C por um período de 15 dias. O número de colônias foi determinado e os resultados expressos em UFC por grama de tecido.

#### 4.13 Análise estatística

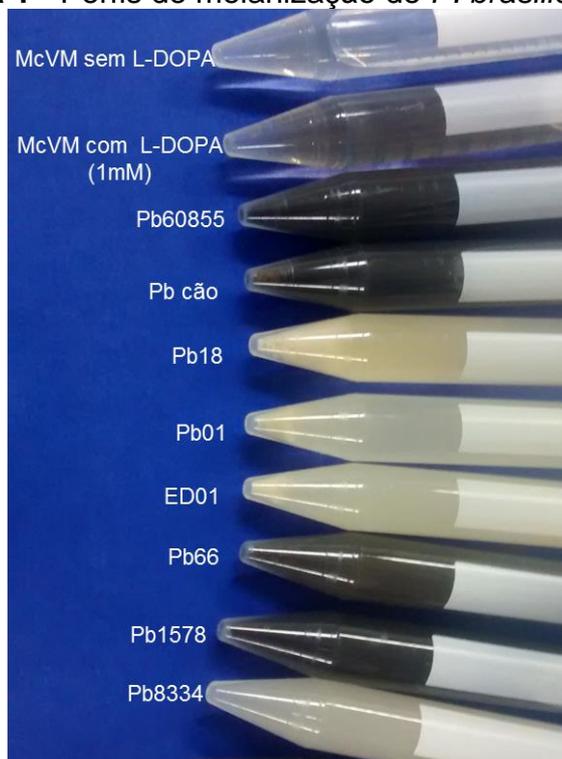
As análises quantitativas foram avaliadas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA) e a análise de variância (ANOVA) foi realizada seguida do pós-teste de Tukey. O resultado foi considerado significativo quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinação do perfil de melanização de isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

Para avaliar o perfil de melanização, foi realizado o cultivo dos isolados propostos (*P. brasiliensis* isolados Pb60855, Pb18 e Pb cão, e *P. lutzii* isolados Pb01, ED01, Pb66, Pb1578 e Pb8334) em meio contendo L-DOPA a 1 mM, a 37 °C , sob agitação de 150 RPM, por 15 dias (Figura 1).

**Figura 1** - Perfis de melanização de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.



Culturas observadas após cultivo em meio líquido McVM com L-DOPA a 1 mM, 37 °C , 150 RPM, por 15 dias. Controle de autopolimerização contendo apenas o meio McVM com L-DOPA a 1 mM.

A figura 1 mostra que os isolados de *P. lutzii* (Pb01, ED01, Pb66, Pb1578 e Pb8334) melanizam de formas diferenciadas entre eles e quando comparados com os isolados de *P. brasiliensis* (Pb60855, Pb18 e Pb cão).

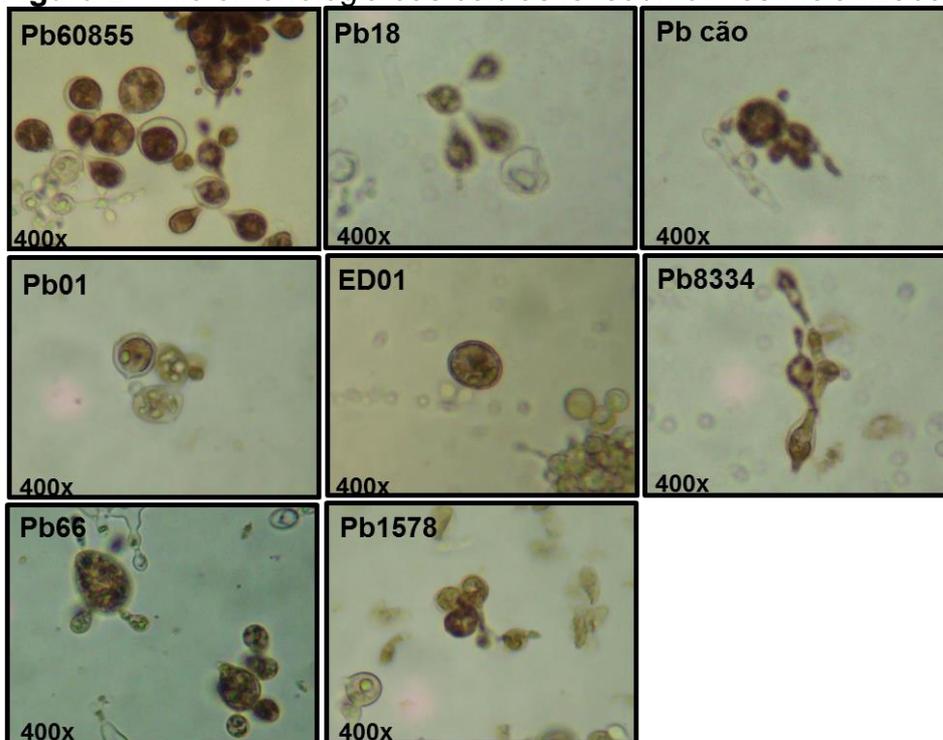
Em particular, entre os isolados de *P. lutzii*, Pb01 apresentou poucas células melanizadas. Pb66 e Pb1578 apresentaram maior número de células melanizadas e Pb8334 apresentou melanização intermediária, semelhante ao isolado ED01. Estas

observações foram confirmadas ao avaliar a micromorfologia das células, conforme descrito a seguir.

## 5.2 Micromorfologia das células leveduriformes melanizadas

Para analisar a micromorfologia das leveduras de cada isolado em estudo, estas foram cultivadas em meio McVM suplementado com 1 mM de L-DOPA, por 15 dias, a 37 °C , sob agitação de 150 RPM. Ao serem examinadas ao microscópio óptico, observou-se a produção de leveduras enegrecidas, apresentando pigmentos escurecidos localizados dentro do citoplasma e na parede celular (Figura 2).

**Figura 2** - Micromorfologia das células leveduriformes melanizadas.



Leveduras dos isolados de *P. brasiliensis* (Pb60855, Pb18 e Pb cão) e *P. lutzii* (Pb01, ED01, Pb8334, Pb66 e Pb1578), observadas em microscopia óptica, aumento de 400x.

Também foi possível observar que cada isolado avaliado melaniza de forma diferenciada quanto à proporção de células melanizadas, quando cultivado sob as mesmas condições descritas. A proporção de melanização (contagem de células melanizadas por microscopia óptica) observada para cada isolado é mostrada na tabela 2.

**Tabela 2** – Porcentagens de melanização encontradas em culturas após 15 dias de incubação.

<b>Isolados Fúngicos</b>	<b>L-Dopa 1mM</b>
<b>Pb60855</b>	85-95%
<b>Pb18</b>	40-50%
<b>Pb cão</b>	70-80%
<b>Pb01</b>	20-30%
<b>ED01</b>	30-40%
<b>Pb8334</b>	40-50%
<b>Pb66</b>	50-60%
<b>Pb1578</b>	60-70%

Células melanizadas foram contadas por microscopia óptica após serem cultivadas em meio McVM, suplementado com 1 mM de L-DOPA, temperatura de 37 °C , por 15 dias, em agitação de 150 RPM. As porcentagens foram calculadas com base na contagem de células melanizadas encontradas num total de 500 células contadas.

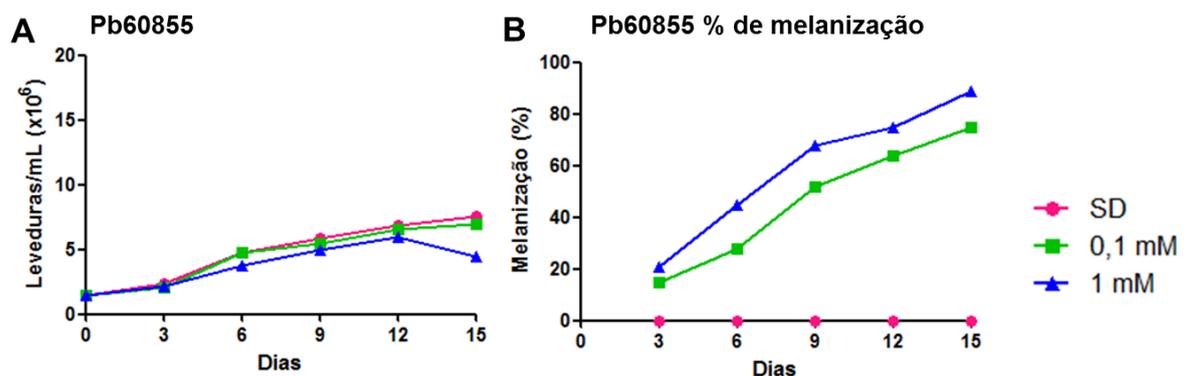
A tabela 2 mostra o intervalo de porcentagens de células melanizadas encontradas nas culturas realizadas sob as mesmas condições (meio McVM, pH 5,5, 37 °C , 150 RPM), após 15 dias de incubação. Os valores encontrados ratificam as observações feitas pelas análises do aspecto das culturas, o isolado Pb01 apresentou poucas células melanizadas e o isolado Pb60855 é o isolado que apresentou maior porcentagem de células melanizadas após 15 dias de cultivo.

### 5.3 Perfil de crescimento e melanização dos isolados de *P. lutzii* (Pb01, ED01, Pb66, Pb1578 e Pb8334) e de *P. brasiliensis* (Pb60855) em meio suplementado com 0,1mM e 1mM de L-DOPA e em meio sem L-DOPA (SD).

Com o objetivo de melhor caracterizar o perfil de melanização dos isolados de *P. lutzii* em estudo, foram realizadas curvas de crescimento em meio líquido como descrito na seção 4.5 de materiais e métodos.

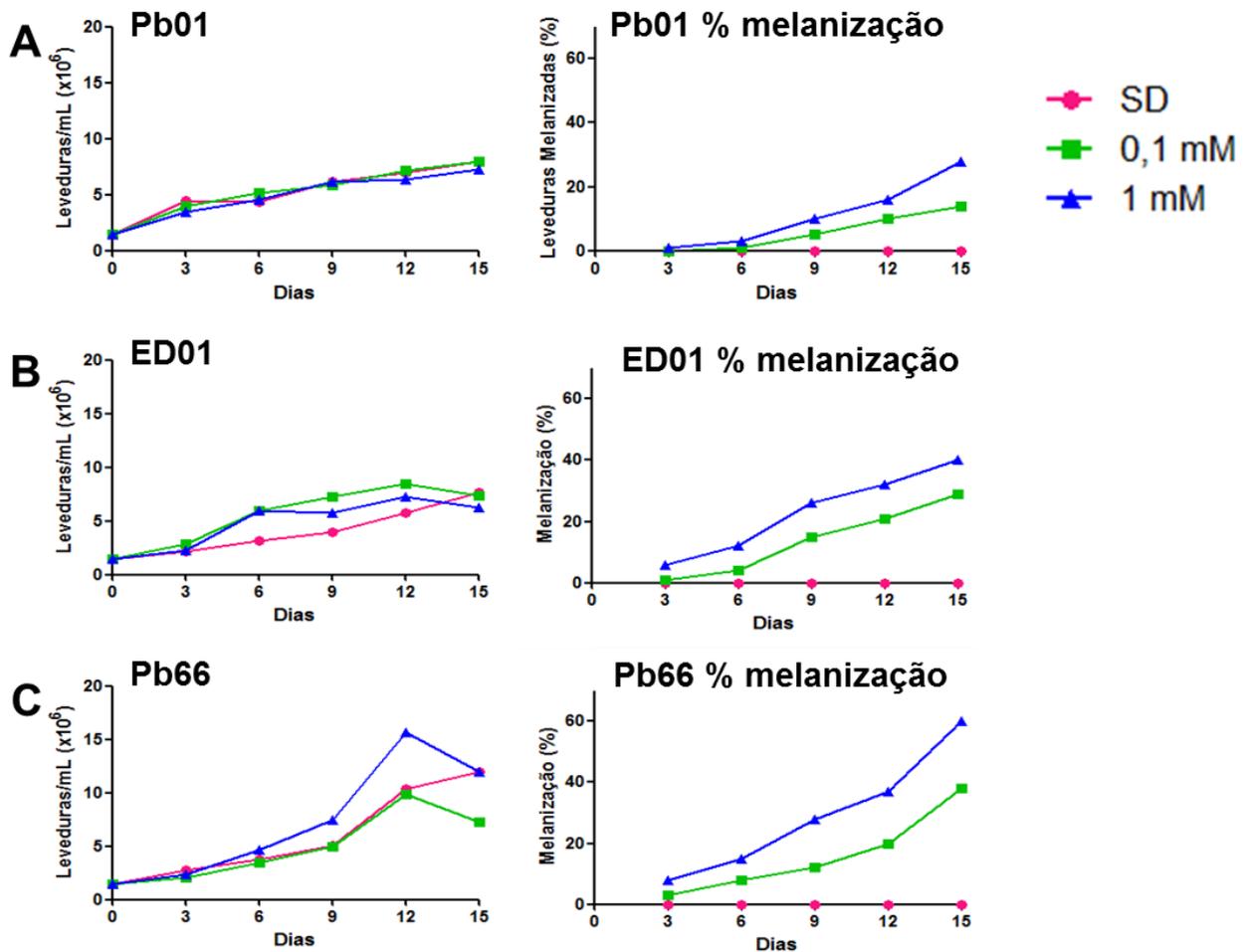
As Figuras 3 e 4 apresentam os perfis de crescimento e melanização dos isolados de *P. brasiliensis* (Pb60855) (Figura 3) e de *P. lutzii* (Pb01, ED01 e Pb66) (Figura 4).

