Alexandre Ferreira Marques

Utilização de peptídeo sintético (P10) associado
ao tratamento com drogas antifúngicas no controle da
paracoccidioidomicose experimental

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências
(Microbiologia).

São Paulo

2007

Alexandre Ferreira Marques

Utilização de peptídeo sintético (P10) associado ao tratamento
com drogas antifúngicas no controle da paracoccidioidomicose
experimental

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências
(Microbiologia).

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

São Paulo

2007

Dedico este trabalho a toda minha família, que são exemplos de luta, dedicação e união, onde, o bem estar de um, reflete em todos

Aos meus avós Maria Tereza e Onofre (*in memoriam*) que foram os precursores de minha carreira e responsáveis pela formação do meu caráter.

Minha mãe, Maria Vera Ferreira, seu companheiro Vilmar Ferreira de Brito, meus irmãos, Régis Danilo de Brito e Marcela Ferreira de Brito, que apesar da distância, sempre me deram muita estímulo para vencer e foram a minha fonte de inspiração.

Ao meu padrinho Gabriel, minha tia Nilza, que se propuseram a me mostrar o caminho certo e me apoiaram em todas as difíceis etapas da vida.

A minha prima Alessandra e seu marido Beto, pelo companheirismo, apoio e carinho.

Aos meus tios Joel, Regina e José Maria, e minhas primas Elaine e Quênia que me incentivaram quando tudo começou e sempre me apoiaram.

A minha esposa Carolinne Pereira Douat, exemplo de dedicação e perseverança, que esteve ao meu lado em todos os momentos, me dando todo apoio e força para continuar aquilo que comecei na minha vida.

Todas essas pessoas são os meus grandes estímulos para continuar vivendo, sonhando, realizando...

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Carlos Pelleschi Taborda, exemplo de dedicação e seriedade na pesquisa, que me recebeu em seu laboratório, me orientou, ensinou e incentivou. Obrigado pelos ensinamentos, pois tudo que sei, certamente é a quem devo agradecer.

Muito Obrigado!!

Ao Professor Doutor Luiz R. Travassos, agradeço pelos ensinamentos, dedicação e também por todas as sugestões e participações neste trabalho.

Ao professor Luis Carlos Ferreira, chefe do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP o meu muito obrigado.

Aos Professores (as) Doutores (as), Benedito Corrêa, Mario Henrique, Elaine G. Rodrigues, Gil Benard, Sandro Rogério de Almeida, Rosana Puccia, Valderez Gambale, Zoilo Pires de Camargo, Patrícia da S. Cisalpino, e a todos os professores do departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo.

A todos meus companheiros e amigos do laboratório, sem nenhuma distinção, pois todos são co-responsáveis de alguma maneira pela realização deste trabalho: Shirlei A. Vieira Marques, Rubens B. Filho, Maria Valda B. dos Santos, Marcelo Barbosa da Silva, Luciana Thomaz, Cássia J. da Silva, Glauce M. G. Rittner, Bruno Paes de Camargo, Adelaide Galvão, Felipe Paes de Camargo, Felipe Augusto, Adriana Menezes, Marcia Pinto da Silva, Julian Esteban, Carmen, Maurinho.

Aos colegas da pós-graduação, Débora Moreira, Elza Helena da Silva, Ériques G. da Silva, Lucas Marques, Luiz Farinha, Marcos Auler, Flávia E. Matsumoto, Luciana Ruiz e Rinaldo Glandra, pelo convívio e apoio durante esses anos de Pós-Graduação.

Ao técnico do biotério Carlos Augusto da Silva pela sua dedicação e extremo cuidado com os animais durante todos esses anos de pesquisa.

Aos secretários do Departamento de Microbiologia e da Pós-Graduação, respectivamente: Alice Shimabuku, Ana Maria Amaral, Naíde Farripas e Celso Pereira, por seus préstimos, amizade e gentileza no atendimento.

Aos funcionários da Seção de Esterilização: Elza, José, Severina pela colaboração e apoio técnico

Aos funcionários do Serviço de Biblioteca do ICB pela ajuda e gentileza no atendimento.

Ao apoio financeiro da FAPESP, CNPq e CAPES pelo auxílio à pesquisa, possibilitando a realização deste trabalho.

E finalmente, a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

“Há homens que lutam um dia e são bons.

Há outros que lutam um ano e são melhores.

Há os que lutam muitos anos e são muito bons.

Mas há os que lutam toda vida,

esses, são os imprescindíveis”

Berthold Brecht

RESUMO

Marques, A. F. Utilização de peptídeo sintético (P10) associado ao tratamento com drogas no controle da paracoccidioidomicose experimental. 2007. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A paracoccidioidomicose (PCM), doença sistêmica de caráter granulomatoso, causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. A PCM é endêmica na América Latina e atinge principalmente indivíduos do sexo masculino com atividades econômica ligada a agricultura. Os pacientes com PCM exigem tratamento a base de sulfametoxazol/trimetoprim, anfotericina B, e derivados azólicos por longos períodos. A gp43, possui 416 aminoácidos, onde um trecho específico de 15 aminoácidos (QTLIAHTLAIRYAN) designado como (P10), é reconhecido pelos linfócitos T de camundongos e humanos. No presente estudo avaliamos o efeito aditivo da imunização do P10 com às drogas antifúngicas utilizadas no tratamento da PCM. Nossos resultados indicam um efeito aditivo entre a imunização com P10 e o tratamento medicamentoso em camundongos Balb/c infectados. Associado a redução significativa da carga fúngica no pulmão, baço e fígado desses animais, detectamos aumento dos níveis de IL-12 e IFN- γ e diminuição de IL-4 e IL-10.

Palavras-chave: P10, sulfametoxazol-trimetoprim, anergia, *P. brasiliensis*, paracoccidioidomicose, adjuvantes, Antifúngicos.

*Normas ABNT:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências e elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ABSTRACT

Marques, A. F. Use of synthetic peptide (P10) associate with antifungal drugs to the treatment in the control of experimental paracoccidioidomycosis. 2007. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, a thermal dimorphic fungus. PCM is endemic in Latin America affecting mainly rural workers. PCM treatment is mandatory currently based on sulfamethoxazole/trimethoprim, amphotericin B and azolic derivatives. The gp43 has 416-mer and mice and human T lymphocytes are stimulated by a 15-mer peptide designated as P10 (QTLIAHTLAIRYAN). In the present work we evaluated the additive effect of P10 immunization and antifungal drugs for PCM treatment. Our results showed an additive protective effect between immunization with P10 and drugs treatment with infected Balb/c mice. Associated to the reduction of fungal burden in the lung, spleen and liver we observed an increase in the levels of IL-12 and IFN- γ and reduction of IL-4 and IL-10.

Keywords: P10, sulfamethoxazole-trimethoprim, anergy, *P. brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, adjuvants, Antifungal drugs.

*Normas ABNT:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências e elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do exoantígeno de *P. brasiliensis* após ser cromatografado em coluna de imunoafinidade. 78
- Figura 2:** UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados com itraconazol, por 30 dias, associado ou não à imunização com P10, e sacrificados após 30 e 90 dias de infecção. Foram utilizados, como controles animais, somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e/ou incompleto de Freud e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$, diferença entre animais tratados apenas com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo. 81
- Figura 3:** UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com Fluconazol, por 30 dias, associado ou não à imunização com P10, e sacrificados após 30 e 90 dias de infecção. Foram utilizados, como controles animais, somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e/ou incompleto de Freud e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$, diferença entre animais tratados apenas com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo. 83
- Figura 4:** UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com cetoconazol, por 30 dias, associado ou não à imunização com P10, e sacrificados após 30 e 90 dias de infecção. Foram utilizados, como controles animais, somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e/ou incompleto de Freud, e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$, diferença entre animais tratados apenas com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo. 84
- Figura 5:** UFCs de pulmão, baço e fígado de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com anfotericina B por 30 dias com doses a cada 48 horas associado ou não à imunização com P10, e sacrificados após 30 e 90 dias de infecção. Foram utilizados como controles animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e/ou incompleto de Freud, e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$, diferença entre animais tratados apenas com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo. 85

- Figura 6:** UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com sulfametoxazol (sulfa), por 30 dias, associado ou não à imunização com P10, e sacrificados após 30 e 90 dias de infecção. Foram utilizados, como controles animais, somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e/ou incompleto de Freud, e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$, diferença entre animais tratados apenas com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo. 86
- Figura 7:** Comparação histológica dos pulmões de camundongos Balb/c infectados e tratados 48 horas após i.t. (90 dias de infecção). (A) animais infectados e não-tratados; (B) animais infectados e apenas imunizados com P10; (C) animais infectados e tratados apenas com sulfametoxazol; (D) animais infectados e tratados com sulfametoxazol associado com imunização com P10. 100 campos microscópicos foram analisados para cada grupo, encontrando os seguintes resultados: grupo A, granulomas com leveduras, 14%, e áreas não inflamadas 11%; grupo B, granulomas com leveduras, 10%, e áreas não inflamadas, 51%; grupo c, granulomas com leveduras 22%, e áreas não inflamadas, 19%; grupo D, granulomas com leveduras, 10%, e áreas não inflamadas, 51%. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas nos grupos tratados com P10. Lâminas coradas por Gomori. Aumento de 10x. 91
- Figura 8** Análise por ELISA dos diferentes isotipos presentes no soro de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente com Pb18 pós 30 e 90 dias de infecção: (a) animais somente infectados (30 dias de infecção), (b) animais infectados e imunizados com P10 (30 dias de infecção), (c) animais somente infectados (90 dias de infecção) e (d) animais infectados e imunizados com P10 (90 dias de infecção). A concentração de cada isotipo foi determinada através do ponto médio de cada curva. 92
- Figura 9:** Análise por ELISA dos diferentes isotipos presentes no soro de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente com Pb18 pós 30 e 90 dias de infecção: (a) animais tratados com fluconazol (30 dias de infecção), (b) animais tratados com fluconazol e imunizados com P10 (30 dias de infecção), (c) animais tratados com fluconazol (90 dias de infecção) e (d) animais tratados com fluconazol e imunizados com P10 (90 dias de infecção). A concentração de cada isotipo foi determinada através do ponto médio de cada curva. 94

Figura 10: Análise por ELISA dos diferentes isotipos presentes no soro de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente com Pb18 pós 30 e 90 dias de infecção: (a) animais tratados com anfotericina B (30 dias de infecção), (b) animais tratados com anfotericina B e imunizados com P10 (30 dias de infecção), (c) animais tratados com anfotericina B (90 dias de infecção) e (d) animais tratados com anfotericina B e imunizados com P10 (90 dias de infecção). A concentração de cada isotipo foi determinada através do ponto médio de cada curva.

95

Figura 11: Análise por ELISA dos diferentes isotipos presentes no soro de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente com Pb18 pós 30 e 90 dias de infecção: (a) animais tratados com itraconazol (30 dias de infecção), (b) animais tratados com itraconazol e imunizados com P10 (30 dias de infecção), (c) animais tratados com itraconazol (90 dias de infecção) e (d) animais tratados com itraconazol e imunizados com P10 (90 dias de infecção). A concentração de cada isotipo foi determinada através do ponto médio de cada curva.

97

Figura 12: Análise por ELISA dos diferentes isotipos presentes no soro de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente com Pb18 pós 30 e 90 dias de infecção: (a) animais tratados com cetoconazol (30 dias de infecção), (b) animais tratados com cetoconazol e imunizados com P10 (30 dias de infecção), (c) animais tratados com cetoconazol (90 dias de infecção) e (d) animais tratados com cetoconazol e imunizados com P10 (90 dias de infecção). A concentração de cada isotipo foi determinada através do ponto médio de cada curva.

98

Figura 13: Análise por ELISA dos diferentes isotipos presentes no soro de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente com Pb18 pós 30 e 90 dias de infecção: (a) animais tratados com sulfametoxazol (30 dias de infecção), (b) animais tratados com sulfametoxazol e imunizados com P10 (30 dias de infecção), (c) animais tratados com sulfametoxazol (90 dias de infecção) e (d) animais tratados com sulfametoxazol e imunizados com P10 (90 dias de infecção). A concentração de cada isotipo foi determinada através do ponto médio de cada curva.

100

Figura 14: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com itraconazol, por 30 dias, associado, ou não, à imunização com P10, e sacrificados após 60 e 120 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e / ou incompleto de Freud, e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$, diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

102

Figura 15: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com fluconazol, por 30 dias, associado ou não à imunização com P10, e sacrificados após 60 e 120 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e / ou incompleto de Freud, e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$, diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

103

Figura 16: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados (30 dias após i.t.) com cetoconazol, por 30 dias, associado ou não à imunização com P10, e sacrificados após 60 e 120 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e / ou incompleto de Freud, e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$, diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

104

Figura 17: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com anfotericina B, por 30 dias, com doses a cada 48 horas, associadas ou não à imunização com P10, e sacrificados após 60 e 120 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e / ou incompleto de Freud, e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$, diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

105

Figura 18: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com sulfametoxazol/trimetoprim (sulfa/trim.), por 30 dias, associado ou não à imunização com P10, e sacrificados após 60 e 120 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e / ou incompleto de Freud, e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$, diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

106

Figura 19: Comparação histológica dos pulmões de camundongos Balb/c infectados e tratados 30 dias após i.t. (120 dias de infecção). (A) animais infectados e não-tratados; (B) animais infectados e apenas imunizados com P10; (C) animais infectados e tratados apenas com sulfametoxazol; (D) animais infectados e tratados com sulfametoxazol associado com imunização com P10. 100 campos microscópicos foram analisados para cada grupo, encontrando os seguintes resultados: grupo A, granulomas com leveduras, 24%, e áreas não inflamadas 27%; grupo B, granulomas com leveduras, 15%, e áreas não inflamadas, 46%; grupo C, granulomas com leveduras 32%, e áreas não inflamadas, 26%; grupo D, granulomas com leveduras, 12%, e áreas não inflamadas, 55%. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas nos grupos tratados com P10. Lâminas coradas por Gomori, aumento de 25x.

