

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

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[®]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.

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 β -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 Th₁, caracterizada pela síntese de citocinas, como IL-2, IFN- γ e IL-12 que ativam macrófagos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, 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 Th₁ e desenvolvem outros padrões de respostas imunológicas, como resposta regulada por células T *helper* do tipo Th₂, 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- β , 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 Th₂ (32).

Os pacientes com a forma crônica ou moderada da doença apresentam um padrão de resposta intermediário entre Th₁ e Th₂. As células T regulatórias (Tregs) com fenótipo CD4⁺ CD25⁺ 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 Th₁₇, 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 Th₁₇, 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 β -(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 β -(1,3)-glucano enquanto que na forma de levedura o polissacarídeo principal é α -(1,3)-glucano. α -(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.

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.