**Figura 3** - Curvas de crescimento e melanização dos isolados de *P. brasiliensis* (Pb60855).



Leveduras do isolado de *P. brasiliensis* (Pb60855) foram cultivadas em meio McVM líquido na presença de 0,1 mM e 1 mM de L-DOPA e na ausência de L-DOPA (SD), a 37 °C , durante 15 dias. O inóculo inicial foi de  $1,5 \times 10^6$  leveduras/mL. Nos tempos indicados, foram recolhidas alíquotas e contadas em câmara de Neubauer. No painel A, estão os perfis de crescimento e no painel B, as porcentagens de melanização.

**Figura 4** - Curvas de crescimento e melanização dos isolados de *P. lutzii*.



Leveduras dos isolados de *P. lutzii* - Pb01 (A), ED01 (B) e Pb66 (C) foram cultivadas em meio McVM líquido na presença de 0,1 mM e 1 mM de L-DOPA e na ausência de L-DOPA (SD), a 37 °C, durante 15 dias. O inóculo inicial foi de  $1,5 \times 10^6$  leveduras/mL. Nos tempos indicados, foram recolhidas alíquotas e contadas em câmara de Neubauer. No painel esquerdo, estão os perfis de crescimento e no painel direito, as porcentagens de melanização.

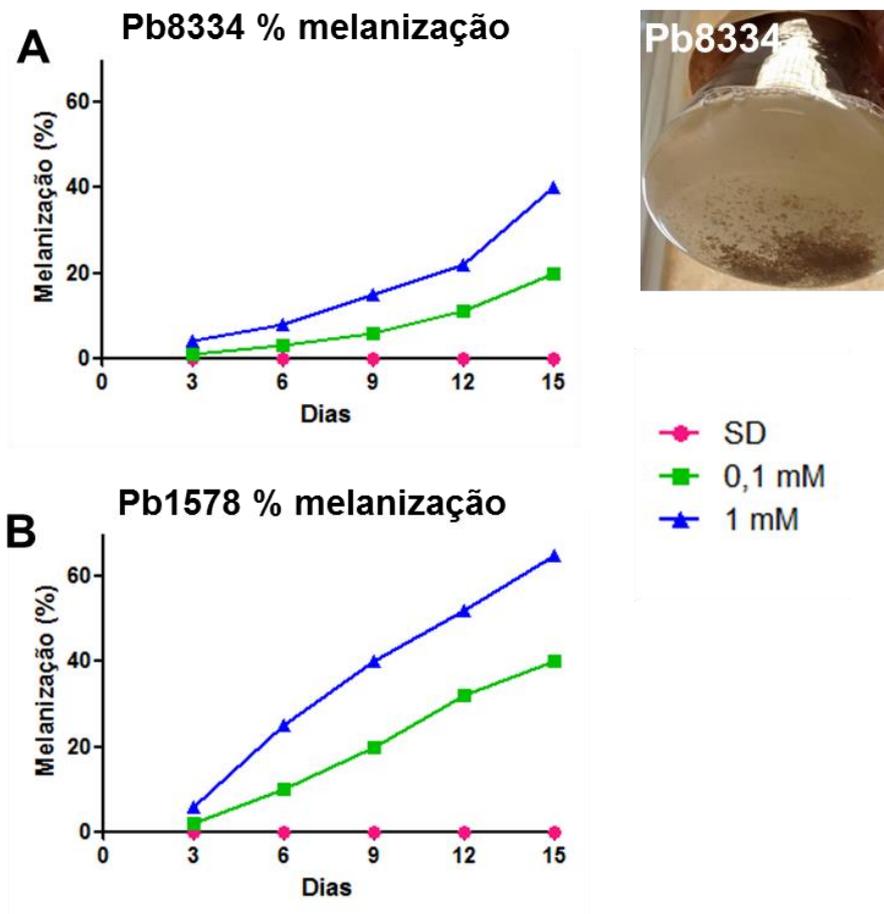
A análise das curvas de crescimento de cada isolado (Pb60855, Pb01, ED01 e Pb66) mostrou um perfil de crescimento semelhante nas três diferentes condições realizadas (meio sem L-DOPA, com 0,1 mM e 1 mM), ou seja, o crescimento das leveduras não foi prejudicado quando o meio de cultura foi suplementado com L-DOPA nas concentrações de 0,1 mM ou 1 mM. Os três isolados de *P. lutzii* também apresentaram uma capacidade de melanização diferenciada, quando feita a comparação entre estes três isolados, e inferior quando comparados ao isolado Pb60855. Também podemos observar uma quantidade maior de células melanizadas, nos três isolados, quando cultivadas com 1 mM versus 0,1 mM de L-

DOPA. Assim, com 15 dias de incubação, na presença de 1 mM de L-DOPA, foi alcançado para Pb60855 89% de células melanizadas, para Pb01 28% de melanização, para ED01 40% e Pb66 60% de células melanizadas.

O mesmo experimento foi realizado para os isolados de Pb8334 e Pb1578. Entretanto, estes dois isolados apresentam características peculiares quanto à formação de grumos, que são maiores e mais grosseiros quando comparados aos demais isolados, exigindo um procedimento de desagregação para possibilitar a execução das contagens. Assim, as curvas de crescimento para estes dois isolados mostraram valores muito diferentes dos três primeiros analisados, e também diferenças entre as condições analisadas (SD, 0,1 mM e 1 mM de L-DOPA), necessitando de uma técnica diferenciada para o acompanhamento do crescimento e visualização através de curvas.

Embora não foi possível avaliar o perfil de crescimento para os isolados Pb8334 e Pb1578, foi realizada a análise do perfil de melanização. Estes dois isolados apresentaram uma porcentagem de 40% de células melanizadas para Pb8334 e de 65% para Pb1578, quando cultivados durante 15 dias, em meio McVM com 1 mM de L-DOPA. A figura 5 mostra o perfil de melanização para os isolados Pb8334 e Pb1578 e foto da formação de grumos que pode ser observada nas culturas de Pb8334 e Pb1578.

**Figura 5** - Perfis de melanização dos isolados de *P. lutzii* Pb8334 (A) e Pb1578 (B) e foto mostrando a formação de grumos de Pb8334.

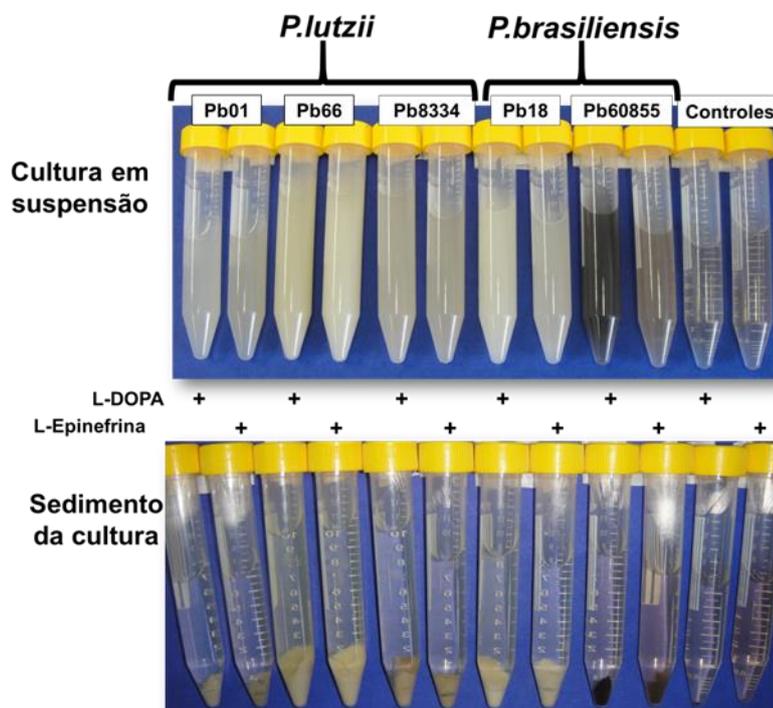


Leveduras dos isolados de *P. lutzii* Pb8334 e Pb1578 foram cultivadas em meio McVM líquido na presença de 0,1 mM e 1 mM de L-DOPA e na ausência de L-DOPA (SD), a 37 °C, durante 15 dias. O inóculo inicial foi de  $1,5 \times 10^6$  leveduras/mL. Nos tempos indicados, foram recolhidas alíquotas e contadas em câmara de Neubauer.

## 5.4 Ensaio de fluorescência

O ensaio de Imunofluorescência (IF) foi realizado com o objetivo de detectar a presença de melanina nas células fúngicas dos isolados em estudo, utilizando anticorpos monoclonais anti-melanina de *P. brasiliensis* (MAb8C3) e anti-melanina de *Cryptococcus neoformans* (MAb6D2). Inicialmente, foi realizado o cultivo de células leveduriformes dos isolados de *P. brasiliensis* (Pb60855 e Pb18) e *P. lutzii* (Pb01, Pb66 e Pb8334) em meio com 1 mM de L-DOPA e em meio com 0,8 mg/mL de L-Epinefrina, ambos precursores para a formação de melanina, a 37 °C , 150 RPM, durante 10 dias (Figura 6). O isolado *P. brasiliensis* Pb60855 foi escolhido como controle positivo para este experimento, uma vez que a melanização para este isolado está bem documentada na literatura (69). Pb18 foi o isolado utilizado para avaliação e comparação. A escolha dos isolados de *P. lutzii* foi baseada no perfil de melanização observado em culturas anteriores, assim, foram escolhidos, inicialmente, isolados com perfis diferentes de melanização (Pb01, Pb66 e Pb8334).

**Figura 6** - Culturas em presença de L-DOPA e L-Epinefrina.



Leveduras dos isolados de *P. brasiliensis* (Pb18, Pb60855) e *P. lutzii* (Pb01, Pb66 e Pb8334) foram cultivadas em meio líquido McVM, suplementado com L-DOPA 1 mM ou L-Epinefrina 0,8 mg/mL e incubadas a 37 °C , 150 RPM, por 10 dias.

As células foram contadas em Câmara de Neubauer e avaliadas quanto a viabilidade e porcentagem de células melanizadas. Foi observado 90-95% de viabilidade celular para todos os isolados. As porcentagens de melanização, encontradas após 10 dias de cultivo, estão expostas na tabela 3.

**Tabela 3** - Porcentagem de melanização dos isolados cultivados em meio com L-DOPA e L-Epinefrina, por 10 dias.

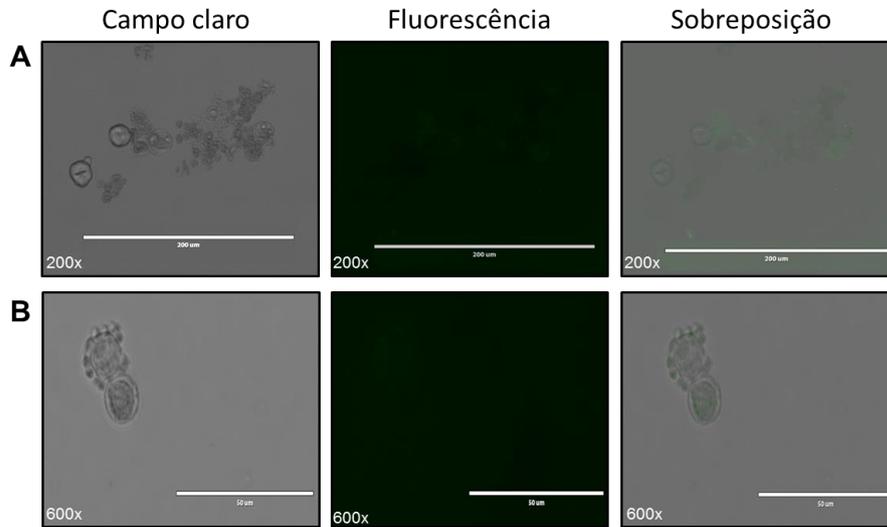
Isolados Fúngicos	L-Dopa 1mM	L-Epinefrina 0.8 mg/mL
<b>Pb60855</b>	94%	92%
<b>Pb18</b>	13%	14%
<b>Pb01</b>	17%	14%
<b>Pb66</b>	28%	29%
<b>Pb8334</b>	12%	14%

Leveduras dos isolados Pb60855, Pb18, Pb01, Pb66 e Pb8334 foram cultivadas em meio McVM, suplementado com 1 mM de L-DOPA ou com 0,8 mg/mL de L-Epinefrina, a 37 °C , por 10 dias, em agitação de 150 RPM. Foram contadas as células melanizadas de cada isolado por microscopia óptica. As porcentagens foram calculadas com base na contagem de células melanizadas encontradas num total de 500 células contadas.