110

Figura 20: UFCs de pulmão (P), baço (B), e fígado (F) de camundongos Balb/c anérgicos infectados intratraquealmente e imunizados com P10, e sacrificados após 45 de infecção. Foram utilizados como controles animais somente infectados e não imunizados (controle), * $p < 0,05$, diferença entre animais controle e imunizados com o peptídeo.

111

Figura 21: UFCs de pulmão (P), baço (B), e fígado (F) de camundongos Balb/c anérgicos infectados intratraquealmente e tratados (15 dias após i.t.) com Itraconazol por 30 dias associado ou não à imunização com P10, e sacrificados após 45 dias de infecção. Foram utilizados como controles animais somente infectados e não tratados/imunizados (controle),* $p < 0,05$, diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

113

Figura 22: UFCs de pulmão (P), baço (B), e fígado (F) de camundongos Balb/c anérgicos infectados intratraquealmente e tratados (15 dias após i.t.) com sulfametoxazol/trimetopim (sulfa/trim.) por 30 dias associado ou não à imunização com P10, e sacrificados após 45 dias de infecção. Foram utilizados como controles animais somente infectados e não tratados/imunizados (controle),* $p < 0,05$, diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

113

Figura 23: UFCs de pulmão (P), baço (B), e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente (90 dias de infecção) com 3×10^5 leveduras e imunizados com P10 associado a diferentes adjuvantes após 30 dias de infecção. (P10) imunização com o peptídeo sem a presença de adjuvante, (alumen) P10+hidróxido de alumínio, (MPLA) P10+Monofosforilipídeo A, (ACF) P10+adjuvante completo de Freund.* $p < 0,05$, diferença entre animais infectados e imunizados com diferentes tipos de adjuvantes em relação ao controle, infectados/não imunizados.

114

Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Resultados obtidos segundo a técnica da macrodiluição. Valores mínimos e máximos da inibição do *P. brasiliensis* encontrados nos testes *in vitro* das drogas anfotericina B (fungizon® Bristol Mayers Squibb, Brasil), cetoconazol (Janssen-Cilag® Brasil), fluconazol (Pfizer® USA) itraconazol (Janssen-Cilag® Brasil) e sulfametoxazol (Sigma, St. Louis, MO), sulfametoxazol/trimetoprim (Bac-sulfitrin, Ducto Brasil). 80
- Tabela 2:** Dosagens de citocinas pelo método Elisa de homogeneizado dos pulmões de camundongos Balb/c, infectados por via intratraqueal com 3×10^5 cels de *P. brasiliensis* e tratados com as drogas antifúngicas, associado ou não à imunização com P10, e sacrificados com 30 e 90 dias de infecção. Os valores destacados em negrito indicam a predominância das respostas Th1/Th2 de acordo com as citocinas produzidas (IL-12/INF- γ ou IL-4/IL-10, respectivamente).*, significância ($p < 0,05$) em relação aos camundongos tratados apenas com as drogas; #, significância ($p < 0,05$) relativa aos camundongos tratados com as drogas associado à imunização com P10. 89
- Tabela 3:** Dosagens de citocinas pelo método Elisa de homogeneizado dos pulmões de camundongos Balb/c, infectados por via intratraqueal com 3×10^5 cels de *P. brasiliensis* e tratados com as drogas antifúngicas, associado ou não à imunização com P10, e sacrificados com 60 e 120 dias de infecção. Os valores destacados em negrito indicam a predominância das respostas Th1/Th2 de acordo com as citocinas produzidas (IL-12/INF- γ ou IL-4/IL-10, respectivamente). #, significância ($p < 0,05$) relativa aos camundongos tratados apenas com as drogas; *, significância ($p < 0,05$) relativa aos camundongos tratados com as drogas associado à imunização com P10. 108

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
AcM	Anticorpo Monoclonal
Ac18	Anticorpo contra CD18
ATPase	Enzima que atua sobre a Adenosina trifosfato
B	Baço
BHI	'brain heart infusion (infusão de cérebro e coração)
BSA	Soro Albumina Bovina
°C	Graus celcius
CBB	"Comassie Brilliant Blue"
CIM	concentração inibitória mínima
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	Densidade Ótica
E ₂	17 - beta - estradiol
ELISA	"Enzyne Linked Immuno Sorbent Assay"
ESR	Ressonância da Rotação de Elétrons
F	Fígado
FeSO ₄	Sulfato ferroso
FcγR	Receptor da fração Fc das imunoglobulinas
G	Gramas
Gp43	Glicoproteína de 43 kDa
h	horas
H ₂ O	Água
HTT	Hipersensibilidade Tipo Tardio

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Acido clorídrico
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IFN	Inteferon gama
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina 1
IgG3	Imunoglobulina 3
IgG2a	Imunoglobulina G isótipo 2a
IgG2b	Imunoglobulina G isótipo 2b
IL-4	Interleucina 4
IL- 5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
i.t.	Intratraqueal
Kg	Kilogramas
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio
KO	“Knockout”
M	Molar
mM	Mili Molar
MgSO ₄ .	Sulfato de magnésio
MnSO ₄	Sulfato de manganês
Mg	Miligramas

MI	Mililitros
Min	Minutos
MMcM	Meio líquido quimicamente definido
MPLA	Monofosforilipidio A
μl	Microlitros
μg	Microgramas
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	“National Center of Biothechnology Information”
Nm	nanômetro
N ₂	Nitrogênio líquido
N3	Nitrogênio ligado ao carbono 3
P10	Peptídeo 10
Pb 18	<i>Pacoccidioides brasiliensis</i> isolado 18
PBS	Fosfate buffer saline
PCM	Paracoccidioidomicose
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Ponto isoelétrico
p/v	peso/volume
rIL-12	Interleucina 12 recombinante
TNF-α	Receptor de fator de necrose tumoral-alfa
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio-Poliacrilamida em Gel de Agarose
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SPF	Specific Pathogen Free,
SZM-TMP	sulfametoxazol-trimetoprim

Th1	Linfócito T “helper” 1
Th2	Linfócito T “helper 2”
TCD4+	Linfócito T CD4 positivo
TGF- β	“Transforming Growth Factor-beta
TMB	“Tetramethiylbenzidine”
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
T20	Tween 20
UFC	Unidade formadora de colônia
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
1.1 Paracoccidioidomicose e seu agente etiológico.....	28
1.2 Paracoccidioidomicose humana.....	32
1.3 Paracoccidioidomicose e Síndrome da imunodeficiência Adquirida.....	37
1.4 Tratamento na Paracoccidioidomicose.....	39
1.4.1 Drogas usadas no tratamento da PCM.....	41
1.4.1.1 Derivados Sulfonamídicos.....	41
1.4.1.1.1 Sulfadiazina.....	41
1.4.1.1.2 Sulfametoxazol-trimetoprim.....	41
1.4.1.2 Derivados Azólicos.....	42
1.4.1.2.1 Cetoconazol.....	43
1.4.1.2.2 Itraconazol.....	44
1.4.1.2.3 Fluconazol.....	45
1.4.1.3 Anfotericina B.....	49
1.5 A virulência do fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....	49
1.6 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e a Gp43.....	53
1.7 Paracoccidioidomicose e Imunidade.....	56
2 OBJETIVOS	64
2.1 Objetivo geral.....	64
2.2 Objetivo específicos.....	64
3 MATERIAL E MÉTODOS	65
3.1 Animais.....	65
3.2 Fungo.....	65
3.3 Produção do exoantígeno de <i>P. brasiliensis</i>.....	65

3.4 Dosagem de proteínas.....	66
3.5 SDS-PAGE.....	66
3.6 Agentes antimicrobianos.....	68
3.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	68
3.8 Síntese e Purificação do Peptídeo (P10).....	70
3.9 Infecção: Preparo do inóculo.....	70
3.10 Determinação da viabilidade das leveduras.....	70
3.11 Infecção Intratraqueal (i.t.).....	70
3.12 Terapia com drogas antimicrobianas.....	71
3.12.1 Primeiro protocolo.....	71
3.12.2 Segundo protocolo.....	71
3.13 Imunização dos camundongos.....	72
3.14 Grupos utilizados.....	72
3.15 Avaliação do Grau de infecção.....	73
3.16 Detecção por ELISA de anticorpos (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) anti-gp43 com 30 e 90 dias de infecção (1º protocolo).....	74
3.17 17 Caracterização das Citocinas: ELISA para a Quantificação de IL-4, IL-10 IL-12 e IFN- γ	74
3.18 Histopatologia.....	75
3.19 Imunossupressão dos Camundongos Balb/c.....	75
3.20 Reação de HTT.....	76
3.21 Terapia com drogas antimicrobianas nos animais anérgicos.....	76
3.22 Análise de diferentes adjuvantes associados com P10, e P10 apenas, usados para tratar camundongos Balb/c infectados com <i>P. brasiliensis</i>	76
3.23 Análise Estatística.....	77

4 RESULTADOS	78
4.1 Purificação da glicoproteína de 43 kDa (gp43).....	78
4.2 Teste de sensibilidade dos antimicrobianos frente ao isolado virulento de Pb18.....	79
4.3 Unidades Formadoras de colônias - 1º protocolo: Avaliação do grau de infecção dos animais com o tratamento iniciado 48h após a infecção intratraqueal: (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção).....	80
4.3.1 Camundongos Balb/c infectados e tratados com itraconazol, imunizados ou não com peptídeo 10 (P10).....	80
4.3.2 Camundongos Balb/c infectados e tratados com itraconazol, imunizados ou não com peptídeo 10 (P10).....	81
4.3.3 Camundongos Balb/c infectados e tratados com cetoconazol, imunizados ou não com P10.....	83
4.3.4 Camundongos Balb/c infectados e tratados com anfotericina B, imunizados ou não com P10.....	84
4.3.5 Camundongos Balb/c infectados e tratados com sulfametoxazol, imunizados ou não com peptídeo 10 (P10).....	85
4.4 Padrões das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, e IFN-γ nos camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados com intervalo de 48 h após a infecção com as drogas antifúngicas associadas ou não à imunização com P10. (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção).....	86

4.5 Histologia do pulmão de camundongos Balb/c tratados com sulfametoxazol, 48h após a infecção intratraqueal e associados ou não com o peptídeo 10 (P10). (Animais sacrificados com 30 e 90 dias de infecção).....	90
4.6 Detecção de anticorpos contra a gp43 de <i>P. brasiliensis</i> em camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal com o isolado virulento de Pb18, imunizados ou não com P10, sem administração das drogas antifúngicas (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção).....	91
4.7 Detecção de anticorpos contra gp43 de <i>P. brasiliensis</i> em camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados com intervalo de 48 h após infecção com fluconazol associado ou não à imunização com P10. (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção).....	92
4.8 Detecção de anticorpos contra gp43 de <i>P. brasiliensis</i> em camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados com intervalo de 48 h após infecção com anfotericina B associado ou não à imunização com P10. (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção).....	94
4.9 Detecção de anticorpos contra gp43 de <i>P. brasiliensis</i> em camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados com intervalo de 48 h após infecção com itraconazol associado ou não à imunização com P10. (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção).....	96

4.10 Detecção de anticorpos contra gp43 de <i>P. brasiliensis</i> em camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados, com intervalo de 48 h após infecção, com Cetoconazol associado ou não à imunização com P10. (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção).....	97
4.11 Detecção de anticorpos contra gp43 de <i>P. brasiliensis</i> em camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados com intervalo de 48 h após infecção com sulfametoxazol associado ou não à imunização com P10. (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção).....	99
4.12 Unidades Formadoras de colônias - 2º protocolo: Avaliação do grau de infecção dos animais com o tratamento iniciado 30 dias após a infecção intratraqueal: (Os animais foram sacrificados com 60 e 120 dias de infecção).....	100
4.12.1 Camundongos Balb/c infectados e tratados com itraconazol, imunizados ou não com peptídeo 10 (P10).....	101
4.12.2 Camundongos Balb/c infectados e tratados com fluconazol, imunizados ou não com peptídeo 10 (P10).....	102
4.12.3 Camundongos Balb/c infectados e tratados com cetoconazol, imunizados ou não com peptídeo 10 (P10).....	103
4.12.4 Camundongos Balb/c infectados e tratados com anfotericina B, imunizados ou não com peptídeo 10 (P10).....	104
4.12.5 Camundongos Balb/c infectados e tratados com sulfametoxazol/trimetoprim, imunizados ou não com peptídeo 10 (P10).....	105

4.13 Padrões das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, e IFN- γ nos camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados com intervalo de 30 dias após a infecção com as drogas antifúngicas associadas ou não à imunização com P10.....	106
4.14 Histologia do pulmão de camundongos Balb/c tratados com antifúngicos, 30 dias após a infecção intratraqueal, e associados, ou não, com o P10 (os animais foram sacrificados com 60 e 120 dias de infecção).....	109
4.15 Análise da eficácia da imunização com P10 em animais apresentando anergia induzida por fosfato de dexametasona.....	110
4.15.1 Unidades formadoras de colônias dos camundongos Balb/c anergicos infectados e imunizados com Peptídeo 10 (P10):.....	111
4.15.2 Unidades formadoras de colônias dos camundongos Balb/c induzidos à anergia, infectados e tratados com itraconazol, imunizados ou não com peptídeo 10 (P10).....	112
4.15.3 Unidades formadoras de colônias dos camundongos Balb/c induzidos à anergia, infectados e tratados com Sulmatetoxazol/trimetoprim, imunizados ou não com peptídeo 10 (P10).....	113
4.16 Utilização de diferentes adjuvantes associados à imunização com P10 no tratamento da paracoccidiodomicose experimental.....	113
5 DISCUSSÃO	115
6 CONCLUSÕES.....	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

1 INTRODUÇÃO

1.1 Paracoccidioidomicose e seu agente etiológico

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença crônica, de caráter granulomatoso. Seu agente etiológico é o fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, descrito, pela primeira vez, por Adolpho Lutz, em 1908. É endêmica em países da América Latina, desde o México (23°N) até a Argentina, com prevalência em países da América do Sul (revisão em RESTREPO, 2001). No território brasileiro, a incidência dessa micose é maior nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (WANKE et al., 1994). Em relação à situação atual da PCM, existe uma carência de dados na América Latina, mas um estudo realizado por McEwan e colaboradores (1987) sugeriu que cerca de 10 milhões de pessoas que vivem em regiões endêmicas podem ter entrado em contato com o fungo *P.brasiliensis*, onde cerca de 2% poderão desenvolver a doença. Estudos epidemiológicos conduzidos por Coutinho e colaboradores (2002) apresentaram dados referentes à mortalidade provocada pela PCM, em regiões brasileiras, entre os anos de 1980 e 1995. As maiores taxas de mortalidade por ano ocorreram na região Sudeste e Sul, especificamente em São Paulo (59,38%), Paraná (28,9%), Minas Gerais (24,9%) e Rio Grande do Sul (17,50%). Foram observados, também, dados referentes às outras regiões como Norte, Nordeste e Centro-Oeste, nas quais os Estados mais afetados foram Rondônia (3,19%), Pará (3,13%), Bahia (3,69%), Maranhão (1,38%), Mato Grosso do Sul (7,19%) e Goiás (6,19%). A taxa anual de mortalidade detectada foi de 1,45/milhão de habitantes. A incidência e a mortalidade por PCM no Estado de Rondônia, por exemplo, estão entre as maiores do Brasil, com índices de mortalidade que variam de 3 a 4,39 para cada 1.000.000 de habitantes. Dados

recentes em relação à doença no Brasil (comunicação pessoal, Dra. Marli Prado Bueno) mostram que entre os anos de 1996 – 2004 ocorreram 915 óbitos no agrupamento da PCM, sendo 313 óbitos (33,11%) por PCM pulmonar, 49 por PCM disseminada (5,36%), 38 por outras formas de PCM (4,15%) e 525 (57,38%) por PCM não especificada.