Para o ensaio de IF, 200 µL da suspensão de células de cada isolado, cultivado com L-DOPA e L-Epinefrina, foram fixadas em lâminas de vidro por citocentrifugação. Anticorpos monoclonais anti-melanina de *P. brasiliensis* (**MAb8C3**) e anti-melanina de *Cryptococcus neoformans* (**MAb6D2**) (anticorpos primários) foram inoculados sobre as leveduras fixadas e incubados por 1 hora a 37 °C . Após lavagens, foram incubados anticorpos anti-imunoglobulinas (anticorpos secundários) anti-IgG, quando utilizado Mab8C3, e anti-IgM, quando utilizado Mab6D2, marcados com corante fluorescente Alexa Fluor® 488 (Life Technologies). A emissão de fluorescência foi observada em microscopia de fluorescência. As figuras expostas abaixo mostram as fotomicrografias de campo claro, canal de fluorescência (GFP) e sobreposição.

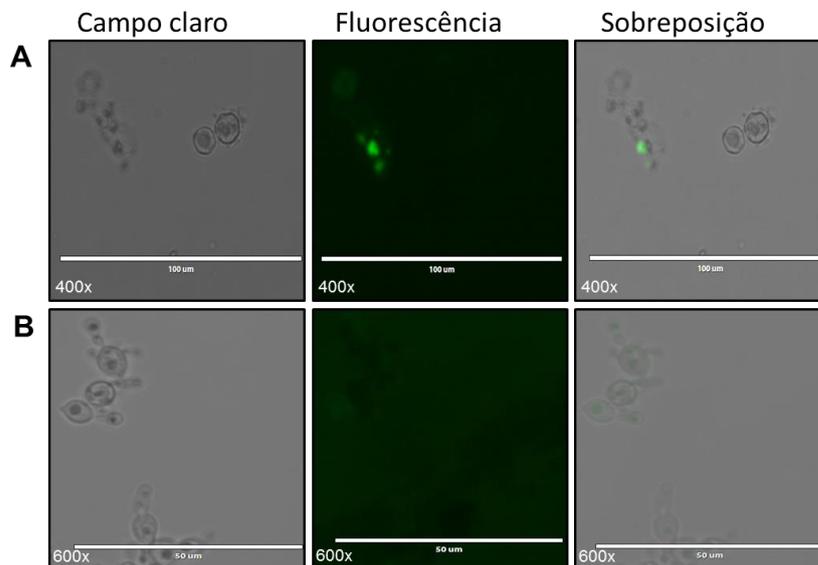
A figura 7 e 8 mostram os controles negativos utilizados nos experimentos de IF na ausência do anticorpo primário (painel A) ou na ausência de anticorpo secundário (painel B). A figura 7 apresenta células cultivadas na presença de L-DOPA e a Figura 8 células cultivadas na presença de L-Epinefrina.

**Figura 7** - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas de *P. brasiliensis* ATCC 60855 (Pb60855) crescidas em meio sintético McVM com 1 mM de L-DOPA, por 10 dias.



Em (A) leveduras marcadas somente com anticorpo secundário anti-IgG.  
Em (B) marcadas somente com anticorpo primário MAb8C3.  
As imagens foram realizadas em microscópio de fluorescência EVOS FL - AMG com aumento de 200x (A) e 600x (B).

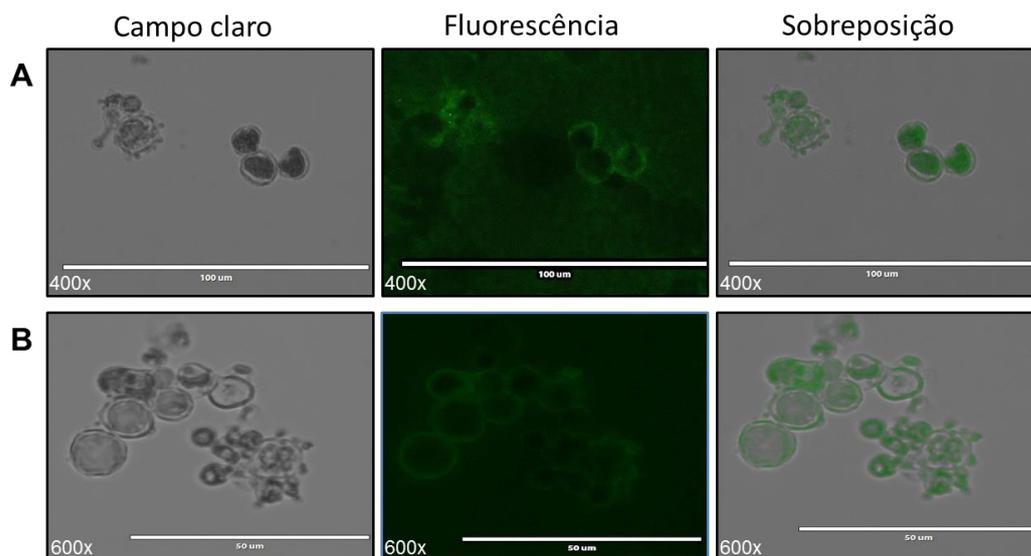
**Figura 8** - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas de *P. brasiliensis* ATCC 60855 (Pb60855) crescidas em meio sintético McVM com 0,8 mg/mL de L-Epinefrina, por 10 dias.



Em (A) leveduras marcadas somente com anticorpo secundário anti-IgM.  
Em (B) marcadas somente com anticorpo primário MAb6D2.  
As imagens foram realizadas em microscópio de fluorescência EVOS FL - AMG com aumento de 400x (A) e 600x (B).

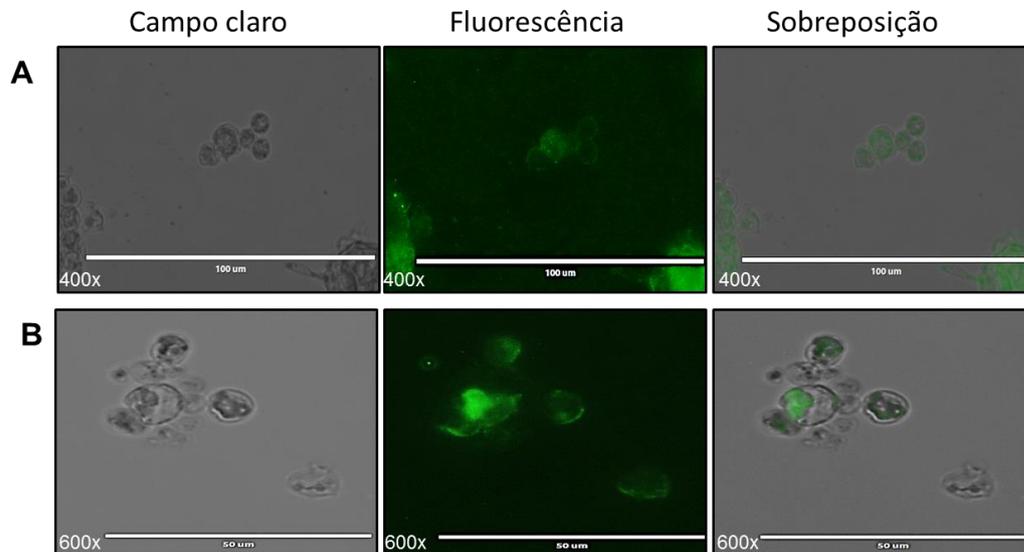
As figuras 9 e 10 mostram os controles positivos utilizados nos experimentos de IF. O isolado Pb60855 foi escolhido como controle positivo para este experimento, pois apresenta melanização bem documentada na literatura (57,72) e foi o isolado que mostrou maior porcentagem de células melanizadas na presença de ambos os precursores utilizados (L-DOPA e L-Epinefrina), nas condições de cultivo realizadas. A figura 9 apresenta células cultivadas na presença de L-DOPA e a Figura 10 células cultivadas na presença de L-Epinefrina. No painel A as leveduras foram marcadas com o anticorpo monoclonal MAb6D2 e no painel B foram marcadas com o anticorpo monoclonal MAb8C3.

**Figura 9** - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas de *P. brasiliensis* ATCC 60855 (Pb60855) crescidas em meio sintético McVM com 1 mM de L-DOPA, por 10 dias.



Melanização do isolado Pb60855. Marcação com o anticorpo monoclonal anti-melanina MAb6D2 em (A) e MAb8C3 em (B), seguido de anticorpo secundário anti-IgM (A) e anti-IgG (B) conjugado com Alexa Fluor 488. As imagens foram realizadas em microscópio de fluorescência EVOS FL - AMG com aumento de 400x (A) e 600x (B).

**Figura 10** - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas de *P. brasiliensis* ATCC 60855 (Pb60855) crescidas em meio sintético McVM com 0,8 mg/mL de L-Epinefrina, por 10 dias.

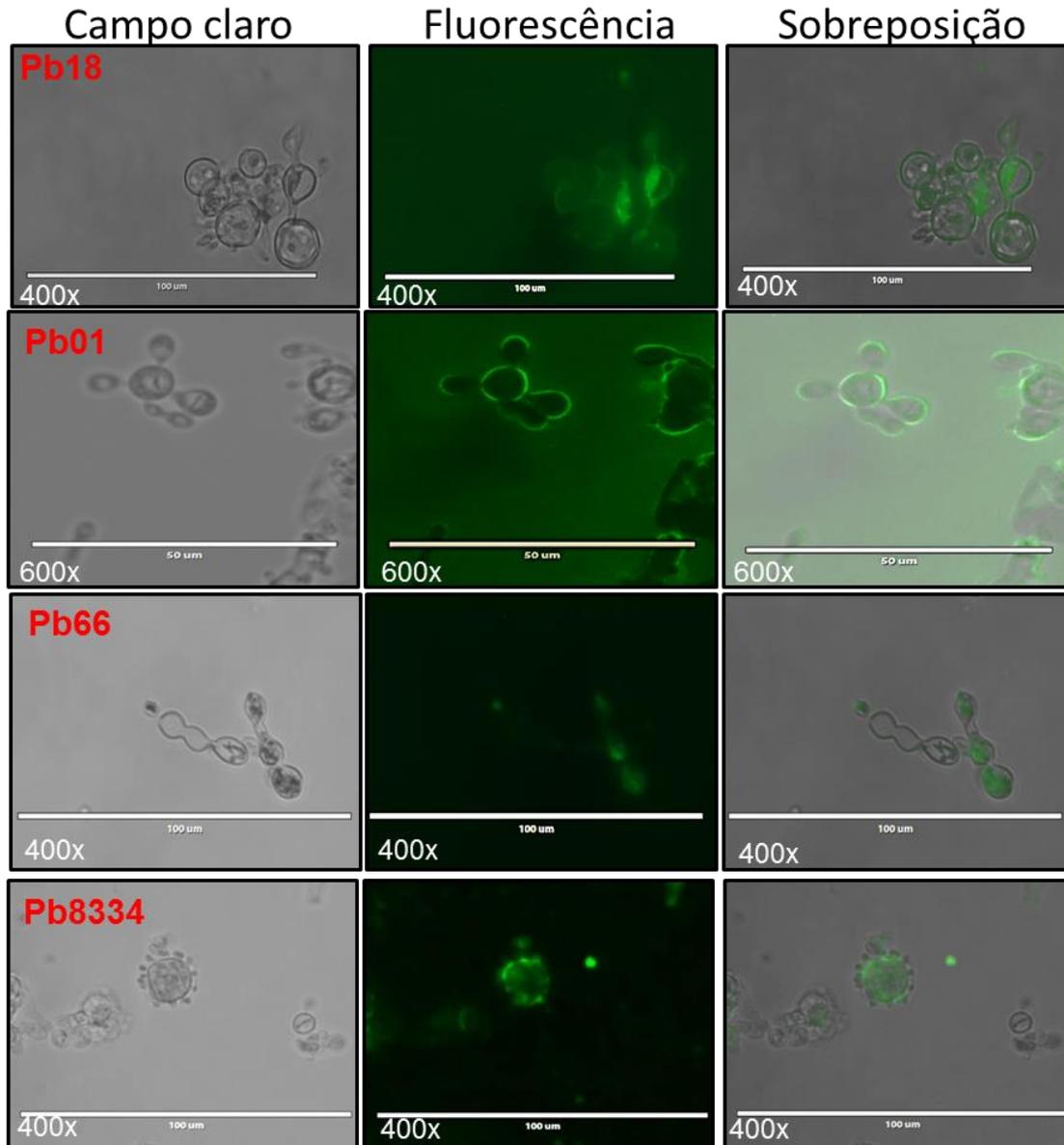


Melanização do isolado Pb60855. Marcação com o anticorpo monoclonal anti-melanina MAb6D2 em (A) e MAb8C3 em (B), seguido de anticorpo secundário anti-IgM (A) e anti-IgG (B) conjugado com Alexa Fluor 488. As imagens foram realizadas em microscópio de fluorescência EVOS FL - AMG com aumento de 400x (A) e 600x (B).

As figuras 9 e 10 mostram que as células de Pb60855 apresentam melanina e são capazes de reagir com ambos os anticorpos utilizados, evidenciando que o anticorpo contra melanina de *C. neoformans* é capaz de reconhecer a melanina de *Paracoccidioides*. Como mostrado em Urán, M.E., et al. (2011) (72), existe uma reatividade cruzada dos anticorpos monoclonais MAb8C3 e MAb6D2, o que explica a reatividade do MAb6D2 de *C. neoformans* com melanina de *Paracoccidioides* spp., sendo possível também reagir com melaninas produzidas por diferentes fungos.

As figura 11 e 12 apresentam as IF dos isolados Pb18, Pb01, Pb66 e Pb8334 em meio contendo L-DOPA (Figura 11) ou L-Epinefrina (Figura 12), utilizando anticorpo monoclonal MAb8C3 .

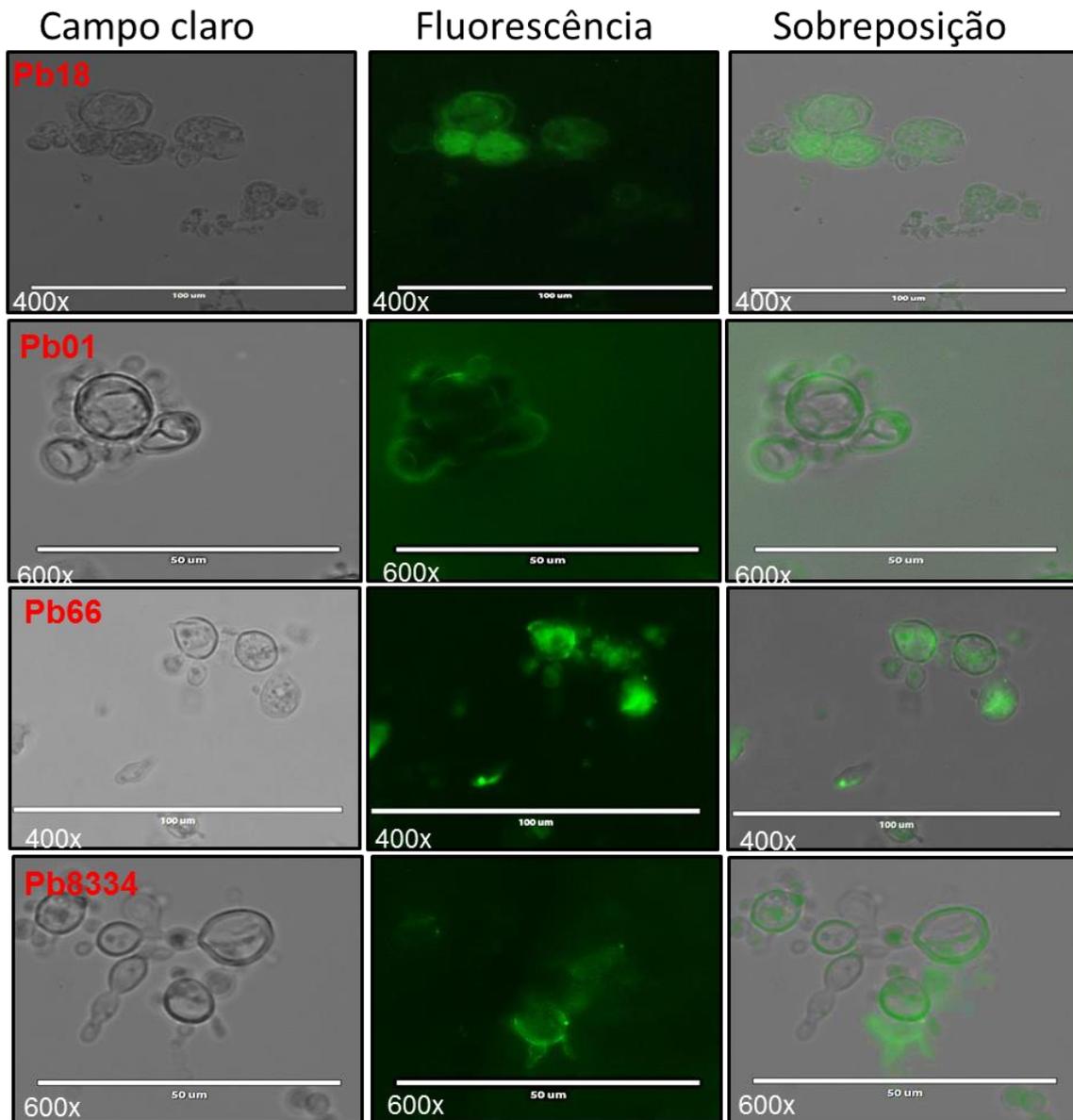
**Figura 11** - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas dos isolados Pb18, Pb01, Pb66 e Pb8334 em meio McVM com 1mM de L-DOPA, por 10 dias.



Melanização dos isolados Pb18, Pb01, Pb66 e Pb8334. Marcação com o anticorpo monoclonal MAb8C3, seguido de anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa Fluor 488.

As imagens foram realizadas em microscópio de fluorescência EVOS FL - AMG com aumento de 400x ou 600x.

**Figura 12** - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas dos isolados Pb18, Pb01, Pb66 e Pb8334 em meio McVM com 0,8 mg/mL de L-Epinefrina, por 10 dias.



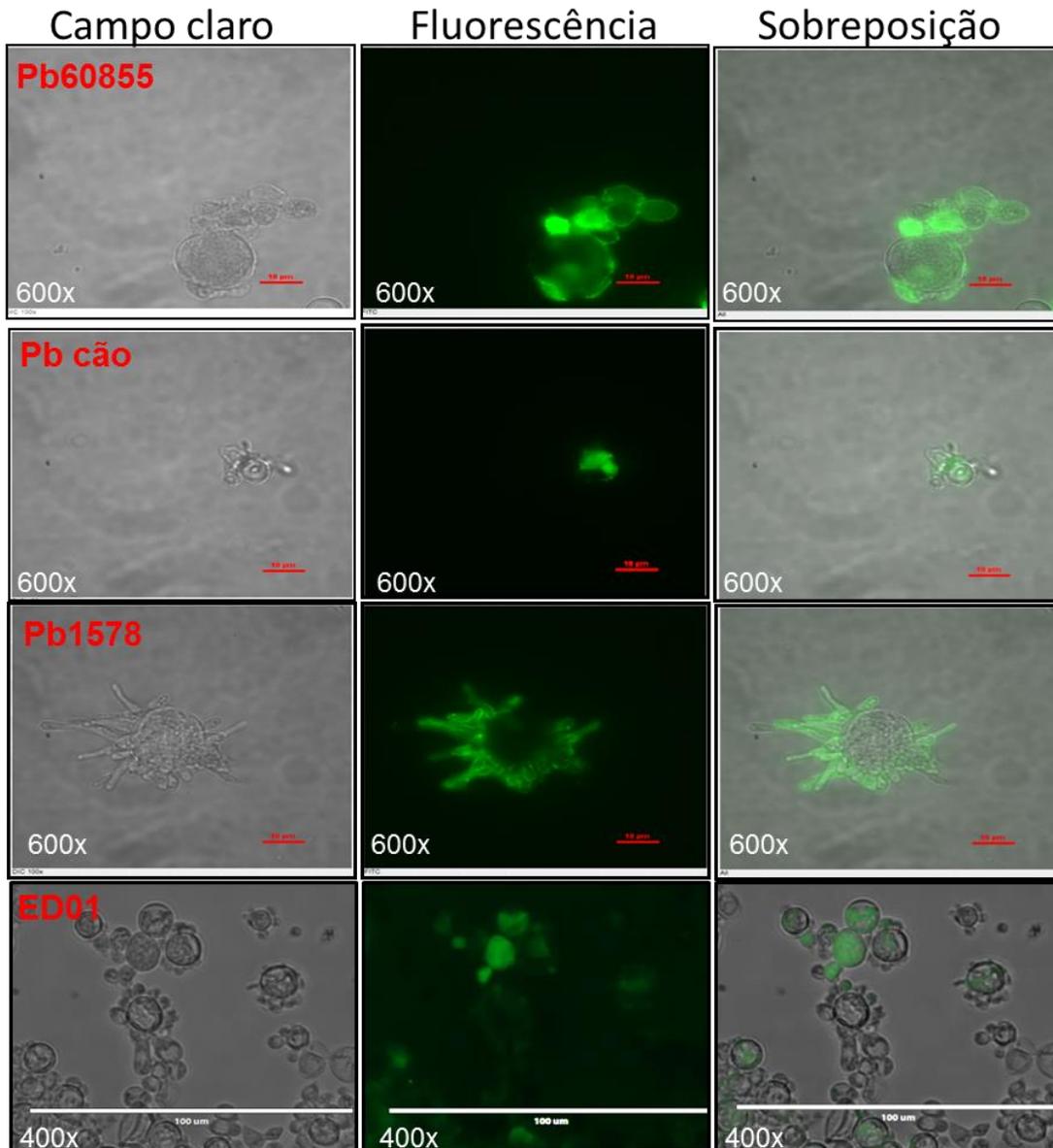
Melanização dos isolados Pb18, Pb01, Pb66 e Pb8334 através de marcação com o anticorpo monoclonal MAb8C3, seguido de anticorpo secundário anti-IgG fluorescente.

As imagens foram realizadas em microscópio de fluorescência EVOS FL - AMG com aumento de 400x ou 600x.

É possível concluir que os isolados analisados apresentam melanina na parede celular e que ambos precursores utilizados são efetivamente capazes de induzir a produção de melanina nestes isolados.

O ensaio de fluorescência foi realizado também para os isolados Pb cão, Pb1578 e ED01 (Figura 13). Novamente, Pb60855 foi utilizado como controle para reações negativas e positivas, de forma semelhante ao exposto anteriormente.

**Figura 13** - Imunofluorescência (IF) de leveduras melanizadas dos isolados Pb60855, Pb cão, Pb1578 e ED01 em meio McVM com 1 mM de L-DOPA, por 10 dias.



Melanização dos isolados Pb60855, Pb cão, Pb1578 e ED01. Marcação com o anticorpo monoclonal MAb8C3, seguido de anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa Fluor 488.

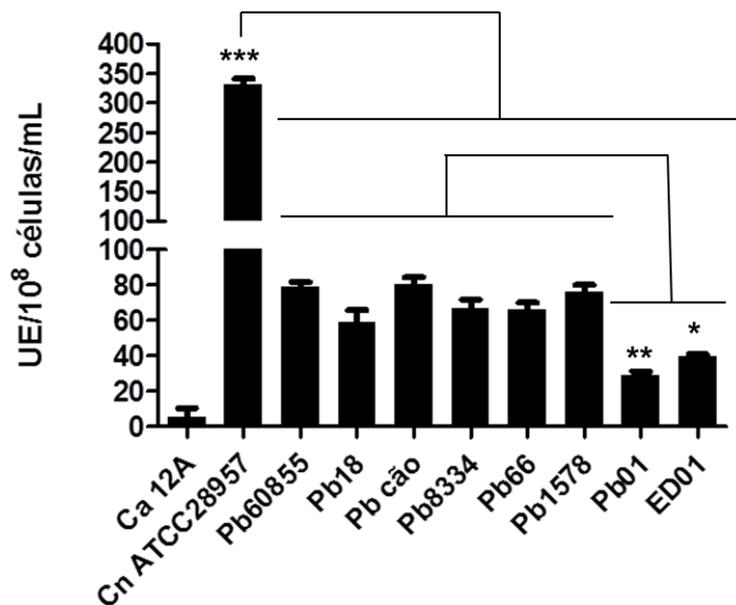
As imagens foram realizadas em microscópio de fluorescência NIKON ECLIPSE TI com aumento de 400x ou 600x.