Acreditava-se que a PCM fosse restrita às pessoas vinculadas à zona rural. Alguns pesquisadores, entretanto, relataram a presença da doença em trabalhadores da indústria, comércio e em crianças de áreas urbanas (GREER et al., 1977; EMANUEL et al., 1983; BITTENCOURT et al., 1986). A presença da PCM em áreas urbanas pode ser explicada pela migração de indivíduos infectados que adoecem nos grandes centros, onde são diagnosticados. Um levantamento realizado por Forjaz, em 1989, indicou que o fluxo migratório de outros Estados para a grande São Paulo, até aquela data, foi de 67,7%, para um total de 130 pacientes estudados em um inquérito epidemiológico. Tomando-se como período mínimo um ano de permanência, 80,8% dos pacientes tinham desempenhado atividades na lavoura e somente 18,5% permaneciam em trabalhos rurais ao surgirem os sintomas. Somente dois indivíduos não tiveram contato anterior com o meio rural. Os casos relatados nos EUA, África, Europa e Ásia são conhecidos como *doença de importação*, devido ao fato dos pacientes terem residido em regiões endêmicas em época anterior à manifestação clínica da micose.

Deve-se salientar que a maior parte da população, mesmo em áreas endêmicas, é resistente à doença em sua forma manifesta, onde, apesar de estabelecido o contato com o fungo e o conseqüente desenvolvimento de reações positivas de hipersensibilidade de tipo tardio (HTT), a maioria dos indivíduos não

desenvolve a doença (FAVA-NETTO et al., 1961; RESTREPO, 1985; BRUMMER et al., 1993; GOLDANI et al., 1994; SOUZA et al., 2000; SEMIGHINI et al., 2002).

A PCM raramente é observada em crianças e jovens, sendo mais incidente em homens com idade entre 30 e 50 anos. A mulher está mais protegida da doença, devido à presença de estrógenos endógenos que atuam através de proteínas ligantes no citosol dos fungos, inibindo a transformação de micélio em levedura (STOVER et al., 1986). Muchmore e colaboradores (1974) verificaram que o hormônio feminino 17- β -estradiol (E_2), em condições fisiológicas, inibia o crescimento das células leveduriformes. Foi demonstrado que o tratamento de culturas de *P. brasiliensis* com E_2 alterava a expressão de proteínas durante a fase de transição micélio-levedura (CLEMONS et al., 1989). O E_2 pode, portanto, através desses mecanismos, interferir na patogenicidade do *P. brasiliensis*.

Após a descrição do fungo *P. brasiliensis* por Adolpho Lutz, em 1908, iniciou-se uma fase de estudos das principais características do agente infectante, como diferenças morfológicas e temperatura de cultivo. Splendore, em 1912, sugeriu a classificação do agente no gênero *Zymonema*, recebendo, assim, a denominação de *Zymonema brasiliense*. A doença passou, então, a ser denominada de "blastomicose brasileira" e, logo a seguir, "blastomicose sul-americana", já que foram relatados casos isolados em outros países da América do Sul. Após estudos sistematizados, cria-se um novo gênero dentro do reino *Fungi* - o *Paracoccidioides*, revalidando o nome da espécie criada por Splendore, em 1912. Em 1930, Floriano Paulo de Almeida oficializou o nome *Paracoccidioides brasiliensis* (ALMEIDA, 1930). Taxonomicamente, o fungo *P. brasiliensis* foi, inicialmente, classificado por Ajello (1977) da seguinte forma: Reino *Fungi*, Filo *Eumycota*, Subdivisão *Deuteromycotina*, Classe *Hyphomycetes*, Ordem *Moniales*, Família *Moniliaceae*, Gênero

Paracoccidioides e Espécie *brasiliensis*. Espécie *brasiliensis*. Contudo, outra classificação foi proposta, pois estudos filogenéticos empregando ferramentas moleculares posicionaram o agente etiológico da PCM junto aos demais fungos dimórficos (*Coccidioides posadasii*, *C. immitis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum*) como pertencentes à seguinte categoria taxonômica: Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Pleomycetes*, Ordem *Onigenales*, Família *Onygenaceae*, Gênero *Paracoccidioides* e Espécie *brasiliensis*, sendo denominado, então, de *Paracoccidioides brasiliensis*. Há poucos dados a respeito da forma em que o fungo *P. brasiliensis* encontra-se na natureza (RESTREPO, 1985); entretanto, Negroni (1966) e Albornoz (1971) isolaram o fungo *P. brasiliensis* do solo. A partir de então, estudos a respeito do habitat do fungo começaram a ser realizados. Silva-Vergara e colaboradores (1998) isolaram o fungo a partir de solo de regiões com plantação de café no Estado de Minas Gerais, sugerindo que esse é um dos habitats do fungo *P. brasiliensis*, reafirmando, assim, a hipótese da PCM ser comum nas áreas agrícolas. Naiff e colaboradores (1986) isolaram o fungo do tatu (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará e Silva-Vergara e colaboradores (2000), no Estado de Minas Gerais, mostrando a freqüente ocorrência da PCM nesse mamífero e seu papel como possível hospedeiro silvestre no ciclo epidemiológico do fungo *P. brasiliensis*. Outros estudos descrevem o isolamento do fungo de animais infectados como cachorros (FARIAS et al., 2005), espécies de macacos (JOHNSON; NAIFF, 1996) e pingüins (GARCIA et al., 1993; GEZUELE, 1989), sendo que, provavelmente, esses animais foram infectados a partir de solos contaminados com o fungo (FRANCO et al., 2000).

O nicho ecológico do fungo *P. brasiliensis* ainda não foi determinado (RESTREPO et al., 2001). Borelli (1972) criou o termo “reservarea” para indicar o

seu habitat natural, ou seja, o local onde o indivíduo pode infectar-se com o fungo. Essas regiões normalmente estão sob a influência de um clima tropical, apresentando verão quente e úmido, com inverno frio e seco. As “reservareas” ficam, freqüentemente, em lugares elevados, próximos a rios e a outros cursos de água. A mais importante condição climática para o crescimento desse microrganismo parece ser a temperatura, que varia entre 18 °C e 24 °C (RESTREPO-MORENO, 1994). Com base no diagnóstico da PCM em residentes locais, 14 “reservareas” foram identificadas no Brasil, as quais estão localizadas à margem de rios, colinas com altitudes entre 52 e 950 metros acima do nível do mar e em áreas com vegetação, estendendo-se desde florestas tropicais até savanas (WANKE e LONDERO, 1994).

1.2 Paracoccidioidomicose humana

Conídios produzidos por micélios saprófitas no meio ambiente são responsáveis pela propagação da doença e, quando são inalados, instalam-se nos pulmões, transformando-se em leveduras (FRANCO et al., 1989; McEWAN et al., 1987). A PCM começa como uma discreta e simples pneumonia assintomática que se dissemina para superfícies mucocutâneas, trato gastrintestinal, linfonodos e outros órgãos (LONDERO et al., 1972; RESTREPO et al., 1970, 1973).

A PCM humana, em sua etiopatologia, assemelha-se muito à coccidioidomicose e à blastomicose norte-americana. A interação de fatores intrínsecos ao hospedeiro, como estado nutricional, sexo, idade, genética, integridade do sistema imunológico e fatores relacionados ao próprio fungo determinam a relação entre parasita e hospedeiro, que será estabelecida após a

penetração do fungo no organismo (FAVA-NETTO et al., 1965; LACAZ, 1977; FRANCO e MONTENEGRO, 1982).

Na doença humana tem-se registrado a relação entre antígenos de histocompatibilidade, HLA e incidência da doença. O HLA é um componente fundamental do sistema imune, que exerce um papel importante no processo de apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T, resultando, ou não, em uma resposta imunológica eficiente. Devido ao grande polimorfismo do HLA na população, a resposta imunológica contra determinados patógenos poderá variar entre os indivíduos que expressam HLAs distintos.

Restrepo e colaboradores (1983), na Colômbia, analisaram a frequência de HLA em pacientes com PCM e indivíduos normais. Os autores observaram que somente dois HLAs (A9 e B13) aumentaram significativamente nos pacientes, sendo que o antígeno A9 prevaleceu nos indivíduos com a forma progressiva da doença. Esses resultados sugeriram que o HLA-A9 poderia estar envolvido na susceptibilidade à doença. No Brasil, Goldani e colaboradores (1991) relataram o aumento na frequência de haplótipos HLA-B40-Cw1 e HLA-A2-B40 nos pacientes com PCM, sugerindo possível interação entre esses antígenos. Rebellato (1996) estudou pacientes com PCM infecção e forma crônica da doença, determinando a frequência de antígenos HLA classe I e Classe II, e Dias e colaboradores (2000) analisaram somente HLA classe I em pacientes com a forma crônica da PCM. Esses autores não observaram quaisquer relações entre HLA e doença. Embora pesquisas iniciais utilizando provas sorológicas de microlinfocitotoxicidade tenham encontrado associação entre HLA classe I e paracoccidioidomicose, nos trabalhos publicados após 1991, com o emprego das mesmas provas anti-soros específicos, essas associações não foram observadas.

A PCM tem múltiplas manifestações, e duas formas clínicas progressivas são reconhecidas: forma aguda ou subaguda (tipo juvenil) e a forma crônica (tipo adulto); entretanto, ambas as formas clínicas e o curso da doença sofrem variações de paciente para paciente (FRANCO, 1986; FRANCO et al., 1994 e 1989; LACAZ et al., 1959). As formas agudas e subagudas estão relacionadas com extensas seqüelas, associadas às infecções sistêmicas e à uma resposta imune-celular deficiente. A PCM juvenil acomete adultos com menos de 30 anos e crianças de ambos os sexos, sendo responsável por 3% a 5% dos casos. A forma juvenil da paracoccidioidomicose desenvolve-se mais rapidamente, de algumas semanas a meses, sendo mais severa, levando à significativa taxa de mortalidade, devido, principalmente, à hipertrofia dos órgãos do sistema retículo endotelial (INES BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

A PCM adulta é a forma mais freqüente e normalmente evolui a partir de focos quiescentes do fungo, após um período indeterminado de latência. A forma crônica ou adulta da paracoccidioidomicose abrange cerca de 90% dos casos, afetando, principalmente, homens adultos acima de 35 anos. A doença avança lentamente, podendo levar meses ou anos para desenvolver-se totalmente; afeta, primariamente, os pulmões (forma unifocal), podendo, eventualmente, causar lesões mucocutâneas com disseminação, ou não, para outros órgãos (forma multifocal) e tecidos, causando lesões secundárias em mucosas, pele, linfonodos e glândulas adrenais (INES BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

A doença no homem pode desenvolver-se logo após a infecção ou anos depois, pois o fungo *P. brasiliensis* tem a capacidade de permanecer quiescente no pulmão por um período de tempo indeterminado (RESTREPO et al., 1981). Quando a doença desenvolve-se, pode ficar contida nos pulmões ou disseminar-se para

outros órgãos ou sistemas através da via hematogênica e/ou linfática, causando lesões secundárias (FRANCO et al., 1986). O estabelecimento da doença, sua disseminação e gravidade dependem, de um lado, de fatores ligados ao fungo, como virulência e composição antigênica e, de outro, de fatores ligados à resposta imune do hospedeiro. Assim, nos pacientes com PCM, observa-se que formas graves da doença são acompanhadas pela perda gradual de respostas imunes-celulares específicas e por altos títulos de anticorpos, já formas mais brandas, tendendo à cura, são concomitantes a respostas celulares preservadas e baixos níveis de anticorpos específicos (FRANCO et al., 1989; FRANCO & MONTENEGRO, 2000).

Vários autores têm relatado a utilização de animais como modelos experimentais para o estudo da PCM. As linhagens de camundongos foram classificadas dentro de quatro grupos relacionados à susceptibilidade à infecção pelo *P. brasiliensis*: grupo muito resistente (DBA/2, A/J e A/Sn); grupo resistente (C3H/He); grupo intermediário (C3H/HeB, CBA, C57Bl/10 e BALB/c) e grupo muito sensível (B10.D2/nSn, B10.A e B10.D2/oSn) (CALICH et al., 1985, 1994). Neste mesmo trabalho, foi observado que as fêmeas de camundongos BALB/c e B10D2/nSn foram, significativamente, mais resistentes que os machos (CALICH et al., 1985). Todos os estudos foram baseados no tempo de sobrevivência dos camundongos infectados por via intraperitoneal com Pb18, isolado virulento de *P. brasiliensis*.