Os resultados do ensaio de fluorescência confirmaram a presença de melanina em todos os isolados testados e na presença de ambos os precursores avaliados.

### 5.5 Atividade de lacase

A atividade da enzima lacase foi determinada em leveduras de *P. brasiliensis* (Pb60855, Pb18 e Pbcão), *P. lutzii* (Pb01, ED01, Pb66, Pb1578 e Pb8334), *C. neoformans* ATCC28957 (controle positivo) e *C. albicans* isolado 12A (controle negativo).

**Figura 14** - Atividade de Lacase dos isolados de Paracoccidioides



Análise colorimétrica da atividade de lacase dos isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Foram utilizados como controles *C. albicans* 12A (Ca 12A) e *C. neoformans* (Cn ATCC28957).

Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, onde \* para valores de  $P < 0,05$ , \*\* para valores de  $P < 0,01$  e \*\*\* para valores de  $P < 0,001$ .

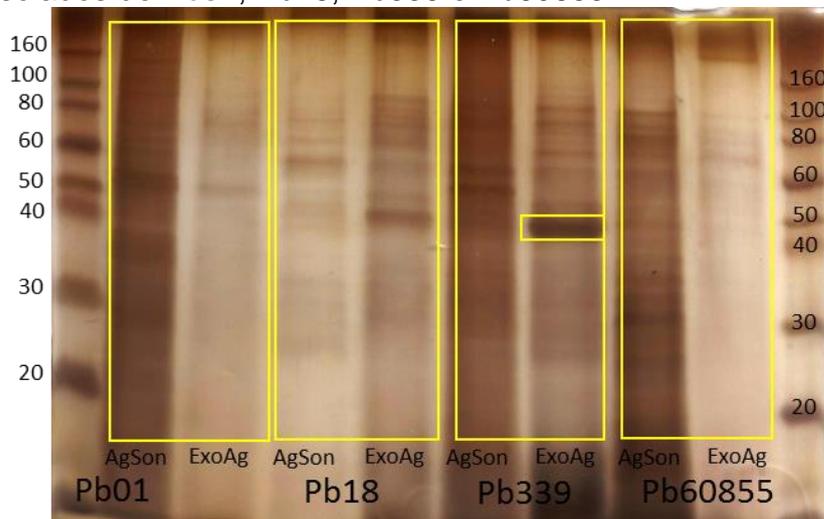
Na figura, é possível observar que os isolados de *P. brasiliensis*, *P. lutzii* e *C. neoformans* apresentaram atividades enzimáticas significantemente ( $P < 0,001$ ) maiores quando comparadas com as leveduras de *C. albicans* 12A (Figura 14). Os isolados de *P. lutzii* Pb01 e ED01 apresentaram uma menor atividade enzimática que os demais isolados de *P. lutzii* e de *P. brasiliensis*. Além disso, é possível afirmar que a atividade de lacase do gênero *Paracoccidioides* (pelo menos dos

isolados testados) é significativamente menor quando comparada com *C. neoformans*.

## 5.6 Análise do perfil proteico

O perfil proteico dos isolados Pb60855, Pb18 e Pb01 foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12%. Após crescimento das leveduras em meio McVM líquido, por 7 dias, a 37 °C, sob agitação de 150 RPM, os antígenos livres de células ou exoantígenos (ExoAg) e antígenos sonicados (AgSon), extraídos da parede celular das células, foram analisados. O isolado de *P. brasiliensis* Pb339 foi utilizado nesta análise para comparação, por este isolado de *P. brasiliensis* constituir o principal produtor da glicoproteína de 43kDa (gp43) e ter seu perfil proteico melhor conhecido até o momento.

**Figura 15** - Análise do perfil proteico de antígenos sonicados e exoantígenos dos isolados de Pb01, Pb18, Pb339 e Pb60855.



AgSon = Antígeno sonicado / ExoAg = Exoantígeno

Leveduras dos isolados Pb01, Pb18, Pb339 e Pb60855 foram cultivadas em meio líquido McVM. O sobrenadante de cultivo corresponde ao exoantígeno e as células sonicadas ao antígeno sonicado. 20 µg de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida e a corrida em condições desnaturizantes (SDS-PAGE).

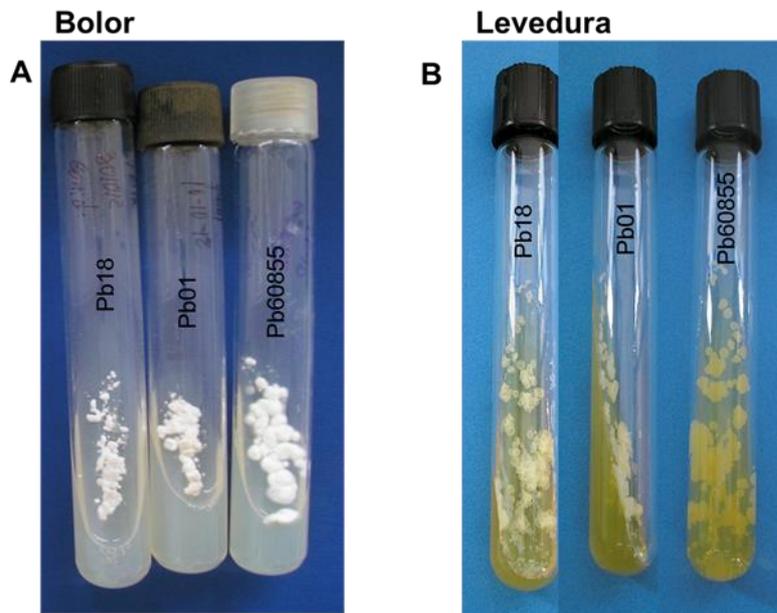
A análise da figura 15 evidencia as diferenças nos perfis proteicos de cada isolado estudado, sendo possível observar um padrão de bandas diferente em cada caso. A banda correspondente à gp43 é majoritária na fração do exoantígeno do

isolado Pb339, assim como no isolado Pb18. Também é perceptível apenas no AgSon para o isolado Pb60855 e inexistente para Pb01.

### 5.7 Análise de atividades enzimáticas pela técnica de API<sup>®</sup>ZYM (BIOMÉRIEUX)

Com base nas diferenças dos perfis proteicos dos isolados Pb01, Pb18, e Pb60855, foram analisados os perfis enzimáticos, das fases de bolor e de leveduras (Figura 16), dos exoantígenos (antígenos livres de célula) extraídos destes três isolados pelo sistema API<sup>®</sup>ZYM (25 200 BIOMÉRIEUX).

**Figura 16** - Condições de manutenção dos isolados para análise enzimática API<sup>®</sup>ZYM.



(A) Bolor cultivado em meio sólido McVM, a temperatura de 18 °C e umidade de 68%.

(B) Leveduras cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (BD Difco<sup>™</sup>), a temperatura de 37 °C e umidade ambiente (variável 12-50%).

Em termos gerais foi observado um maior número de atividades enzimáticas nos sobrenadantes de cultura da fase de bolor quando comparados com os sobrenadantes de cultura de leveduras. Em particular a fase de bolor apresentou maior quantidade de atividades enzimáticas que a fase de levedura para os três isolados analisados. Os isolados Pb18 e Pb60855 apresentaram nove atividades enzimáticas das 19 enzimas testadas, e Pb01 apresentou somente cinco. Com relação às fases de levedura, Pb18 mostrou o maior numero de atividades

enzimáticas (seis enzimas das 19 testadas) que Pb60855 (atividades para quatro enzimas) e Pb01 (apenas uma enzima apresentou atividade) (Tabela 4).

**Tabela 4** - Análise colorimétrica das atividades enzimáticas pela técnica de API<sup>®</sup>ZYM (25 200 BIOMÉRIEUX).

Enzima	Substrato	Isolados					
		Pb18		Pb60855		Pb01	
		B	L	B	L	B	L
Fosfatase alcalina	2-naftilfosfato	**				*	
Esterase (C4)	2-naftilbutirato	*		**		**	
Esterase lipase (C8)	2-naftilcapilato						
Lipase (C14)	2-naftilmiristato						
Leucina arilamidase	L-leucil-2-naftilamida	*	***	**	*	***	
Valina arilamidase	L-leucil-2-naftilamida		*			*	
Cistine arilamidase	L-leucil-2-naftilamida					*	
Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida						
Quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida						
Fosfatase ácida	2-naftilfosfato	**					
Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	Naftil-AS-BI-fosfato	**	***	*	**		
$\alpha$ -galactosidase	6-Br-2-naftil- D-galactopiranosido			**			
$\beta$ -galactosidase	2-naftil- D-galactopiranosido			*			
$\beta$ -glucuronidase	Naftol-AS-BI- D-glucuronido		**				
$\alpha$ -glucosidase	2-naftilil- D-glucopiranosido	*		**			
$\beta$ -glucosidase	6-Br-2-naftil- D-glucopiranosido	**		***			
N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase	1-naftil-N-acetilo- D-glucosaminido	***	**	*	*		***
$\alpha$ -manosidase	6-Br-2-naftil- D-manopiranosido	***	***	**	*		
$\alpha$ -fucosidase	2-naftil- $\square$ -L-fucopiranososa						

Foram analisados os perfis enzimáticos, das fases de bolor e de leveduras, dos exoantígenos (antígenos livres de célula) extraídos dos isolados Pb18, Pb60855, e Pb01.

**B:** Bolor; **L:** Levedura

\*: Levemente positivo; \*\*: Moderadamente positivo; \*\*\*: Altamente positivo.

Na análise da Tabela 4, pode ser ressaltado que os isolados Pb18 e Pb60855 produziram a maioria das enzimas relacionadas com o metabolismo de carboidratos (55 e 77%, respectivamente). Pb01 apresentou 11% de positividade para esse tipo de enzimas e 60% de positividade para enzimas relacionadas com o metabolismo

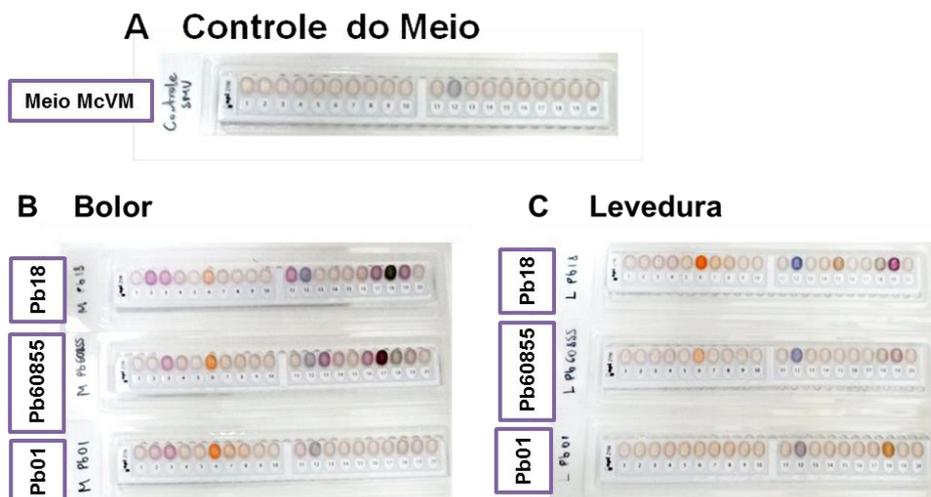
proteico (versus 20% para Pb18 e 40% para Pb60855). Os três isolados mostraram 33% de positividade na presença de enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico.

Em particular, as enzimas Leucina arilamidase, Naftol-AS-BI-fosfohidrolase, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase e  $\alpha$ -manosidase foram encontradas tanto na fase de bolor quanto na fase de levedura dos isolados Pb18 e Pb60855. Dessas enzimas a Leucina arilamidase foi detectada somente na fase de bolor de Pb01 e N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase na fase de levedura deste isolado.

Em concordância com os perfis proteicos observados na figura 15 foi possível determinar que o isolado Pb01 produz comparativamente uma menor quantidade de proteínas nas condições ensaiadas.

A figura 17 ilustra o teste realizado para análise colorimétrica da atividade enzimática dos exoantígenos, obtidos a partir das fases de bolor e levedura, dos isolados Pb01, Pb60855 e Pb18, através do sistema de detecção API<sup>®</sup>ZYM (25 200 BIOMÉRIEUX).

**Figura 17** - Análise da atividade enzimática de Pb01, Pb60855 e Pb18.



As frações dos exoantígenos dos três isolados foram aplicadas no kit API<sup>®</sup>ZYM (25 200 BIOMÉRIEUX). A mudança de cor nos poços indica que houve reação enzimática e degradação do substrato.

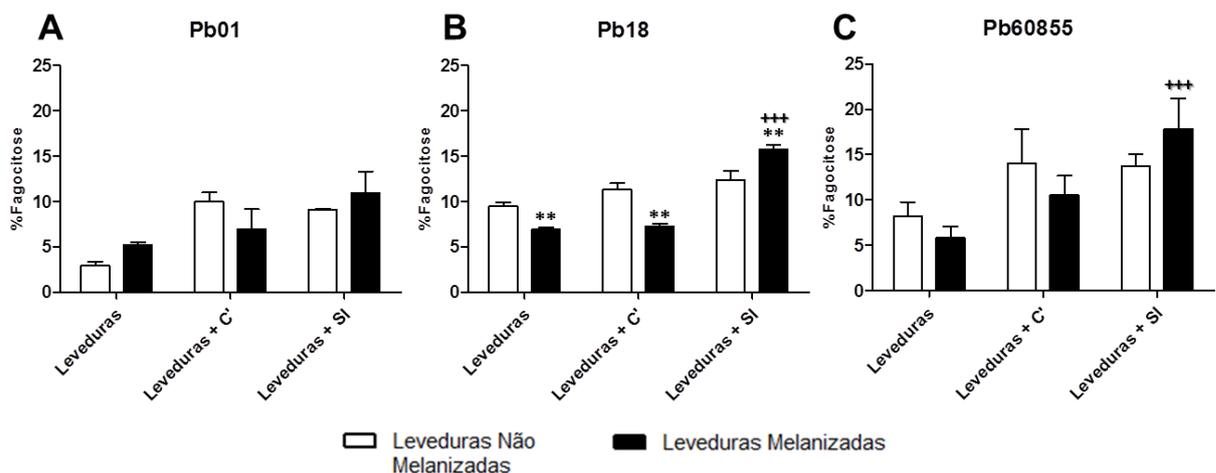
- (A) controle de meio de cultura, somente meio McVM;
- (B) exoantígenos extraídos da fase de bolor;
- (C) exoantígenos extraídos da fase leveduriforme.

## 5.8 Ensaio de fagocitose

Com o objetivo de avaliar a implicância da melanina na virulência dos isolados de *Paracoccidioides*, foram realizados ensaios de fagocitose com 3 isolados: Pb18, Pb60855 e Pb01.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 ativados com IFN- $\gamma$  foram desafiados com leveduras melanizadas e não-melanizadas de cada isolado. As leveduras foram avaliadas em três condições distintas: sem tratamento prévio, tratadas com complemento e tratadas com soro inativado por calor, sem fatores de complemento. Na figura 18 estão expostos os resultados obtidos.

**Figura 18 - Porcentagem de fagocitose**



Leveduras não melanizadas e melanizadas de Pb01 (A), Pb18 (B) e Pb60855 (C).

Em branco, leveduras não melanizadas, cultivadas em meio McVM sem L-DOPA.

Em preto, leveduras melanizadas cultivadas em meio McVM com L-DOPA.

Leveduras melanizadas e não-melanizadas de cada isolado foram avaliadas sem tratamento prévio (Leveduras), tratadas com complemento (Leveduras + C') e tratadas com soro inativado por calor (Leveduras + SI).

Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, onde:

\*\* comparação estatística entre leveduras melanizadas e não melanizadas ( $P < 0,01$ ).

+++ comparação estatística entre leveduras melanizadas tratadas com soro ou complemento ( $P < 0,001$ ).

A análise da figura 18 permite realizar diferentes enfoques dos resultados obtidos:

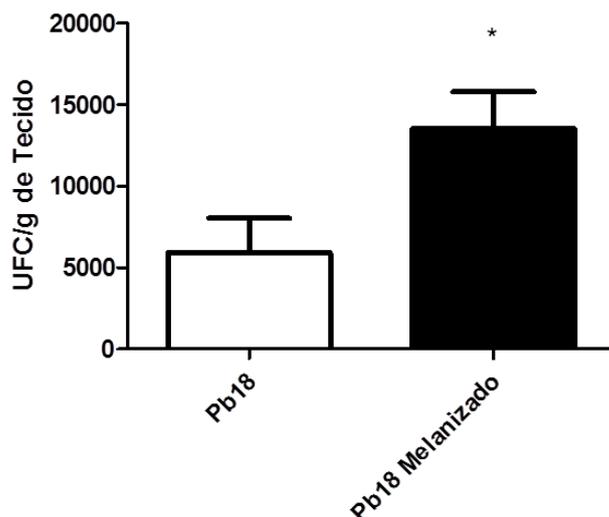
- 1) Leveduras sem tratamento prévio (Leveduras): A análise dos isolados Pb60855 e Pb18 mostrou que leveduras melanizadas são menos fagocitadas (menor % de fagocitose) que leveduras não melanizadas. Porém, Pb01 mostrou o contrário, leveduras melanizadas foram mais fagocitadas.

- 2) Leveduras tratadas com complemento (Leveduras + C'): Leveduras não melanizadas são mais fagocitadas que leveduras melanizadas para os três isolados.
- 3) Leveduras tratadas com Soro Inativado (Leveduras + SI): Leveduras melanizadas são mais fagocitadas que as não melanizadas
- 4) Com relação ao efeito de complemento e soro sobre a fagocitose, observa-se que a proporção de leveduras fagocitadas aumenta em presença de ambos os componentes (complemento e soro inativado), além disso, essa proporção é mantida após inativação das proteínas do complemento por calor.

### 5.9 Ensaio in vivo - avaliação da carga fúngica em camundongos BALB/c infectados com leveduras melanizadas e não-melanizadas.

A avaliação da carga fúngica no pulmão de camundongos BALB/c infectados com leveduras melanizadas e não-melanizadas de *P. lutzii*, isolado Pb01 e *P. brasiliensis*, isolados Pb60855 e Pb18 foi realizada através da determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas do extrato de pulmão obtido após o sacrifício dos animais infectados. Entretanto, não obtivemos, até o momento, crescimento (UFC) nas amostras provenientes de camundongos infectados com Pb01 e Pb60855. A figura 19 mostra os resultados de carga fúngica recuperada a partir de camundongos infectados com o isolado Pb18. Embora os resultados obtidos não informem dados referentes ao isolado de *P. lutzii* (Pb01), que constitui objetivo do presente trabalho, são dados importantes porque corroboram com resultados anteriores demonstrados por nosso grupo através de Da Silva et al., 2009 (71). Assim, é observado um número maior de unidades formadoras de colônia nos pulmões infectados com células melanizadas quando comparadas com células não melanizadas.

**Figura 19** - Cargas fúngicas de pulmão (UFC) de camundongos BALB/c infectados com leveduras não melanizadas e melanizadas do isolado Pb18.



## 6 DISCUSSÕES

A PCM é classificada como uma das principais micoses sistêmicas endêmicas, de grande interesse para os países da América Latina, e divide várias características clínicas com outras micoses como Histoplasmose, Blastomicose Norte Americana e Coccidioidomicose, e também com outras micoses profundas e infecções causadas por patógenos intracelulares como micobactérias e *Leishmania* spp.. No adulto, a forma clínica predominante é a crônica, mas quando acomete crianças ou adolescentes apresenta-se na forma aguda ou subaguda. Quando não diagnosticada e tratada oportunamente, pode levar a formas disseminadas graves e letais, com rápido e progressivo envolvimento dos pulmões, tegumento, gânglios, baço, fígado e órgãos linfóides do tubo digestivo (19,32).

Com a recente identificação do complexo de espécies crípticas do gênero *Paracoccidioides*, e a criação de uma nova espécie dentro do gênero, *Paracoccidioides lutzii*, muitos questionamentos surgiram com relação a possíveis diferenças na forma clínica da PCM, e alguns estudos comparativos, de genômica e proteômica, entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii* mostraram diferenças significativas que podem influenciar o quadro clínico da doença, o diagnóstico e o tratamento da PCM (16).

Nesse contexto, estudos comparativos, visando identificar diferenças entre as espécies de *Paracoccidioides*, como por exemplo, a identificação de diferentes fatores de virulência, podem ampliar a compreensão das diferentes manifestações clínicas observadas e aprofundar os conhecimentos sobre a PCM.

A produção de melanina por vários fungos constitui importante fator de virulência e interfere no mecanismo da patogênese, como ocorre na PCM. A ampliação do conhecimento sobre a produção de melanina e sua ação nos mecanismos de defesa do sistema imunológico também irá contribuir para aprofundar os conhecimentos sobre a PCM e elucidar outros mecanismos de evasão do sistema imune pelo fungo.

O processo de melanização de *P. brasiliensis* foi documentado, pela primeira vez, tanto em conídios como em leveduras do isolado Pb60855, por Gomes et al. (2001) (69). Em 2006, Da Silva et al. mostraram que células melanizadas de *P. brasiliensis* isolado Pb18 são mais resistentes ao ataque por macrófagos alveolares e peritoneais, e são menos susceptíveis a drogas antifúngicas, em especial a

anfotericina B (70). Em 2009, Da Silva e colaboradores observaram, em modelo murino experimental, maior aumento da carga fúngica em infecções com células melanizadas de Pb18 quando comparada com infecções por células não melanizadas (71). Urán et al. (2011) mostrou que a melanina de *P. brasiliensis*, isolado Pb60855, é uma molécula antigênica capaz de induzir produção de anticorpos como demonstrado em modelo animal e também *in vitro* ao desenvolver anticorpos monoclonais anti-melanina dos isotipos IgG e IgM (72).

Diante do exposto acima, nosso trabalho buscou identificar diferenças no processo de melanização entre os isolados de *P. brasiliensis* (Pb60855 e Pb18), já reportados na literatura, e os isolados de *P. lutzii*, presentes na micoteca do nosso laboratório (Pb01, ED01, Pb66, Pb1578, e Pb8334).

Inicialmente, observamos que culturas realizadas em meio McVM pH 5,5 (74), suplementado com L-DOPA, na concentração de 1 mM, e incubados a 37 °C, sob agitação de 150 RPM, mostraram que os isolados de *P. lutzii* (Pb01, ED01, Pb66, Pb1578 e Pb8334) melanizam de formas diferenciadas entre si e quando comparados com os isolados de *P. brasiliensis* (Pb60855, Pb18 e Pb cão). O isolado de Pb60855 mostrou maior porcentagem de células melanizadas, quando comparado com os demais isolados. Pb01 apresentou poucas células melanizadas. Pb66 e Pb1578 foram os isolados de *P. lutzii* que apresentaram maior número de células melanizadas e Pb8334 apresentou melanização intermediária junto com ED01, sugerindo diferentes perfis de melanização entre os isolados.

A micromorfologia das leveduras, de cada isolado, mostrou a presença de leveduras enegrecidas, apresentando pigmentos escurecidos localizados dentro do citoplasma e na parede celular, e a contagem de células melanizadas, comparativamente com células não melanizadas confirmou as observações realizadas através da visualização do aspecto das culturas.

Curvas de crescimento foram realizadas com o objetivo de avaliar o perfil de crescimento e melanização das leveduras em meio suplementado com L-DOPA na concentração de 1mM, que é a concentração comumente utilizada nos vários estudos revisados sobre melanização, inclusive estudos com *Cryptococcus* spp., e nos reportados para *P. brasiliensis*. Assim as curvas foram realizadas utilizando culturas suplementadas com 1mM de L-DOPA e uma concentração de L-DOPA, 10 vezes menor, de 0,1 mM e, também, em meio sem L-DOPA. Foi possível observar que as concentração de 0,1 mM e 1 mM de L-DOPA não comprometeram o

crescimento nem a viabilidade celular das leveduras. Já com concentração de 10 mM (dados não mostrados) foi possível observar uma autopolimerização intensa da L-DOPA no meio McVM, com formação de precipitado escuro, o que inviabilizou a análise das células melanizadas e continuação dos experimentos com esta concentração. Estas evidências são suportadas por estudos que mostraram que altas concentrações (10mM) de L-DOPA ou norepinefrina inibem o crescimento e melanização de *C. neoformans*, sugerindo que em altas concentrações a L-DOPA, ou produtos decorrentes do metabolismo da L-DOPA, pode ter ação tóxica sobre o *C. neoformans* (54).