Na PCM experimental, camundongos resistentes e susceptíveis à infecção intraperitoneal com o fungo *P. brasiliensis*, isolado virulento (Pb18), reproduzem, respectivamente, as formas crônicas brandas e graves da doença (CALICH et al., 1985). Camundongos suscetíveis, da linhagem B10a, tendem à resposta imune-

humoral, com comprometimento da imunidade celular; tais animais apresentam secreção preferencial de anticorpos de isótipos IgA e IgG_{2b}, baixa produção de Interferon-gama (IFN- γ), secreção precoce de altos níveis de interleucina-5 (IL-5) e IL-10, eosinofilia, desenvolvimento progressivo de anergia a antígenos específicos do fungo *P. brasiliensis* em reações de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) e ativação reduzida e efêmera de macrófagos e polimorfonucleares neutrófilos, o que leva ao desenvolvimento de uma doença progressiva. Por outro lado, camundongos resistentes, da linhagem A/J, tendem à resposta imune-celular, em detrimento da imunidade humoral; esses animais apresentam controle da multiplicação fúngica em diversos órgãos e tecidos, secreção preferencial de anticorpos do isótipo IgG_{2a}, produção contínua de IFN- γ e IL-2, manutenção de reações de HTT a antígenos específicos do fungo *P. brasiliensis* e ativação continuada de macrófagos e neutrófilos, o que conduz à resolução do processo infeccioso. Em relação à PCM murina, salienta-se que não há o desenvolvimento de perfis Th1/Th2 inteiramente polarizados, embora a secreção de IL-12 e IFN- γ seja considerada fundamental para o desenvolvimento de proteção, e a predominância de IL-10 e o fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) estejam ligados à suscetibilidade à infecção. É, ainda, importante notar que camundongos resistentes apresentam ativação equilibrada e progressiva de linfócitos T CD4+, nos suscetíveis; essa ativação é bem mais intensa e precoce (CALICH and KASHINO, 1998). Outro resultado importante foi relatado por Arruda e colaboradores (2004) em camundongos, que demonstraram o duplo papel da IL-4 na PCM, sendo que essa citocina poderá induzir proteção ou exacerbação da doença, dependendo do padrão genético do hospedeiro. Em camundongos B10 A, depletados para IL-4, surpreendentemente, houve exacerbação da infecção pulmonar, embora somente pequenas alterações no

padrão de imunidade celular e humoral tenham sido detectadas. Em contraste, os camundongos C57BL/6 depletados para IL-4 apresentaram quadros menos graves quando comparados aos camundongos não-depletados, sendo esse fato associado à produção reduzida de citocinas Th2 e a níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias. Esses dados demonstram que IL-4 deva exercer, também, funções importantes no controle da infecção fúngica, e não somente contrapondo as ações das citocinas da resposta Th1.

1.3 Paracoccidioidomicose e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

A Organização Mundial de saúde estimava, no final de 2002, a existência de cerca de 1.500.000 indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) na América Latina, sendo 170.000 os submetidos a tratamento anti-retroviral, no Brasil. Devido à prevalência relativamente alta da PCM em nosso meio, seria de se esperar um número apreciável de casos de co-infecção (GOLDANI et al., 1995; MARQUES et al., 2000; United Nations on AIDS/World Health Organization). Porém, uma revisão da literatura disponível mostrou pouco mais de uma centena de casos registrados, sendo quase todos na América Latina e perto de 90% deles no Brasil. (NOBRE JUNIOR et al., 2003; PEDRO et al., 1989; SILVA-VERGARA et al., 2003)

Entre as hipóteses que tentam explicar esse paradoxo está o uso de sulfametoxazol-trimetoprim (SZM-TMP) e de derivados azólicos para o controle ou a profilaxia de infecções oportunistas, erros de diagnósticos e fatores epidemiológicos (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida predomina nas cidades, PCM no meio rural) (CORTI et al., 1995; GOLDANI et al., 1995, KARP et al., 1999; MARQUES et al., 2000). Além do comprometimento imune pelo HIV da AIDS, existem na PCM alterações na função imunitária, entre as quais estão a supressão

da resposta mediada por células, ativação policlonal dos linfócitos B e elevação dos níveis de IgE (KARP et al., 1999; MOTA et al., 1985). Embora os neutrófilos participem da resposta imunitária inicial ao fungo, predomina nos tecidos a reação do tipo granulomatosa (GOLDANI et al., 1995; LABUKI e MONTENEGRO 1979). Os níveis de CD4+ parecem ser essenciais à resposta proliferativa e à produção de anticorpos. Observa-se que na PCM/SIDA a resposta imunitária é pobre, similar a que ocorre na aguda/subaguda da infecção pelo *P. brasiliensis* em pacientes HIV negativos (BENARD e DUARTE 2000; MARQUES et al., 2000; SILVA-VERGARA et al., 2003).

Tendo em vista a limitação dos dados disponíveis, não é possível fazer qualquer recomendação com base em evidências científicas sobre a duração da terapêutica antifúngica nesses pacientes. Contudo, a exemplo de outras infecções fúngicas invasivas de ocorrência em AIDS, sugere-se que, em pacientes com estado avançado de AIDS e manutenção da contagem de células CD4 abaixo de 200 ml^{-1} , a droga antifúngica seja mantida indefinidamente. Em pacientes que apresentem controle da infecção pelo HIV, com negativação da carga viral e recuperação de linfócitos $\text{CD4} \geq 200 \text{ ml}^{-1}$, pode-se considerar a opção de suspensão da profilaxia secundária, uma vez atingidos os critérios de cura da PCM. São necessários, no entanto, estudos prospectivos para validar essa orientação. (Consenso em paracoccidiodomicose, 2006).

O diagnóstico de PCM deve ser considerado em todo paciente com SIDA que apresente febre prolongada, emagrecimento, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia e/ou lesões cutâneas, desde que não esteja em uso de SMT-TMP ou derivados azólicos, uma vez excluídas as infecções prevalentes. (GOLDANI et al., 1995).

A associação PCM/SIDA é comumente caracterizada pelo acometimento do sistema fagocitário-nuclear, tal como descrito na forma juvenil aguda ou subaguda dos indivíduos imunocompetentes. Nos casos descritos, existe ampla variação das manifestações clínicas, desde evolução indolente até características da forma aguda, porém com envolvimento mucoso (cavidade oral e/ou trato respiratório inferior), próprio da forma crônica. Essa superposição, denominada forma mista, assim como a freqüente presença de lesões cutâneas, não é vista como regra em indivíduos HIV negativos. (BENARD e DUARTE 2000; LIMA et al., 1995; MARQUES et al., 1995 e 2000; SILVA-VERGARA et al., 2003).

A história natural da PCM em pacientes imunossuprimidos, especialmente na SIDA, vem demonstrando correlação direta entre o grau de imunossupressão, com $CD4^+ < 100\text{mm}^3$, e a coexistência de outras infecções oportunistas. Essas foram observadas em 37% de uma série de 79 casos revistos (BENARD e DUARTE, 2000). É oportuno enfatizar a necessidade de se considerar, sempre, a possibilidade de ocorrência de PCM na SIDA, eventualmente, com primeira manifestação, isolada ou com outros agentes infecciosos.

1.4 Tratamento na Paracoccidioidomicose

Organismos pertencentes ao reino Fungi assemelham-se às células eucarióticas humanas, possuindo similaridades bioquímicas e fisicoquímicas, o que limita a viabilidade dos recursos terapêuticos (HANDAM et al., 1998). O tratamento de pacientes com PCM exige terapia prolongada, para se obter um resultado razoavelmente bem-sucedido (MENDES et al., 1994).

Testes de susceptibilidade *In vitro* do fungo *P. brasiliensis* frente aos derivados azólicos, à anfotericina B e às sulfas têm sido relatados por diversos

pesquisadores (HANDAM et al., 1998; LACAZ et al., 1959; MARQUES et al., 1983; RESTREPO et al., 1980; SAN-BLÁS et al., 1993; STEVENS et al., 1982). Os resultados mostrados em alguns desses trabalhos indicam diferenças de susceptibilidade das formas de micélio e de levedura do *P. brasiliensis* (HEINZ-VACCARI et al., 1998; SAN-BLÁS et al., 1993). Nos testes para a determinação da concentração inibitória mínima de antifúngicos frente ao *P. brasiliensis*, são utilizadas diferentes técnicas, onde podem observar-se algumas discrepâncias nos resultados. Somente uma padronização para esse procedimento poderia diminuir as diferenças observadas como, por exemplo, os métodos estabelecidos pela NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 1997), adotados principalmente para leveduras como *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, que passaram por um processo similar antes de sua padronização. Mesmo essa metodologia, já na sua terceira versão, não foi padronizada para a forma de micélio. MacGinnis e colaboradores (1997), entretanto, utilizaram esse método introduzindo modificações como tempo e morfologia da fase de micélio do inóculo. Esses testes *in vitro* poderão contribuir na adaptação de uma dosagem menos tóxica para um tratamento *in vivo*. Os estudos experimentais em animais poderão não só readaptar essas dosagens, mas, ainda, verificar a toxicidade, a interação entre quimioterápicos, assim como uma imunização definitiva da doença.

O manejo terapêutico da PCM deve, obrigatoriamente, incluir medidas de suporte às complicações clínicas associadas ao envolvimento de diferentes órgãos pela micose, além da terapêutica antifúngica específica. Os pacientes deverão ser acompanhados periodicamente, até apresentarem os critérios de cura. Diferentes de outros fungos patogênicos, *P. brasiliensis* é fungo sensível à maioria das drogas antifúngicas, inclusive aos sulfamídicos. Conseqüentemente, vários antifúngicos

podem ser utilizados para o tratamento desses pacientes, tais como anfotericina B, sulfamídicos (sulfadiazina, associação sulfametoxazol/trimetoprim) e azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol), (Consenso em paracoccidiodomicose, 2006).

O tratamento recomendado, atualmente, para a PCM consiste em duas etapas: uma inicial, ou fase de indução, e outra, fase de manutenção. O tratamento de fase inicial consiste em aliviar os sintomas e normalizar os marcadores da fase ativa da doença. A fase de manutenção consiste na interrupção do tratamento baseado em dados imunológicos ou por imagem (SHIKANAI-YATSUDA, 2005).

A proposta da fase de indução foi baseada na necessidade de se administrar, em casos graves, drogas mais ativas que são, algumas vezes, mais tóxicas, o que torna mais difícil a definição da posologia e a rota de administração. Após a doença ter caminhado para o controle, é recomendado que o tratamento consista de drogas menos tóxicas e mais fáceis de serem administradas (uma ou duas vezes ao dia), como a droga sulfametoxazol/trimetoprim, que é lentamente excretada, favorecendo a implantação ao regime de tratamento de longa duração. Shikanai (2005) relata que a detecção de títulos de anticorpos na diluição de 1/32, determinado por imunoeletroforese, demonstra ser um excelente critério para conduzir o paciente para a fase de manutenção. Quando esse padrão foi aplicado, episódios de recidivas não foram observados.

1.4.1 Drogas usadas no tratamento da PCM

1.4.1.1 Derivados Sulfonamídicos

Os derivados sulfonamídicos foram as primeiras drogas empregadas no tratamento da paracoccidiodomicose, em 1940 (SHIKANAI-YATSUDA, 2005). Análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido para-amino-benzóico

(PABA) e os derivados sulfonamídicos bloqueiam a utilização do PABA para a síntese do ácido fólico. Como exemplo, a sulfadiazina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, detectada na urina 30 min. após ingestão e está presente em todos os tecidos do corpo. (PETRI WA JR., 2001).

1.4.1.1.1 Sulfadiazina

Entre os derivados sulfonamídicos, a sulfadiazina é um dos principais compostos ativos (DEL NEGRO, 1985; DEL NEGRO et al., 1982). A sulfadiazina é administrada na dosagem de 100mg kg^{-1} (com o máximo de 6g), distribuída por todo o líquido corporal, confinada no espaço extracelular e encontrada no fluido cerebrospinal. A droga é, também, indicada no tratamento da neuroparacoccidioidomicose. Tem a vantagem de baixo custo, sendo distribuída em postos de saúde, como tratamento de escolha dos pacientes que necessitam de terapia prolongada. O fato de a droga ter sua posologia distribuída em até quatro vezes ao dia, e o tratamento ser prolongado nas formas severas da doença, pode contribuir para que o paciente pare o tratamento antes do desejado, o que se torna uma desvantagem na utilização da droga.

1.4.1.1.2 Sulfametoxazol-trimetoprim

O uso de trimetoprim em associação a sulfonamidas é baseado na competição e na inibição seletiva da enzima dihidrofolato-redutase, inibindo a síntese do tetrahydrofolato nos microorganismos (PETRI WA JR., 2001). Algumas terapias não apresentaram melhora dos pacientes que foram tratados apenas com sulfonamidas, mas ao associarem derivados sulfonamídicos com trimetoprim, o resultado obtido foi de melhor sucesso (BARBOSA & VASCONCELOS, 1973). A combinação sulfametoxazol/trimetoprim (400/80mg) conhecido com cotrimazol 480

mg (BARBOSA e VASCONCELOS 1973; PEREIRA et al., 2004) e sulfadiazina/trimetoprim (410/90 mg) tem sido administrada com sucesso no Brasil, em pacientes com paracoccidioidomicose (BARRAVIERA et al., 1989).

1.4.1.2 Derivados Azólicos

Os compostos azólicos são formados por um anel nitrogenado, de cinco membros, unido a outro anel aromático, por meio de ligação carbono-nitrogênio.