As diferentes concentrações de L-DOPA testadas também visaram à otimização na produção de células melanizadas. Assim, ao observamos a curva do perfil de melanização, para cada isolado de *P. lutzii* e para o isolado *P. brasiliensis* (Pb60855), é possível visualizar que a concentração de 1 mM de L-DOPA proporciona maior número de células melanizadas quando comparadas com as curvas de perfil de melanização com 0,1 mM de L-DOPA. E no tempo de 15 dias foram alcançadas maiores porcentagens de melanização.

Assim, com base nas análises macroscópicas das culturas, nas curvas de crescimento e melanização e na avaliação micromorfológica, das leveduras cultivadas em meio suplementado com L-DOPA, é possível ratificar que os isolados de *P. lutzii* melanizam de formas diferenciadas entre si e quando comparados com os isolados de *P. brasiliensis*.

A detecção da melanina foi realizada por imuno-microscopia de fluorescência, utilizando anticorpos monoclonais anti-melanina de *P. brasiliensis* (8C3) e de *C. neoformans* (6D2). Como mostrado por Urán, M.E., et al. (2011) (72), existe uma reatividade cruzada dos anticorpos monoclonais MAb8C3 e MAb6D2, o que explica a reatividade do MAb6D2 de *C. neoformans* com melanina de *Paracoccidioides* spp., sendo possível também reagir com melaninas produzidas por diferentes fungos. Embora as estruturas químicas das melaninas não sejam bem conhecidas, as melaninas estão entre os mais disseminados dos pigmentos naturais e podem ser encontrados praticamente em todos os organismos vivos, como plantas superiores, fungos e bactérias, e apesar da aparente diversidade na natureza de substratos primários, estrutura química e propriedades dos pigmentos resultantes, há uma característica bioquímica unificadora do processo de melanização em plantas e animais, o sistema enzimático, comumente chamado de fenoloxidase, que engloba

as enzimas tirosinases e laccases, a qual catalisa as principais etapas do processo de melanogênese (62,77).

Além de dois anticorpos monoclonais diferentes, o teste de imunofluorescência foi realizado com leveduras melanizadas cultivadas na presença de dois substratos diferentes, a L-DOPA, na concentração de 1 mM, e a L-Epinefrina a 0,8 mg/mL. E da mesma forma que foi visto em Urán, M.E., et al. (2011) (72), a forma patogênica dos fungos *Paracoccidioides* apresentou melanização de forma semelhante na presença de ambos os precursores, sendo encontrados valores semelhantes nas porcentagens de células melanizadas, para cada isolado testado (Tabela 3).

Importante ressaltar que as diferenças observadas nas porcentagens de melanização apresentadas nas tabelas 2 e 3 são decorrentes do tempo de cultivo, assim, tabela 2 mostra um intervalo de valores observados após 15 dias de cultivo e tabela 3 valores obtidos após 10 dias. Além disso, a tabela 2 expressa valores encontrados em culturas diferentes, realizadas sob as mesmas condições, porém realizadas em momentos diferentes.

Em alguns animais e humanos, a L-DOPA é um precursor na formação das catecolaminas que são compostos biológicos formados a partir de fenilalanina e tirosina, com ação neurotransmissora, sendo os principais a dopamina, a norepinefrina e a epinefrina. A dopamina é encontrada na substância negra e na área tegmental ventral (ATV) do cérebro, sendo um neurotransmissor com ação no sistema nervoso central (SNC). A norepinefrina e a epinefrina atuam como hormônios e neurotransmissores do sistema nervoso periférico (SNP) simpático e parassimpático. Embora seja raro o envolvimento do sistema nervoso na PCM, e existam poucos relatos na literatura de casos de neuroparacoccidioidomicose, a melanização *in vivo*, durante processo infeccioso, constitui um fator que merece ser investigado, pois a árvore brônquica é muito exposta à norepinefrina e à epinefrina circulantes, liberadas no sangue por estimulação simpática da medula supra-renal. Esses dois hormônios, sobretudo a epinefrina, causam dilatação da árvore brônquica, e possuem ação no controle da frequência e capacidade pulmonar (78,79). Assim, durante o processo infeccioso, as leveduras, em ambiente com presença desses precursores, poderiam desenvolver *in vivo* a formação de melanina. Estudos visando a pesquisa de células melanizadas *in vivo* irão, com

certeza, contribuir para elucidar o processo de melanização e o papel da melanina na patogênese da PCM.

Os resultados do ensaio de fluorescência confirmaram a presença de melanina em todos os isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* testados, na presença de ambos precursores utilizados.

Tendo sido demonstrado a presença de melanina nos isolados analisados, surgiu o interesse em dosar a atividade de lacase, enzima fúngica encarregada de sintetizar a melanina. Conforme exposto na figura 14, foi possível observar que a atividade de lacase dos isolados do gênero *Paracoccidioides* testados foi significativamente menor quando comparada com *C. neoformans*. Entre os isolados de *P. brasiliensis* foi observado diferenças significativas somente com relação aos isolados de *P. lutzii* Pb01 e ED01, que apresentaram uma menor atividade enzimática que os demais isolados de *P. lutzii* e de *P. brasiliensis* testados.

A correlação entre atividade de lacase e produção de melanina é bem estabelecida na literatura, sendo a lacase a enzima que catalisa a formação deste metabólito (80). Entretanto não foi possível correlacionar os valores das atividades de lacase obtidos com os perfis de melanização observados para cada isolado. De modo geral, as densidades ópticas observadas mostraram valores baixos, e determinadas condições dos isolados, como sucessivos repiques das culturas, poderiam alterar a expressão da enzima e outros fatores de virulência. Possivelmente, estudos moleculares poderiam esclarecer e estabelecer, de forma mais consistente, uma correlação entre a atividade enzimática e o perfil de melanização apresentado para cada isolado.

Também com base nos resultados obtidos, mostrando diferentes perfis de melanização nos isolados avaliados, surgiu o interesse em verificar diferenças no perfil de proteínas entre os diferentes isolados. Assim, o perfil proteico dos isolados Pb60855, Pb18 e Pb01 foi monitorado por eletroforese, utilizando os antígenos livres de células ou exoantígenos (ExoAg) e antígenos sonicados (AgSon), extraídos da parede celular das células. Foi possível observar um padrão de bandas diferente para cada isolado.

As diferenças observadas nos perfis proteicos dos isolados Pb01, Pb18, e Pb60855 conduziram para a análise dos perfis enzimáticos dos exoantígenos extraídos das fases de bolor e de levedura destes três isolados, utilizando o sistema comercial API<sup>®</sup>ZYM (25 200 BIOMÉRIEUX).

O perfil enzimático encontrado para os isolados analisados pertence a uma condição de crescimento particular, podendo sofrer variações dependendo das condições de crescimento e fundamentalmente da disponibilidade de substratos que tenha o fungo nessa condição. Muitas das enzimas analisadas podem estar presentes nestes isolados, mas não ter o substrato para degradar. Por isso esta análise é meramente descritiva de uma única condição experimental e não tem pretensão de representar o proteoma destes fungos.

Em concordância com os perfis proteicos observados por eletroforese, o sistema API<sup>®</sup>ZYM (25 200 BIOMÉRIEUX) permitiu identificar que o isolado Pb01 produz comparativamente uma menor quantidade de proteínas nas condições ensaiadas. Com base nestes resultados, pode ser inferido que uma menor produção de enzimas poderia estar relacionada com uma menor virulência, já que muitas enzimas extracelulares são utilizadas por microrganismos patogênicos para degradar compostos presentes nos tecidos do hospedeiro (48,51). Também corrobora com as evidências observadas por Pigosso e colaboradores (2013), que mostraram diferenças significativas no metabolismo global dos membros do complexo filogenético de *Paracoccidioides*, sugerindo que a caracterização do proteoma para os membros dos diferentes complexos poderá estabelecer uma correlação quantitativa e qualitativa dos proteomas com características fenotípicas tais como patogenicidade, virulência e tolerância ao estresse do meio ambiente (18).

Com o objetivo de avaliar o papel da melanina na virulência dos isolados de *Paracoccidioides*, estabelecendo uma comparação entre os isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, foram realizados os ensaios de fagocitose. Inicialmente, foi possível observar que as leveduras melanizadas dos isolados Pb60855 e Pb18 são menos fagocitadas que leveduras não melanizadas, corroborando com os dados já reportados na literatura (70). Porém, o isolado de *P. lutzii* (Pb01) mostrou um perfil diferente, as leveduras melanizadas de Pb01 foram mais fagocitadas.

Nos ensaios em que as leveduras foram tratadas com soro contendo fatores do complemento, as células não melanizadas foram mais fagocitadas que as melanizadas para os três isolados. A presença de proteínas do complemento parece exercer um efeito protetor sobre as leveduras melanizadas dos três isolados estudados, já que é observada uma menor proporção de leveduras melanizadas fagocitadas quando comparadas com leveduras não melanizadas. Este efeito seria especificamente produzido pelo complemento porque após sua inativação por calor

(Soro Inativado) esse efeito não foi mantido (aumentando a fagocitose). Assim, foi observado que no caso das leveduras tratadas com Soro Inativado (Leveduras + SI), as leveduras melanizadas foram mais fagocitadas que as não melanizadas.

A proporção de leveduras fagocitadas aumentou na presença de ambos os componentes (complemento e soro inativado), ou seja, quando as leveduras foram tratadas com soro contendo fatores do complemento e com soro inativado, sem complemento. Além disso, essa proporção é mantida após inativação das proteínas do complemento por calor, sugerindo que se trata de uma fagocitose dependente de anticorpos presentes no soro.

Ainda com o objetivo de avaliar o papel da melanina na virulência dos isolados de *Paracoccidioides*, buscando estabelecer uma comparação entre os isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, foram realizados os testes *in vivo* para avaliar a carga fúngica nos pulmões de camundongos BALB/c infectados com leveduras melanizadas e não-melanizadas de *P. lutzii*, isolado Pb01 e *P. brasiliensis*, isolados Pb60855 e Pb18. Entretanto, não obtivemos sucesso neste experimento, pois encontramos dificuldades na recuperação das UFC nas amostras provenientes de camundongos infectados com Pb01 e Pb60855. Além disso, outras dificuldades foram experimentadas, não sendo possível obter dados conclusivos em tempo hábil para finalização do trabalho. Conforme já exposto, os resultados obtidos não informam dados referentes à *P. lutzii*, que constitui objetivo do presente trabalho, entretanto foram apresentados por constituírem dados importantes, corroborando com resultados anteriores demonstrados em nosso grupo por Da Silva et al., 2009 (71). Assim, foi observado um número maior de unidades formadoras de colônia nos pulmões de camundongos infectados com células melanizadas de Pb18 quando comparadas com células não melanizadas do mesmo isolado.

## 7 CONCLUSÕES

1. Os isolados de *P. lutzii* (Pb01, Pb66, ED01, Pb1578 e Pb8334) melanizam de formas diferenciadas entre si e quando comparados com isolados de *P. brasiliensis* (Pb60855, Pb18 e Pbcão);
2. Os resultados do ensaio de imuno-fluorescência com anticorpos monoclonais anti-melanina confirmaram a presença de melanina nos isolados analisados, mostraram que a melanina está presente na parede celular do fungo e que ambos precursores utilizados, L-DOPA ou L-epinefrina, são efetivamente capazes de induzir sua produção nestes isolados.
3. A atividade de lacase do gênero *Paracoccidioides*, para os isolados testados, é significativamente menor quando comparada com *C. neoformans*. Os isolados de *P. lutzii* Pb01 e ED01 apresentaram uma menor atividade enzimática que os demais isolados de *P. lutzii* e de *P. brasiliensis*.
4. As análises dos perfis proteicos, observados por eletroforese, e dos perfis enzimáticos, analisados pelo sistema API@ZYM (25 200 BIOMÉRIEUX), dos isolados Pb18, Pb60855 e Pb01, permitiram identificar que o isolado Pb01 produz comparativamente uma menor quantidade de proteínas nas condições ensaiadas.
5. Para leveduras não tratadas de Pb18 e Pb60855, a melanina reduziu a porcentagem de fagocitose e o contrário aconteceu com Pb01, as células não-melanizadas foram mais fagocitadas.
6. O tratamento das leveduras com complemento mostrou uma redução da fagocitose das células melanizadas para os três isolados, sugerindo que o complemento pode apresentar um efeito protetor sobre as leveduras melanizadas.
7. O tratamento com soro inativado mostrou uma reversão do efeito observado na presença do complemento. As células melanizadas tratadas com soro

inativado foram mais fagocitadas que as não melanizadas nas mesmas condições.