1.4.1.2.1 Cetoconazol

O cetoconazol foi introduzido no mercado nos anos 80. Possui ação antifúngica de amplo espectro. Contém dois átomos de nitrogênio no anel azólico. É insolúvel em água, pouco solúvel em álcool e solúvel em metil-álcool (BENNET, 1995 e 1996).

Atua na inibição da biossíntese do ergosterol, ligando-se a citocromo P-450. Para ativar o citocromo, é necessário que ocorra a demetilação da enzima lanosterol-14- α -metil-esterol. O cetoconazol liga-se ao cofator heme da citocromo P-450 por meio do N₃, interferindo na ligação dessa enzima. O acúmulo dessa enzima altera o arranjo das cadeias acíclicas dos fosfolipídeos e os sistemas enzimáticos da membrana. Em consequência, ocorrem alterações nas atividades de ATPases e das enzimas que transportam os elétrons, inibindo o desenvolvimento do fungo. (SAAG e DISMUKES, 1988).

O cetoconazol necessita de pH ácido para que sua absorção seja satisfatória. Após a ingestão de 200 mg, os picos plasmáticos são obtidos dentro de uma a duas horas, correspondendo a, aproximadamente, 3,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Administrações orais de

200 mg, 400 mg e 800 mg alcançam máximos de concentrações plasmáticas de quase $8\mu\text{g}$ e $20\mu\text{g ml}^{-1}$ (RICHARDSON WARNOK, 1993).

Para o tratamento de pacientes com a forma branda ou ligeiramente severa da doença, o cetoconazol pode ser prescrito na dose de $200 - 400\text{ mg dia}^{-1}$ ou, em casos raros, 600 mg dia^{-1} . Vários estudos envolvendo cerca de 240 casos tratados com cetoconazol demonstraram que cerca de 90% deles levaram à cura da doença quando a droga foi administrada num período de 6 a 18 meses em pacientes sem histórico de tratamento prévio. (RESTREPO et al., 1983; CUCE et al., 1981; RESTREPO et al., 1982). Negroni (1988) estudou a absorção do cetoconazol em pacientes que receberam 400 mg de cetoconazol por 3 – 4 meses, e 200mg por mais 4 meses adicionais, mostrando que 6,25 % do tratamento fracassaram, principalmente nos pacientes que apresentaram baixa absorção da droga (NEGRONI, 1988).

1.4.1.2.2 Itraconazol

O itraconazol é um triazol queratinofílico, lipofílico, insolúvel em água, pouco solúvel em álcool e solúvel em dimetilsulfóxido. Apresenta anel triazólico, o que lhe confere amplo espectro de ação. Esse triazol está intimamente relacionado ao cetoconazol (DOLLERY, 1992b).

Os dois principais triazóis sintetizados na década de 80 são o itraconazol e o fluconazol. O itraconazol atua na síntese do ergosterol, mediante ligação com a enzima 24-metileno-di-hidro-lanosterol (McGINIS e PASSAREL, 1998). Inibindo a enzima do fungo, o itraconazol causa alteração na permeabilidade e na atividade funcional da membrana, interferindo no transporte de nutrientes e reduzindo a

ATPase. A alteração na membrana confere-lhe uma ação primária fungistática (DE MURI, 1995).

Os níveis sanguíneos de itraconazol variam de paciente para paciente. Esses níveis estão muito reduzidos em pacientes em jejum, naqueles com redução gástrica e em imunodeprimidos em estágios avançados. Sua absorção é alta, mais de 90% da dose administrada é encontrada no plasma (LAVALLE et al., 1987). É metabolizado no fígado. São atingidos níveis de equilíbrio dinâmico, após alguns dias. Após a administração de 100 mg diários, durante 15 dias, o pico sérico é de 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e sua meia vida é de cerca de 30 horas (DOLLERY, 1992b).

Dados obtidos de estudos no tratamento com itraconazol, em cerca de 300 pacientes, mostram que a droga nas dosagens de 100 – 400 mg dia^{-1} são efetivas quando administradas no período de 6 a 24 meses. Os autores observaram melhoria em cerca de 91% dos pacientes. Recidivas são tratadas com sucesso com esse derivado azóico (NARANJO et al., 1990).

1.4.1.2.3 Fluconazol

O fluconazol é um triazol composto por três átomos de nitrogênio no anel azóico. É um bitriazol fluorado, obtido por síntese. Apresenta-se como pó cristalino branco, solúvel em água e insolúvel em álcool (BENNET, 1996, DOLLERY, 1991a; GUPTA et al., 1994a).

Assim como os imidazóis, o fluconazol atua inibindo a síntese do ergosterol, porém sua enzima-alvo é a 14 α -demetilase da citocromo P-450. Sendo o fluconazol um triazol, sua seletividade pelo sítio de ação é maior que a dos imidazóis, devido ao acréscimo de nitrogênio em seu anel azóico. Além de aumentar a seletividade, o aumento de um átomo de nitrogênio proporciona estabilidade metabólica,

prolongando o tempo de meia vida plasmática dos triazóis. Esse fármaco forma um complexo com metade das moléculas de ferro do grupo heme do citocromo P-450, dificultando a fixação e a ativação do oxigênio (McGINNIS e RINALDI 1991, GUPTA et al., 1994a). Os triazóis apresentam metabolismo mais lento quando comparados com os imidazóis, o que lhes confere um efeito mais brando na síntese de esteróis humanos.

O fluconazol é amplamente ativo contra fungos patogênicos, com atividade contra histoplasmose, blastomicose, esporotricose, paracoccidioidomicose e dermatofitoses. É a terapia de escolha para a prevenção de meningite criptocócica, em pacientes imunodeprimidos (MENICHETTI et al., 1996; LAGUNA et al., 1997; SINGH et al., 1996; NEGRONI, 1988).

O fluconazol é usualmente administrado por via oral, mas pode ser administrado por via endovenosa, quando necessário. Apresenta absorção rápida e as concentrações plasmáticas independem da via de administração, e sua biodisponibilidade é conservada mesmo quando ingerido com alimentos e na presença do suco gástrico. Os níveis máximos de concentração plasmática variam de 4 a $8\mu\text{g ml}^{-1}$, após repetidas doses de 100 mg. Sua excreção renal é cerca de 90% e a meia vida é em torno de 25 a 30 horas. No líquido cefalorraquidiano são encontrados cerca de 11 a 12% da sua concentração plasmática. Também pode ser detectado em outros líquidos corporais, inclusive no escarro e na saliva. Sua maior concentração, entretanto, encontra-se no líquido cefalorraquidiano (BENNET, 1996; DOLLERY, 1992a).

Negroni (1988) administrou fluconazol na dosagem de 200 - 400 mg kg^{-1} em cerca de 18 pacientes, por um período de 6 meses e observou melhoria clínica em

91.8% dos casos e que 2.9% dos pacientes morreram durante a fase de indução da terapia. A taxa de recidiva, seis meses após a descontinuidade do tratamento, foi de 4% dos pacientes.

1.4.1.3 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo, derivado de *Streptomyces nodosus*, isolado por Gold e colaboradores, em 1956. Esse composto é caracterizado por um anel de átomos que apresenta uma região hidrofílica, contendo várias hidroxilas, e outra lipofílica, com uma seqüência de quatro duplas ligações conjugadas. A anfotericina B é praticamente insolúvel em água, fotosensível e termosensível. Apresenta atividade antifúngica em pH 6 a 7,5 (DOLLERY, 1991a).

De modo geral, a anfotericina B é, ainda hoje, o fármaco de escolha para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas mais graves. Dependendo da dose, esse poliênico possui ação fungistática ou fungicida. Atua interferindo na permeabilidade da membrana plasmática, mas os efeitos antifúngicos, inicialmente, dependem de sua ligação ao esterol da membrana. Essa ligação pode resultar na perda de íons intracelulares, o que caracteriza a natureza fungistática da droga. Nesse caso, o efeito pode ser revertido mediante remoção do fármaco. Em concentrações fungicidas, pode determinar a formação de poros na membrana, com conseqüente perda de constituintes celulares de baixo peso molecular; essa condição é irreversível e causa falência (BODY, 1988; BRAJTBURG et al., 1990). A ação fungicida da anfotericina B decorre da alteração da membrana celular, mas, também, de danos oxidativos causados à célula fúngica (BRAJTBURG et al., 1990; SOKOL-ANDERSON et al., 1986; SOKOL ANDERSON et al., 1988). A anfotericina B também interage com o ergosterol dos mamíferos, causando reações de toxicidade.

A anfotericina B possui um largo espectro de ação (GUPTA, 1994a). Tem atividade contra a maioria dos fungos de importância médica e é eficaz no tratamento de mucormicose, hialohifomicose e feo-hifomicose, mas não demonstra boa atividade contra *Pseudallescheria boydii* e na tricosporonose (BRAJTBURG et al., 1990). A anfotericina B é o tratamento de escolha para a aspergilose invasiva, esporotricose cutânea, criptococose, fusariose, alternariose, tricosporonose e penicililose marnefei (ABERNATHY, 1973; DOLLORY, 1991a). Apesar de os imidazóis em serem administrados em muitos pacientes com blastomicose, histoplasmose, coccidioidomicose e paracoccidioidomicose, a anfotericina B é o fármaco de escolha para essas micoses, principalmente em pacientes imunossuprimidos (PRESTERL & GRANINGER, 1998). A anfotericina b é eficaz, também, em pacientes com neutropenia profunda e febre, que não respondem a agentes antibacterianos de amplo espectro (GIRMENIA et al., 1996).

A droga pode ser encontrada sob as formas de pastilhas, comprimidos e suspensão para uso oral, indicadas no tratamento de candidíase bucal, orofaríngea e esofágica (DOLLORY, 1991a). Também para uso tópico, é encontrada sob as formas de creme e de adesivo, contendo 3% do poliênico. Para administração parenteral, a anfotericina B pode ser utilizada como solução tradicional (Fungizon®) ou como preparação lipossomal (Ambisome®), requerendo internação hospitalar.

Os efeitos nefrotóxicos da anfotericina B são intensificados em presença de aminoglicosídeo e de ciclosporina e a perda de potássio pode ser intensificada em interações com corticóides (CARLSON e CONDON, 1994; DOLLORY, 1991a). As associações desse poliênico com a 5-fluorocitosina podem ser sinérgicas (BENNET, 1996; LOPES et al., 1979; POIRRIEZ et al., 2000), mas antagônicas com o

cetoconazol (GUPTA et al., 1994). Ao contrário desse imidazol, a terapia combinada com voriconazol, um triazol de terceira geração, tem sido, entretanto, sugerida como tratamento primário para a aspergilose invasiva, uma micose considerada de difícil tratamento (WILDFEUR et al., 1998).

Considerada droga com alta atividade fungistática e fungicida, a anfotericina B tem sido usada desde 1958 para o tratamento da maioria dos casos graves da paracoccidioidomicose. O tratamento inicia-se com doses de 5 – 10 mg e, dependendo da severidade da doença, a dosagem pode ser ajustada para 1mg kg^{-1} dia⁻¹. (BENNET, 1995). A anfotericina B tem sido tipicamente administrada na fase de indução da doença (30 – 60 dias), estendendo-se a administração, se necessário, até o controle da doença. Em um estudo com 47 pacientes apresentando adenopatia, hepatoesplenomegalia, lesões pulmonares e lesões tegumentares, foram prescritas doses de 2 – 3 g (30mg kg^{-1}) da droga, onde se obteve a cura clínica e sorológica em 54% dos pacientes. (DE CAMPOS et al., 1984).

1.5 A virulência do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

Os fatores de virulência permitem que os fungos patogênicos cresçam nas condições adversas oferecidas pelo hospedeiro, contribuindo no desenvolvimento da infecção. Brummer e colaboradores (1990) observaram que a manutenção de alguns isolados fúngicos mantidos em laboratório por longos períodos, e com sucessivos repiques, acarreta em atenuação ou desaparecimento da virulência das amostras. Tem-se observado, entretanto, que a virulência atenuada dos isolados pode ser recuperada através da infecção de animais, e a subsequente recuperação dessas células. A genética e a fisiologia desse fenômeno ainda são completamente desconhecidas (MACORIS et al., 2006).

Modelos animais têm sido amplamente utilizados no estudo da interação parasito-hospedeiro na PCM, e têm revelado que diferentes isolados de *P. brasiliensis* podem ter variações de virulência (BRUMMER et al., 1990; KASHINO et al., 1985; SINGER-VERMES et al., 1994). Alguns experimentos realizados analisando a curva de crescimento e a morfologia das leveduras mostram que existe variabilidade entre amostras de *P. brasiliensis*, mas que não estão relacionadas com a patogenicidade. (KASHINO et al., 1985; KASSHINO et al., 1987). Outro aspecto que foi estudado e relacionado com a virulência é a morfologia do crescimento do micélio, onde a morfologia cotonosa está relacionada com amostra virulenta, enquanto que a morfologia globosa está associada com a baixa virulência da amostra (SANO et al., 1997).

O processo de transição da forma filamentosa para a de levedura resulta em uma série de alterações celulares, entre as quais a da estrutura da parede é a mais conhecida. A parede celular do fungo *P. brasiliensis* é composta, predominantemente, de polissacarídeos do tipo quitinas e glucanas, que ocupam, aproximadamente, 80% do seu peso seco.

Os componentes das paredes celulares de *P. brasiliensis* de ambas as formas foram fracionados de acordo com sua solubilidade em álcali. Três frações foram caracterizadas: Fração 1, álcali insolúvel, contendo β -glucana; fração 2, álcali solúvel e ácido insolúvel, constituída de α -glucanas; fração 3, álcali solúvel e precipitável com ácido, contendo galactomananas. A proporção de quitina na fase de leveduras era superior àquela da fase filamentosa e 95% das glucanas presentes nessa fase eram solúveis em álcali, apresentando estrutura de α -1,3 glucanas. Apenas 5% das glucanas de leveduras eram insolúveis em álcali com a estrutura de β -1,3 glucanas. O conteúdo de proteínas era maior na fase filamentosa. Nessa fase, β -1,3 glucanas

(35-40%) foram identificadas, pela ação de β -1,3 glucanase e por hidrólise ácida parcial. As glucanas solúveis (60-65%) da forma filamentosa eram constituídas de uma mistura de α e β glucanas. As α e β glucanas formam estruturas fibrilares e determinam, conjuntamente com quitina e proteínas da parede, a forma do fungo (SAN-BLAS, et al., 1976; SAN-BLAS e SAN-BLAS, 1977).

A virulência do *P. brasiliensis* tem sido associada à α -1,3 glucana contida na parede da célula leveduriforme do fungo (MORAES e SCHAFFER, 2002). San-Blas et al. (1984) demonstraram alteração na síntese de α -1,3 glucana, quando amostras passaram por repiques sucessivos (*in vitro*), ocasionando a perda ou a atenuação da sua virulência. Os mesmos autores verificaram, entretanto, que a adição de soro fetal bovino à cultura induz a produção desse polissacarídeo, com conseqüente reativação da virulência. Trabalhos realizados com modelo experimental murino observaram que as amostras pouco virulentas de *P. brasiliensis* apresentaram quantidades de α -1,3 glucana semelhantes às de duas outras amostras virulentas, sugerindo a existência de outros fatores envolvidos na patogenicidade do fungo (ZACHARIAS et al., 1986).

Estudos indicaram que o *P. brasiliensis* produz melanina, um fator importante relacionado com a virulência de vários outros patógenos (JACOBSON e TINNELL, 1993; TORRES-GUERRERO e EDMAN, 1994). É um polímero multifuncional, encontrado em diversas espécies, que incluem representantes de todos os reinos (HILL, 1992). As melaninas fúngicas são pigmentos de cor marrom-escura ou preta, de alto peso molecular, sintetizadas por polimerização oxidativa ou por complexos fenólicos. Esses polímeros estão presentes na parede celular ou em toda a célula fúngica (WHEELER e BELL, 1987).

Na PCM, Gómez e colaboradores (2001) demonstraram que o fungo *P. brasiliensis* é capaz de sintetizar melanina *in vitro* e durante a infecção. O *P. brasiliensis*, na sua forma de levedura, cultivado em meio líquido simples suplementado com L-Dopa, produz um pigmento escuro estruturalmente semelhante àquele que havia sido isolado da melanização de *C. neoformans* (CASADEVALL et al., 1995). De forma semelhante, a fase leveduriforme cultivada com L-Dopa foi analisada por espectroscopia-ESR (Ressonância da Rotação de Elétrons), mostrando um espectro quase idêntico àquele produzido pela melanina do *C. neoformans* (WANG e CASADEVALL, 1995). Conídios e células leveduriformes do fungo, cultivadas em meio contendo L-DOPA foram reativas com anticorpos monoclonais, que reconhecem a melanina. Através de camundongos infectados com conídios de *P. brasiliensis*, foram recuperados resíduos escuros reativos com anticorpos monoclonais contra a melanina (NOSANCHUK et al., 1999).

Foi evidenciada, também, a participação *in vitro* da enzima lacase (fenol-oxidase) na síntese da melanina. A ocorrência da melanização *in vitro* e a presença de uma “lacase-like” evidenciaram que a síntese enzimática da melanina nas células leveduriformes faz-se na presença do substrato L-DOPA (GOMEZ et al., 2001).

A produção de melanina pelo *Paracoccidioides brasiliensis* parece contribuir para a virulência do fungo pela redução da fagocitose das células leveduriformes por macrófagos peritoneais e alveolares, primários e linhagens (J774.16 e MH-S), aumentando a resistência do patógeno contra o ataque dessas células efetoras. As células melanizadas do fungo são, também, menos susceptíveis a drogas antifúngicas, particularmente à anfotericina B (DA SILVA et al., 2006).

A adesão e a invasão das células do hospedeiro são passos essenciais que envolvem a infecção e a disseminação de patógenos. Além disso, esses patógenos

utilizam moléculas presentes em sua superfície para se ligar a componentes da matriz extracelular e estabelecer a infecção. Barbosa e colaboradores (2006) caracterizaram a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) do fungo *P. brasiliensis* como uma adesina, que pode estar relacionada com a adesão e a invasão do fungo. Através de ensaios de *Western blot* e microscopia de transmissão eletrônica, a GAPDH foi detectada no citoplasma e na parede da célula da levedura. A proteína recombinante GPDH foi encontrada ligada na fibronectina, na laminina e no colágeno do tipo I. O tratamento *in vitro* de células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* com anticorpos policlonais anti-GPDH e a incubação da proteína recombinante com pneumocitos levaram à inibição da aderência e à internalização do fungo em culturas de células.

A atividade de uma proteinase exocelular, a serino-tiol proteinase, presente na fase de levedura do fungo *P. brasiliensis*, foi caracterizada por Puccia e colaboradores (1998). A proteinase do fungo foi capaz de clivar, em experimentos *in vitro*, em pH 7,4, proteínas associadas à membrana basal de humanos, como a laminina, fibronectina, colágeno do tipo IV e proteoglicanas. Sendo assim, a serino-tiol proteinase foi capaz de interferir na adesão e na disseminação do fungo, podendo ser considerada um fator de virulência.

1.6 *Paracoccidioides brasiliensis* e a Gp43.

A gp43 é o principal antígeno do *P. brasiliensis* e sua molécula foi a melhor estudada, até o momento (TRAVASSOS et al., 2003). Puccia et al. (1986), ao

estudarem a natureza dos antígenos extracelulares do fungo *P. brasiliensis*, verificaram que componentes com grande reatividade nos testes de imunodifusão podiam ser isolados, por exclusão, em colunas de gel-filtração (BIO-GEL P-30) e, em seguida, pela passagem do material em coluna Sepharose – Concanavalina A e posterior eluição. Foi observado que somente as frações que se ligavam a essa lectina continham antígenos que reagiam com soros de pacientes com PCM, e as frações que não se ligavam à Con A não apresentavam linha de precipitação com soros de pacientes, mesmo em grandes concentrações. A análise por SDS-PAGE do material eluído revelou quatro componentes de 43, 55, 70 kDa e um de alto peso molecular, com migração difusa. Estudos de imunoprecipitação com soros de pacientes com PCM demonstraram que apenas a glicoproteína de 43 kDa (gp43) era constantemente imunoprecipitada com 100% dos soros de pacientes com PCM e não era reativa com soros de indivíduos sadios (PUCCIA e TRAVASSOS, 1991). Considerou-se, então, que a gp43 era o principal componente antigênico presente nas frações anteriormente descritas por Restrepo e Moncada (1974) e Yarzabal et al. (1977). Desde então, a gp43 tem sido vista como o principal marcador sorológico da PCM, aumentando a especificidade e a sensibilidade dos testes sorológicos (TABORDA e CAMARGO, 1993; CAMARGO et al., 1994; TABORDA e CAMARGO, 1994). A gp43 é expressa de forma constitutiva na fase de micélio e leveduriforme do fungo (GOLDANI et al., 1994), contém uma única cadeia de oligossacarídeos (ALMEIDA et al., 1996) e foi caracterizada, bioquimicamente, por Puccia et al. (1986). A partir da purificação dessa glicoproteína por imunoafinidade, utilizando-se, primeiramente, soro de coelho (PUCCIA et al., 1998) e, posteriormente, anticorpos monoclonais (mAb) (PUCCIA e TRAVASSOS, 1991), foi possível isolar a gp43 com alto grau de pureza. Quando analisada por isoeletrofocalização, a gp43 migrou em

três pontos isoelétricos (PIs) diferentes: 6.7, 6.4 e 6.2. Posteriormente, através do uso dos anticorpos monoclonais e policlonais e de gp43 proveniente de vários isolados clínicos, foi possível indentificar-se quatro perfis diferentes: Perfil A, com PIs 6.0, 6.2, 6.6 e 7.0; Perfil B, com PIs 6.4, 6.8 e 7.2; Perfil C, com PIs > 8.5 e Perfil D, com PIs 5.8, 6.2 e 6.6 (MOURA-CAMPOS et al., 1995).

A análise de polimorfismo da molécula de Gp43 foi verificada por Puccia e colaboradores (1986). As sequências mais polimórficas foram encontradas em Pb2 (isolado 1925), Pb3 e Pb4, as quais codificam uma proteína básica, com pi em torno de 8,0. As mesmas seqüências foram, filogeneticamente, distantes das demais e todos esses isolados foram de pacientes com PCM pulmonar. Um resultado importante, obtido neste trabalho, foi que nenhuma das substituições no gene da gp43 ocorreu no epítipo P10 para células T.

Baseados na determinação do papel imunodominante da gp43 em reações de HTT em cobaias (RODRIGUES e TRAVASSOS, 1994) e em humanos (SARAIVA et al., 1996), outros estudos sobre a participação da gp43 na resposta imune-celular foram realizados.

Na tentativa de se idenficar os epítipos peptídicos envolvidos na reatividade imunológica, bem como as seqüências que são importantes na fisiopatologia do fungo, Cisalpino et al. (1996) clonaram, seqüenciaram e expressaram o gene que codifica a gp43. Foi observado que a gp43 é uma glicoproteína de 416 aminoácidos, o que nos leva a um peptídeo de 35 resíduos. A proteína apresenta uma única N-glicosilação, demonstrando similaridade de 56-58% com uma exo-1,3- β -D-glucanase de *S. cerevisiae* e de *Candida albicans*. A gp43 é desprovida, entretanto, de atividade enzimática (CISALPINO et al., 1996); além disso, Taborda et al. (1998) identificaram um trecho específico da gp43, que possui 15 aminoácidos (P10) que

são reconhecidos pelos linfócitos T. Camundongos de linhagens isogênicas, nos quais foi injetado o P10, desenvolveram uma infecção pulmonar 200 vezes menos intensa que os animais-controle, não-imunizados (TABORDA et al., 1998). Recentemente, Iwai e colaboradores (2003) selecionaram 5 peptídeos da gp43 através de um programa de predição, o TEPITOPE, que detectou os ligantes de alta afinidade para diferentes moléculas de HLA-DR. Tais peptídeos seriam capazes de se ligar às moléculas HLA-DR e ser apresentados às células T numa proporção de significativa da população. Células de 19 pacientes curados para PCM, não-anérgicos e respondedores para gp43, foram testadas *in vitro* frente a tais peptídeos, sendo que 14 pacientes reconheceram pelo menos um dos peptídeos testados. O peptídeo da gp43 (180-194) foi o mais reconhecido, com 53% seguidos pelos peptídeos gp43 (94-108), gp43 (45-59), gp43 (283-289) e gp43 (106-120) com frequências de 42%, 37%, 32% e 32%, respectivamente.

Existem evidências de que a gp43 está envolvida no processo de endocitose do fungo. Observações de que hemácias de carneiro cobertas com gp43 eram fagocitadas pelos macrófagos peritoniais de camundongos e de que a adição de fucose ou manose ao meio de cultura inibiu o processo parcialmente, sugerem que a gp43 possa estar envolvida na aderência e na captura do fungo pelos macrófagos (ALMEIDA et al., 1998).

1.7 Paracoccidioidomicose e Imunidade

Para o controle de uma infecção, é necessária a interação entre o sistema imune inato e o adaptativo e, como em outras infecções, nas micoses sistêmicas ocorre a interação de antígenos do patógeno com o sistema imune. A PCM, nos casos em que não regride espontaneamente, leva a um desequilíbrio entre as

respostas imune inato e adaptativo, o qual irá definir o destino da infecção e a sobrevivência, ou não, do hospedeiro.

A imunidade inata é considerada, tradicionalmente, como a primeira linha de defesa contra infecções, porém, recentemente, tem recebido atenção renovada porque, apesar de apresentar certa inespecificidade, tem a capacidade de distinguir o “próprio” do “não-próprio”, ativando os mecanismos imune-adaptativos através de uma série de sinais específicos (MEDZHITOV et al., 2002).

Diversos fatores humorais têm sido apontados como reguladores da resposta imune-celular. Entre esses fatores humorais, existem estudos mostrando a atuação de antígenos circulantes de *P. brasiliensis* (SILVA e FAZIOLI, 1985), imunocomplexos (CHEQUER-BOU-HABIB et al., 1989; ARANGO et al, 1982) e anticorpos específicos (PERAÇOLI et al, 1982; BENARD et al., 1997; BAIDA et al., 1999) como fatores inibitórios, diminuindo, ou mesmo, abolindo a capacidade de proliferação *in vitro* de linfócitos e a resposta de HTT específicas ao fungo.

Na PCM, inicialmente, foi demonstrado que a produção de altos títulos de anticorpos específicos não seria protetora e, sim, representaria um prognóstico ruim da doença (BIAGIONI et al., 1984; CANO et al., 1995). Essas características foram indicativas de que a resposta imune está relacionada com a produção de anticorpos, tais como as respostas imunes governadas por linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2, que conduzem a um padrão de doença mais grave e aquelas associadas, preferencialmente, com a ativação da imunidade celular comandadas pelos linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1 conduzem a uma patologia mais branda (CANO et al., 1995).

Existem fortes indícios de que respostas deletérias na PCM experimental estão ligadas ao padrão Th2 da imunidade e de que respostas do tipo Th1 são mais

protetoras. Hostetler et al. (1993) mostraram que células de linfonodos de camundongos BALB/c em fase precoce da infecção subaguda por *P. brasiliensis*, induzida pela inoculação de um isolado atenuado por sucessivas passagens *in vitro*, produziam IL-4 e IFN- γ . Contudo, nos animais com a forma aguda e progressiva da doença, produzida pela inoculação de fungo recém-isolado e, portanto, bastante patogênico, apenas a IL-4 era encontrada. É de se notar que o tratamento de animais com anticorpos monoclonais contra IL-4, na forma progressiva e aguda da doença, diminuía bastante a carga fúngica nos pulmões e o nível de IgE sérico. Deve-se lembrar que o IFN- γ e a IL-4 apresentam atividades antagônicas em determinadas situações experimentais, cujo protótipo é a leishmaniose experimental em camundongos isogênicos (AFONSO e SCOTT, 1993; BELOSEVIC et al., 1989). Além disso, Brummer et al. (1988) mostraram que macrófagos ativados por IFN- γ eram capazes de matar o fungo *P. brasiliensis* por mecanismos não-oxidativos. A atividade fungicida contra o fungo, em sua forma infectante (conídios), seria exercida pelo óxido nítrico (NO) produzido por macrófagos ativados por IFN- γ , como proposto por Gonzalez et al. (2000).