## REFERÊNCIAS\*

1. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1986;25:5–18.
2. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis : an Update. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6(2):89–117.
3. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* : a puzzle still unsolved. *Sabouraudia J Med Vet Mycol.* 1985;23:323–34.
4. Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato P, Shikanai-Yasuda MA, Felipe MSS. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Futur Med.* 2013;8(9):1177–91.
5. Prado M, Barbosa M, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil : a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(3):513–21.
6. Coutinho ZF, Da Silva, D.; Lazera, M.; Petri, V.; Oliveira, RM.; Sabroza, PC.; Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad saude publica / Minist da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica.* 2002;18(5):1441–54.
7. Benchimol JL, Sá MR. Adolpho Lutz Obra Completa Dermatologia e Micologia. In: FIOCRUZ, editor. Rio de Janeiro; 2004.
8. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Paracoccidioidomycose. In: *Tratado de Micologia Médica Lacaz.* 9° ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 639-729 p.
9. Almeida F. Estudos comparativos do granuloma coccidiótico nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. *An Fac Med S Paulo.* 1930;5:125–41.
10. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis : Molecular approaches to morphogenesis , diagnosis , epidemiology , taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 2002;(40):225–42.
11. Teixeira MM, Theodoro RC, Niño-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. *Paracoccidioides* species complex : ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *Plos Pathog.* 2014;10(10):4–7.
12. Matute DR, Mcewen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G., Bagagli E.,

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

- Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Niño-Vega G, Taylor JW. Cryptic Speciation and Recombination in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as Revealed by Gene Genealogies. *Mol Biol Evol.* 2006;23(1):65–73.
13. Soares CMA, Mollinari Madlun EEWI, Silva SP, Pereira m, felipe mss. characterization of *paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* 1995;33(2):505–7.
  14. Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJA, Soares CMA, Pereira M, Jesuino RSA, McEwen JG, Mendoza L, Taylor J W, Felipe MS, San-Blas G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol.* 2008;45(5):605–12.
  15. Teixeira, MM, Theodoro RC, Carvalho MJA.; Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MSS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009;52(2):273–83.
  16. Teixeira MM, Theodoro RC, Oliveira FFM, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol.* 2014;52:19–28.
  17. Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, Muszewska A, Goldberg J, Bailão, AM, Brigido MM, Ferreira MES, Garcia AM, Grynberg M, Gujja S, Heiman DI, Henn MR, Chinnappa DK, León-Narváez H, Longo LVG, Ma LJ. et al. Comparative Genomic Analysis of Human Fungal Pathogens Causing *Paracoccidioidomycosis*. *Plos Genet.* 2011;7(10).
  18. Pigosso LL, Parente AFA, Coelho ASG, Silva LP, Borges CL, Bailão AM, Soares CMA. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol.* 2013;60:87–100.
  19. Shikanai-Yasuda MA, Filho FQT, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso em *paracoccidioidomicose*. Guidelines in *paracoccidioidomycosis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(3):297–310.
  20. Camargo ZP De, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of *paracoccidioidomycosis*. *Rev Iberoam Micol organo la Asoc Esp Espec en Micol.* 2000;17(2):41–8.
  21. Aristizábal BH, Clemons KV, Cock AM, Restrepo A, Stevens DA. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol.* 2002;40(August 2001):169–78.
  22. Wanke B, Aidê MA. *Paracoccidioidomycosis*. *J Bras Pneumol.* 2009;35(August):1245–9.
  23. Bertoni T, Takao E, Dias J, Svidzinski T. *Paracoccidioidomicose e tuberculose: diagnóstico diferencial*. *J Bras Patol Med Lab.* 2010;46(1):17–21.
  24. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota G da S.

- Paracoccidioidomycosis: A Recently Proposed Classification of Its Clinical Forms. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1987;20(2):129–32.
25. Barbosa W, Barbosa GL. Paracoccidioidomycosis - A Disease of the Phagocytic Mononuclear System. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1991;24(4):203–7.
  26. Zembruski MM, Bassanesi MC, Wagner LC, Severo LC. Inquérito Intradérmico com Histoplasmina e Paracoccidioidina em Duas Regiões do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1996;28(1):1–3.
  27. Marques SA. Paracoccidioidomycosis. *Clin Dermatol.* 2012;30:610–5.
  28. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008;165(4-5):209–21.
  29. Calich VLG, Da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV, et al. Innate immunity to Paracoccidioides brasiliensis infection. *Mycopathologia.* 2008;165(4-5):223–36.
  30. McInturff JE, Modlin RL, J K. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol.* 2005;125:1–8.
  31. Calich VLG, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa T a., Loures F V. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;53(1):1–7.
  32. Fortes MRP, Kurokawa CS, Marques SA, Miot HA, Marques MEA. Immunology of paracoccidioidomycosis. *An Bras Dermatol.* 2011;86(3):516–25.
  33. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;11(4):275–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2939>
  34. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular.* 7° ed. Elsevier; 2011.
  35. Camargo ZP, Gesztesi JL, Saraiva EC, Taborda CP, Lopes JD. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of Paracoccidioides brasiliensis Antibodies in Paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1994;32(10):2377–81.
  36. Camargo ZP De. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008;165(4-5):289–302.
  37. Camargo ZP, Guesdon JL, Drouhet E, Improvisi L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmuno-electrophoresis and erythro-immunoassay. *Mycopathologia* [Internet]. 1984;88(1):31–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8851212>
  38. Albuquerque CF, Marques Silva SH, Camargo ZP. Improvement of the Specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of

- Paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1944–6.
39. Travassos LR, Taborda CP, Colombo AL. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008;6(2):251–62.
  40. Gegembauer G, Araujo LM, Pereira EF, Rodrigues AM, Paniago AMM, Hahn RC, et al. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(7):e2986.
  41. Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, Camargo ZP. PCR for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis PCR for diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3478–80.
  42. Almeida J N Jr, Del Negro GM, Grenfell RC, Vidal MS, Thomaz DY, Figueiredo DS, Bagagli E, Juliano L BG. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for differentiation of the dimorphic fungal species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. *J Clin Microbiol.* 2015;53(4):1383–6.
  43. Restrepo A, Stevens DA, Gomez I, Leiderman E, Angel R, Fuentes J, et al. Ketoconazole: a new drug for the treatment of paracoccidioidomycosis. *Rev Infect Dis.* 1980;2(4):633–42.
  44. Ameen M, Talhari C, Talhari S. Advances in paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Dermatol.* 2009;35(6):576–80.
  45. Rodríguez-Brito S, Niño-Vega G, San-Blas G. Caspofungin affects growth of *Paracoccidioides brasiliensis* in both morphological phases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):5391–4.
  46. Benard G, Campos AF, Netto LC, Gonçalves LG, Machado LR, Mimicos EV, et al. Treatment of severe forms of paracoccidioidomycosis: is there a role for corticosteroids? *Med Mycol.* 2012;50(August):641–8.
  47. Travassos LR, Rodrigues EG, Iwai LK, Taborda CP. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. *Mycopathologia.* 2008;165(4-5):341–52.
  48. Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peraçoll MTS. Virulence Factors in Fungi of Systemic Mycoses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1998 May;40(3):125–35.
  49. San-Blas G, San-Blas F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia.* 1977;62(2):77–86.
  50. San-Blas G, Vernet D. Induction of the Synthesis of Cell Wall alpha-1,3-Glucan in the Yeastlike Form of *Paracoccidioides brasiliensis* Strain IVIC Pb9 by Fetal Calf Serum. *Infect Immun.* 1977;15(3):897–902.
  51. Lukaszuk C, Krajewska-Kułak E, Niczyporuk W, Theodosopoulou E, Hatzopulu A, Krawczuk-Rybak M, et al. Variations of enzymatic activity and biotypes of the yeast like fungi strains isolated from cancer patients. *Rocz Akad Med w*

- Białymstoku - Ann Acad Medicae Bialostoc. 2005;50 Suppl 1:16–9.
52. Urán ME, Cano LE. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Asoc Colomb Infectol.* 2008;12(2):357–77.
  53. Gómez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. *Curr Opin Infectious Dis.* 2003;16(2):91–6.
  54. Eisenman HC, Chow S, Tsé KK, McClelland E, Casadevall A. The effect of L-DOPA on *Cryptococcus neoformans* growth and gene expression. *Virulence.* 2011;2(4):329–36.
  55. Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;93(3):931–40.
  56. Casadevall A, Nakouzi A, Crippa PR, Eisner M. Fungal Melanins Differ in Planar Stacking Distances. *PLoS One.* 2012;7(2):e30299.
  57. Urán ME, Castañeda LM, Restrepo Á, Cano LE. Expresión de melanina en *Paracoccidioides brasiliensis*: inducción química con L-DOPA y L-epinefrina. *Med UPB.* 2008;27(1):17–24.
  58. Nosanchuk JD, Casadevall A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-DOPA. *Microbiology.* 2003;149(7):1945–51.
  59. San-Blas G, Guanipa O, Moreno B, Pekerar S, San-Blas F. *Cladosporium carrionii* and *Hormoconis resinae* (*C. resinae*): cell wall and melanin studies. *Curr Microbiol.* 1996;32(1):11–6.
  60. Morris-Jones R, Gomez BL, Diez S, Uran M, Morris-Jones SD, Casadevall A, et al. Synthesis of Melanin Pigment by *Candida albicans* In Vitro and during Infection. *Infect Immun.* 2005;73(9):6147–50.
  61. Youngchim S, Morris-Jones R, Hay RJ, Hamilton AJ. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol.* 2004;53(3):175–81.
  62. Tabora CP, Da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia.* 2008;165(4-5):331–9.
  63. Zhdanova NN, Zakharchenko VA, Vember VA, Nakonechnaya LT. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycol Res.* 2000;104(12):1421–6.
  64. Duin D Van, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(11):3394–400.
  65. Kunamneni A, Ballesteros A, Plou FJ, Alcalde M. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. *Commun Curr Res Educ Top Trends*

- Appl Microbiol. 2007;233–45.
66. Piscitelli A, Giardina P, Lettera V, Pezzella C, Sannia G, Faraco V. Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. *Curr Genomics*. 2011;12(2):104–12.
  67. Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. Laccases: A never-ending story. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(3):369–85.
  68. Saparrat MC, Guillen F, Arambarri AM, Martinez AT, Martinez MJ. Induction, Isolation, and Characterization of Two Laccases from the White Rot Basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(4):1534–40.
  69. Gómez BL, Nosanchuk JD, Díez S, Youngchim S, Aisen P, Cano LE, et al. Detection of Melanin-Like Pigments in the Dimorphic Fungal Pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* In Vitro and during Infection. *Infect Immun*. 2001;69(9):5760–7.
  70. Da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Tabora CP. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: Effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect*. 2006;8(1):197–205.
  71. Da Silva MB, Thomaz L, Marques AF, Svidzinski AE, Nosanchuk JD, Casadevall A, et al. Resistance of melanized yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* to antimicrobial oxidants and inhibition of phagocytosis using carbohydrates and monoclonal antibody to CD18. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(4):644–8.
  72. Urán ME, Nosanchuk JD, Restrepo A, Hamilton AJ, Gómez BL, Cano LE. Detection of Antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* Melanin In Vitro and In Vivo Studies during Infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(10):1680–8.
  73. Baltazar LM, Werneck SMC, Soares BM, Ferreira MVL, Souza DG, Pinotti M, et al. Melanin Protects *Paracoccidioides brasiliensis* from the Effects of Antimicrobial Photodynamic Inhibition and Antifungal Drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(7):4003–11.
  74. Restrepo A, Jiménez BE. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol*. 1980;12(2):279–81.
  75. Cruz RC, Werneck SMC, Oliveira CS, Santos PC, Soares BM, Santos D a, et al. Influence of different media, incubation times, and temperatures for determining the MICs of seven antifungal agents against *Paracoccidioides brasiliensis* by microdilution. *J Clin Microbiol*. 2013;51(2):436–43.
  76. Santos JRA, Gouveia LF, Taylor ELS, Resende-Stoianoff MA, Pianetti GA, Cesar IC, et al. Dynamic Interaction between Fluconazole and Amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2553–8.
  77. Protá G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. The

- Journal of Investigative Dermatology. 1980. p. 122–7.
78. Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiología médica. 11° ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.
  79. Tristano AG, Chollet ME, Wilson M, Perez J, Troccoli M. Central nervous system paracoccidioidomycosis: case report and review. *Investigación Clin.* 2004;45(3):277–88.
  80. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2003;5(4):203–23.