O papel dos anticorpos na proteção contra patógenos é, normalmente, estabelecido pela relação da presença do anticorpo no soro com a proteção e/ou pela proteção demonstrada após administração passiva do anticorpo. Essa relação tem sido mais estudada para *C. albicans* e *C. neoformans*, onde a utilização de anticorpos policlonais tem produzido evidências conflitantes a favor e contra a imunidade por anticorpos (CASADEVALL, 1995). Experimentos com mAb têm demonstrado a existência de anticorpos protetores e não-protetores para *C. albicans* (HAN e CUTLER, 1995; MATTHEWS et al., 1995) e *C. neoformans* (DROMER et al., 1987; SANFORD et al., 1990; MUKHERJEE et al., 1992). Já em relação a

Aspergillus fumigatus, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitides* e *Coccidioides immitis*, a administração de anticorpos policlonais de animais imunizados não foi protetora nas respectivas infecções experimentais (CASADEVALL, 1995).

Em nosso laboratório, produzimos um extrato lipídico bruto, a partir de leveduras de *P. brasiliensis*. A análise por cromatografia evidenciou a presença de lipídios neutros, fosfolipídios e glicolipídeos. Dentre os lipídios neutros, observamos a presença dos ácidos graxos C18: 1 (ácido oléico), C18: 2 (ácido linoléico) e de esteróis. As extrações foram realizadas a partir de leveduras cultivadas em diferentes momentos, sendo, posteriormente, unidas em uma única fração. Esse procedimento foi adotado devido à variabilidade observada nas diferentes extrações, decorrentes, provavelmente, de fatores ligados ao fungo durante o cultivo (Da Silva, 2006).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que anticorpos monoclonais (Gentilmente cedidos pela Prof^a. Dr^a. Rosana Puccia - UNIFESP) contra gp43 podem ser protetores ou não-protetores. Em camundongos Balb/c, foram administrados 1mg de anticorpos 3E e 32H (previamente detoxificados em coluna de afinidade Detoxi-Gel–Pierce, EUA) pela via intraperitoneal e, após 45 e 60 dias de infecção, os animais foram sacrificados e os órgãos (pulmões, baço e fígado) foram utilizados para determinação de UFCs. Verificamos que os anticorpos protetores (3E, 19G, 10D) foram capazes de reduzir a carga fúngica nos pulmões de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente. Por outro lado, o anticorpo monoclonal 32H não conseguiu reduzir a carga fúngica dos animais infectados (BUISSA FILHO, 2005).

Outros autores apontam a existência de mecanismos fungicidas mediados por macrófagos ativados por IFN- γ recombinante (BRUMMER et al., 1988) e pelo sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico ativadas por concanavalina A (ConA), ricas em IFN- γ (MOSCARDI-BACCH et al., 1994).

O papel das citocinas IL-12 e IL-4 na infecção intratraqueal pelo *P. brasiliensis* foi estudado em animais B10.A suscetíveis (ARRUDA et al., 2002; ARRUDA et al., 2004). A administração do recombinante da IL-12 (rIL-12), durante os primeiros 6 dias da infecção, promoveu uma redução no grau de colonização pelo fungo no baço e no fígado (cerca de 2 log₁₀), no tempo de 8 semanas pós-infecção. Essa diferença na disseminação do fungo é indicativa de doença menos grave e pôde ser associada a um quadro inflamatório mais intenso, observado nos pulmões de animais tratados com r-IL12. Em termos de secreção local de citocinas, foram detectados, na 1ª semana pós-infecção um pequeno, mas significativo aumento de IFN- γ , nenhuma alteração, no tempo de 4 semanas e uma diminuição na secreção de IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ , no tempo de 8 semanas. Nesse mesmo tempo de 8 semanas, células de linfonodos totais em cultura não produziram IL-10 e a produção de anticorpos mostrou uma redução nos níveis de IgG1 e IgG2b para os animais tratados com a rIL-12.

É conhecido o fato de que pacientes com resposta linfoproliferativa deficiente e reduzida síntese de IFN- γ e IL-12 estão relacionados com os quadros graves. A possibilidade de reversão da anergia linfocitária através da terapia com citocinas foi demonstrada *in vitro* por Romano et al. (2002), com o tratamento de células mononucleares de pacientes graves com IL-12 e contra IL-10. Esse tratamento induziu o aumento na secreção de IFN- γ , que atingiu níveis próximos aos

observados em pacientes não-doentes; a resposta linfoproliferativa, contudo, não sofreu alteração.

A disseminação do fungo não é controlada, adequadamente, por animais com deficiência de IFN- γ (IFN- γ KO) e do receptor de TNF- α (TNFR- α KO); os autores sugerem que a ausência desses mediadores induz à diminuição da imunidade celular, à baixa ativação de macrófagos, à organização de granulomas prejudicada e à produção de NO diminuída. A presença de IFN- γ também é necessária para a síntese de TNF- α pelos macrófagos, o qual é indispensável para o acúmulo dessas células, e sua posterior diferenciação em células epitelióides também é responsável pela formação e manutenção do granuloma auxiliando, assim, no controle da disseminação do fungo (SOUTO et al. 2000). A resposta imune frente a infecções provocadas por patógenos intracelulares em presença de citocinas Th1 (IFN- γ e TNF- α) é prioritária para os fenômenos de imunoproteção. Nesse caso, o IFN- γ tem uma multiplicidade de funções, tais como promover a fagocitose e a morte do microrganismo e induzir a síntese de IgG2a, que é um fator opsonizante mais eficiente do que IgG1 (SOUTO et al., 2000).

A imunidade humoral, no entanto, é mediada por uma molécula específica de anticorpo, que freqüentemente tem sido associada a uma baixa ou a nenhuma resposta contra patógenos intracelulares. Estudos demonstraram uma relação antagonista entre a resposta humoral e a celular, ou seja, a imunidade humoral pode interferir no desenvolvimento da imunidade celular efetiva (BRETSCHER et al., 1992). Essa dicotomia entre o papel da imunidade celular ou humoral a patógenos intracelulares ou extracelulares, respectivamente, tem sido interpretada através dos padrões de resposta Th1-Th2 (ALLEN et al., 1997).

O uso da vacinação como prevenção de doenças infecciosas tem se expandido e exige a seleção de componentes imunogênicos que possam levar à proteção do hospedeiro. No caso de doenças fúngicas, essas moléculas têm sido estudadas em *Histoplasma capsulatum*, (GOMEZ et al., 1991) *P.brasiliensis* (MARQUES et al., 2006; TABORDA et al., 1998; TRAVASSOS et al., 1995), *Cryptococcus neoformans* (CASADEVALL et al., 1992; DIXON et al., 1998; WILLIAMSON et al., 1987), *Candida albicans* (HAN et al., 1995; SUNDSTROM et al., 1994) e em *Coccidioides immitis* (THOMAS et al., 1997).

O mecanismo de defesa dos indivíduos que residem em regiões endêmicas da PCM é desconhecido; a existência de reatividade positiva para a paracoccidioidina em indivíduos sem evidências clínicas da doença sugere que a imunidade contra *P. brasiliensis* pode ocorrer após exposição ao fungo. A depressão do sistema imune pela paracoccidioidomicose é um processo reversível (MOK et al., 1977), e a moderação clínica da micose é, muitas vezes, mostrada por teste de hipersensibilidade tardia. Poucas tentativas de imunização contra a PCM foram realizadas. A proteção contra essa micose sempre está relacionada a uma resposta imune-celular adequada, limitando a infecção e diminuindo as células fúngicas nos granulomas (MOSCARDI-BACCHI et al., 1985).

A carência de respostas efetivas no tratamento da PCM, devido à incapacidade de erradicação definitiva do fungo com a probabilidade de re-infecção endógena, levando a recorrências da doença, torna necessário a busca de terapias mais eficientes para essa infecção. Sendo assim, a proposta de imunização do P10, em associação com drogas antimicrobianas no tratamento da PCM experimental, representa um grande passo no estudo de vacinas terapêuticas que possam ser, também, utilizadas em humanos. Portanto, neste presente trabalho realizamos

experimentos e apresentamos resultados promissores no tratamento da PCM experimental em camundongos Balb/c anérgicos, ou não. Apresentamos, também, algumas das respostas encontradas com diferentes adjuvantes associados ao P10 e usados para tratar a doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do peptídeo 10 (P10) como adjuvante imunológico associado aos antifúngicos tradicionais no tratamento da paracoccidioidomicose experimental.

2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a eficácia da imunização com o P10 associado ao tratamento medicamentoso, em camundongos Balb/c infectados, com ou sem indução de anergia;
- b) Verificar se existe sinergismo ou efeito aditivo entre a imunização com o P10 e o tratamento medicamentoso em camundongos infectados intratraquealmente;
- c) Quantificar a carga fúngica em diferentes sítios anatômicos de camundongos infectados e submetidos aos protocolos de imunização e de tratamento com antifúngicos;
- d) Quantificar a produção de citocinas nos pulmões dos animais infectados e submetidos aos protocolos de imunização e de tratamento com antifúngicos;
- e) Determinar a modulação da resposta imune-humoral, através da pesquisa de anticorpos, induzida pela vacinação com o P10, em camundongos infectados e submetidos aos protocolos de tratamento medicamentoso e de imunização;
- f) Comparar a resposta imune e a carga fúngica induzida pela imunização com P10 associado a diferentes adjuvantes disponíveis no mercado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c, com a média de idade entre 6 e 8 semanas. Os animais foram criados em condições de SPF (*Specific Pathogen Free*), no biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e mantidos no biotério de animais de experimentação do Instituto de Ciências Biomédicas II.

3.2 Fungo

Paracoccidioides brasiliensis: amostra virulenta. As amostras de Pb 18 foram mantidas e adaptadas para a fase leveduriforme no meio Sabouraud-Dextrose (Sanofi, França) e mantidas a 37° C e, 5 a 7 dias antes da inoculação, foram transferidas para o meio líquido Mc Veigh & Morton (McVM), quimicamente definido, a 35°C (CASTAÑEDA et al., 1988; HANDAM et al., 1998; RESTREPO & ARANGO 1980; SINGER-VERMES et al., 1992).

3.3 Produção do exoantígeno de *P. brasiliensis*

Após 5 dias de cultura em meio ágar Sabouraud-Dextrose (Sanofi, França), a 37° C, leveduras foram transferidas para um erlenmeyer contendo 50 ml de meio UBA (6,1g de extrato de levedura (Oxoid, Inglaterra), 16,1 g de dextrose (Synth, Brasil), 15 g de peptona de caseína (Oxoid, Inglaterra), 0,31 g de K₂HPO₄ (Synth, Brasil), 0,12 g de MgSO₄.7H₂O (Synth, Brasil), 0,006 g de MnSO₄.H₂O (Synth, Brasil), 0,006 g de NaCl (Synth, Brasil), 0,006g de FeSO₄ (Synth, Brasil) para 1000

ml de H₂O destilada). Este foi mantido em agitação, por 3 dias (C25KC Incubator Shaker - Edison, EUA), a 37°C, sendo, então, transferido para um frasco tipo Fernbach contendo 500 ml do mesmo meio e mantido por mais 7-10 dias, nas mesmas condições. Após esse período, as células foram mortas com timerosal (Sigma, St. Louis, EUA) (0,2 g l⁻¹) e o sobrenadante (exoantígeno bruto) foi coletado após filtração em papel. O exoantígeno foi concentrado sob N₂ em concentrador Amicon (Amicon Stirred Ultra Filtration Cells, EUA), utilizando-se membrana de filtração Y-10 (Millipore, EUA). Foi realizada a dosagem das proteínas e monitoramento por SDS-PAGE, corado pela prata.

3.4 Dosagem de proteínas

As determinações protéicas foram realizadas segundo método de Bradford (1976), que utiliza o *Comassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 (Sigma, St. Louis, EUA) como reativo e o Soro Albumina-Bovina (BSA) (Sigma, St. Louis, EUA) 1,0 mg ml⁻¹ como padrão.

3.5 SDS-PAGE

Os procedimentos para eletroforese vertical foram realizados em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) e executados em equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad, EUA). Para a proteína em estudo, foi utilizado gel de separação linear com 10% de acrilamida, em tampão tris-HCl (Sigma, St. Louis, EUA) 1,5M, pH 8,8, contendo 0,4% de SDS (Bio-Rad, EUA) (p/v) e o gel de empilhamento, com 3% de acrilamida (Bio-Rad, EUA), em tampão tris-HCl (Sigma, St. Louis, EUA) 0,5M, pH 6,8, contendo 0,4% (p/v) de SDS (Bio-Rad, EUA). As amostras em análise foram diluídas 1:5 em tampão de amostra Tris-

HCl (Sigma, St. Louis, EUA) 62nm, pH 6,8, contendo 0,2% (p/v) de SDS (Bio-Rad, EUA), β -mercaptoetanol (Merck, Alemanha) 50 mM, 0,005% (p/v) de azul de bromofenol (Synth, Brasil) e 10% (v/v) de glicerol (Merck, Alemanha), sendo fervidas, por 3 minutos, e aplicadas nos sulcos do gel SDS-PAGE. Os eletrodos do aparelho foram mergulhados em tampão de corrida contendo Tris (Sigma, St. Louis, EUA) 25 mM, glicina (Synth, Brasil) 190 mM pH 8,3 e 0,1% de SDS (Bio-Rad, EUA) (p/v). As corridas eletroforéticas foram realizadas com voltagem constante de 100 V. Após o término da corrida, os géis foram corados pelo método da Prata (ANSORGE, 1985).

2.6 Purificação da gp43. A glicoproteína de 43 kDa foi purificada a partir do sobrenadante de cultura líquida do Pb18 (exoantígeno bruto, após centrifugação a 10.000 rpm, por 20 min, para a retirada de material precipitado), por meio de cromatografia de afinidade em CNBr-4B (Sigma, St. Louis, EUA), acoplado com anticorpo monoclonal contra gp43 17c (Gentilmente cedidos pela Dr^a Rosana Puccia). O exoantígeno foi aplicado, lentamente, à coluna de afinidade e, após a passagem de todo o material a ser purificado, a coluna foi exaustivamente lavada com solução salina tamponada com fosfatos pH 7,4 (PBS), em fluxo rápido para a remoção de substâncias indesejadas. A gp43 foi eluída com 5 ml de glicina-HCl (Synth, Brasil) 0,1 M, pH 2,8, e imediatamente neutralizada com 100 μ l de Tris (Sigma, St. Louis, EUA) 2M, pH 9,0. Frações de 1,0 ml foram coletadas e levadas para a leitura em espectrofotômetro, a 280 nm. As frações com maiores absorbâncias foram misturadas. O material resultante foi dialisado com 0,15 M de PBS (pH 7,4) e, então, concentrado sob N₂, a 4 °C, em concentrador Amicon (Amicon Stirred Ultra Filtration Cells, EUA), utilizando membrana de filtração Y-10 (Millipore, EUA). A concentração protéica da gp43 foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando-se, como padrão, o Soro Albumina-Bovina (BSA) (Sigma,

St. Louis, EUA) e monitorada em gel de SDS-PAGE, corado pelo método da Prata, para avaliar a real pureza da amostra (ANSORGE, 1985).

3.6 Agentes antimicrobianos

Três derivados azólicos foram utilizados: Cetoconazol (Janssen-Cilag®, Brasil), Itraconazol (Janssen-Cilag®, Brasil) e fluconazol (Pfizer®, USA). Os derivados azólicos foram conservados e mantidos em temperatura ambiente. As drogas foram preparadas com uma prévia dissolução em 2% de DMSO, exceto o fluconazol, que é solúvel em água. A anfotericina B (fungizon® Bristol Mayers Squibb, Brasil) foi preparada com água estéril e, logo depois, estocada a 4°C e protegida da luz. O sulfametoxazol (Sigma, St. Louis, MO) foi solubilizado com 2% de DMSO. Para sulfametoxazol/trimetropim (Bac-sulfitrin, Ducto, Brasil), a diluição foi feita em PBS, com 2% de DMSO.

3.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) do sulfametoxazol, sulfametoxazol/trimetropim, anfotericina B e dos azólicos, para a amostra de Pb 18, foram determinadas utilizando-se o procedimento da macrodiluição, de acordo com Shadomy et al. (SHADOMY; 1980, 1987). A solução-estoque de anfotericina B foi preparada à concentração de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, estocada a 4 °C e protegida da luz. As diluições seriadas da anfotericina B foram feitas a partir da solução-mãe, e o meio utilizado como diluente final foi o McVeigh-Morton, modificado (McVM) e quimicamente definido; as concentrações das drogas variaram de 4 a 0,0062 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Para os três azólicos, a solução-mãe foi preparada à concentração de 1 mg ml^{-1} ,

sendo solubilizada com DMSO, exceto o fluconazol, que foi solubilizado em água destilada estéril. Suas diluições seriadas foram feitas no meio líquido McVM, e suas concentrações, definidas de 4 a 0,0005 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Drogas livres, solubilizadas em DMSO, foram incluídas no controle. As células leveduriformes foram coletadas do meio líquido McVM, onde a mistura foi agitada para a dispersão e a desagregação das células. A contagem foi feita em câmara de Neubauer. O inóculo inicial foi de uma concentração de 3×10^5 cels. Alíquotas de 0,1 ml de suspensão foram adicionadas em 0,9 ml de McVM para crescimento, contendo as diluições seriadas das drogas, chegando-se à concentração final de cerca de 10^4 cels ml^{-1} (ESPINEL-INGROFF; 1991, 1992; PFALLER et al., 1990). As amostras foram levadas para a agitação em Shaker (New Brunswick Scient, C25 KC, NJ USA), à temperatura de 35°C. As CIMs da anfotericina B foram lidas entre 5 e 7 dias de incubação, e definidas como a menor concentração capaz de inibir o crescimento do fungo comparado com o tubo- controle. Para os derivados azólicos, as CIMs foram definidas como a menor concentração capaz de inibir 80% do crescimento do fungo, quando comparado com a turbidez visual do tubo-controle. Todos os ensaios foram feitos em duplicatas.

O Sulfametoxazol foi solubilizado em 2ml de água ligeiramente morna, com a adição vagarosa de 2% de DMSO. No caso do sulfometoxazol, é necessário que o meio de cultura não antagonize a ação da droga. As diluições foram preparadas seguindo os mesmos procedimentos para a anfotericina B e os derivados azólicos, sendo que as concentrações podem variar de 600 a 9,375 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e de 128 a 0,003 $\mu\text{g ml}^{-1}$, para o sulfametoxazol/trimetoprim. Foi, então, preparado o meio apropriado, sendo adicionado 0,1 volume do antimicrobiano para 0,9 volume do meio McVM.

Tubos-controle para o sulfametoxazol e o sulfametoxazol/trimetoprim foram adicionados ao teste. Para a determinação do inóculo, os passos foram os mesmos dos outros antimicrobianos. A determinação da concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração capaz de inibir 90% do crescimento do fungo, comparado com o crescimento-controle. Todos os ensaios foram feitos em duplicatas.

3.8 Síntese e Purificação do Peptídeo (P10)

O peptídeo foi sintetizado e purificado no departamento de Biofísica, da UNIFESP, assim como descrito por Taborda et al. (1998).

3.9 Infecção: Preparo do inóculo

O fungo foi coletado e lavado 3 vezes com solução salino-tamponada com fosfatos (PBS, pH 7,2). Depois da última lavagem, o sedimento foi ressuspensionado em volume de 5 ml de PBS onde, por alguns minutos, decantaram-se as maiores partículas. Na suspensão de células com menores brotamentos, a mais leve foi coletada e a contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer.

3.10 Determinação da viabilidade das leveduras

A viabilidade das leveduras foi determinada através do corante azul de Evans (Sigma, St. Louis, EUA). Todos os procedimentos cirúrgicos executados no experimento foram realizados com suspensão fúngica, com viabilidade entre 90 e 95%.

3.11 Infecção Intratraqueal (i.t.)

As leveduras foram lavadas com PBS, antes de serem administradas, e a concentração foi ajustada para 3×10^5 células/ $50 \mu\text{l}^{-1}$. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, com $200 \mu\text{l}$ de solução contendo 80 mg kg^{-1} de ketamina (União Química, Brasil) e 10 mg kg^{-1} de xilazina (União Química, Brasil). Quando os animais apresentaram-se insensíveis à dor (após dez minutos), uma pequena incisão longitudinal na pele do pescoço foi realizada, e a traquéia foi exposta e, com o auxílio de uma seringa (Becton Dickinson, Brasil) de 1 ml , $50 \mu\text{l}$ da suspensão de leveduras foram injetadas. Imediatamente após a infecção, a incisão foi suturada e os camundongos foram mantidos aquecidos, até acordarem da anestesia.

3.12 Terapia com drogas antimicrobianas

Foram seguidos dois protocolos

3.12.1 Primeiro protocolo

Com a terapia iniciada 48 h após a infecção e realizada por 30 dias consecutivos, com administração, a cada 24 h, para os derivados azólicos e para sulfametoxazol, e doses, a cada 48 h, para a anfotericina B. As doses foram definidas nas seguintes concentrações: 15 mg kg^{-1} de sulfametoxazol, $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de anfotericina B, 10 mg kg^{-1} de Itraconazol, 10 mg kg^{-1} de fluconazol e 8 mg kg^{-1} de cetoconazol; todos os antimicrobianos foram administrados por via intraperitoneal. Os animais foram sacrificados após 30 e 90 dias de infecção.

3.12.2 Segundo protocolo

Com a terapia iniciada 30 dias após a infecção intratraqueal dos animais, onde as doses e as concentrações foram seguidas do primeiro protocolo, ocorrendo modificação com a substituição da droga sulfametoxazol pela associação de sulfametoxazol/trimetoprim na concentração de 15/3mg kg⁻¹ de peso. Os animais foram sacrificados com 60 e 120 dias de infecção. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

3.13 Imunização dos camundongos

Camundongos Balb/c machos pesando aproximadamente 25g foram imunizados por via subcutânea, com 20µg do P10, na presença de adjuvante completo de Freud na primeira dose; as doses subseqüentes (3 doses; 1 por semana) foram administradas com adjuvante incompleto. Na primeira dose, a emulsão (50µl) foi inoculada no coxim plantar de uma das patas traseiras; as demais inoculações foram realizadas por via intraperitoneal.

3.14 Grupos utilizados

Foram utilizados 14 grupos de camundongos machos Balb/c, contendo 10 animais cada (os mesmos grupos de animais foram utilizados no desenvolvimento dos dois protocolos), sendo:

Quatro grupos-controle: 1) não-infectado/não-tratado; 2) infectado com Pb 18 e não-tratado; 3) infectado e apenas imunizado com o P10; 4) infectado e imunizado somente com adjuvante completo e / ou incompleto de Freud.

Cinco grupos de camundongos foram infectados e somente tratados com os antimicrobianos: 1) fluconazol, 2) cetoconazol, 3) itraconazol, 4) anfotericina B e 5) sulfametoxazol. No segundo protocolo, ocorreu a substituição da droga Sulfametoxazol pela associação de sulfametoxazol/trimetoprim.

Cinco grupos de camundongos foram infectados e tratados com os antimicrobianos, em associação à imunização com o P10: 1) fluconazol + P10, 2) cetoconazol + P10, 3) itraconazol + P10, 4) anfotericina B + P10 e 5) sulfametoxazol + P10. No segundo protocolo, ocorreu a substituição da droga Sulfametoxazol pela associação de sulfametoxazol/trimetoprim + p10.

3.15 Avaliação do Grau de infecção

O grau de infecção foi caracterizado em animais tratados com drogas em associação, ou não, com a imunização com P10 e seus respectivos controles, através da recuperação de fungos viáveis do pulmão, fígado e baço dos camundongos, após 30 e 90 dias de infecção, no primeiro protocolo, e 60 e 120 dias de infecção. No segundo protocolo, em meio Brain Heart Infusion (BHI) (Difco, laboratories, Detroit, MI, USA), suplementado com 4% (vol/vol) de soro bovino (Gibco, NY, USA) e 5% de filtrado de cultura do isolado 192 do *P. brasiliensis* (53,8), streptomycina/penicillina 10 IU ml⁻¹ (Cultilab, Brasil) e cicloheximida 500 mg ml⁻¹ (Sigma, St Louis, Mo). Após a morte dos animais em câmara de CO₂, os órgãos (pulmão, baço e fígado) foram extirpados, divididos ao meio e pesados, imediatamente. Com o auxílio de um homogeneizador manual, as células foram rompidas em 1 ml de PBS; dessa solução, 100 µL foram plaqueados e incubados a

37°C, e as colônias foram contadas, diariamente, até que nenhum aumento em UFC fosse observado.

3.16 Detecção por ELISA de anticorpos (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) anti-gp43 com 30 e 90 dias de infecção (1º protocolo)

Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, que foram sensibilizados com 200 mg de gp43, durante 12 h, a 4-8° C. As placas foram, então, lavadas com PBS Tween 20 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com BSA 1%, a 37° C. Após nova lavagem, foram adicionados 50 µl de soro de camundongos, diluídos, inicialmente, a 1/200, seguindo-se titulações com diluições subseqüentes na razão 2, e incubação, por 1 hora, a 37° C. Um anticorpo específico para cada isotipo marcado com biotina (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgG total – BD PharMingen, San Diego) foi adicionado após as lavagens, seguindo-se incubação, por 1 hora, a 37° C. As placas foram novamente lavadas com PBS-T e os conjugados enzimáticos adicionados (streptoavidina-fosfatase alcalina). A reação foi desenvolvida pela adição de substrato para fosfatase (Sigma, St. Louis). A leitura foi realizada em microleitor de ELISA (Labsystems iEMS Analyser, Helsinki), com filtro de 405nm.

As amostras foram consideradas positivas para anticorpos anti-gp43, quando a D.O. (405nm) fosse superior a 0,200, segundo o “cut off” obtido pela média das absorbâncias obtidas para os animais-controle, durante a realização dos testes.

3.17 Caracterização das Citocinas: ELISA para a Quantificação de IL-4, IL-10 IL-12 e IFN-γ

As dosagens de citocinas foram feitas, quantitativamente, por ELISA de captura (BD PharMingen, San Diego, CA). Os poços foram sensibilizados com 50µl de anticorpos monoclonais (capture), durante 12h, entre 4 e 8°C. As placas foram, então, lavadas com PBS -Tween 20 0,05% (PBS – T) e bloqueadas com 200µl de PBS-BSA 1%, por 1h, em temperatura ambiente. Após serem novamente lavadas, foram adicionados 100µL das amostras (sobrenadante de macerado de pulmão) e os padrões (citocinas recombinantes de camundongos – Pharmingen) e, em seguida, foram encubadas por 2h, em temperatura ambiente. Após esse período de incubação, as placas foram novamente lavadas com PBS – Tween 20 0,05% e foram adicionados 50µl do conjugado “Working detector (detection Ab + avidin-HRP)” em cada orifício, sendo incubado por 1h, em temperatura ambiente. Após esse período de incubação, as placas foram novamente lavadas 10x com PBS Tween 20 0,05% e foram adicionados 50µl do substrato (TMB substrate reagent set Pharmigen), sendo incubadas, em temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos, sendo que a reação foi parada com 25 µl de H₂SO₄ 2N, e as leituras foram feitas em comprimento de onda de 450 nm (Multiskan EX, USA.).

3.18 Histopatologia

Uma fração do pulmão foi acondicionada em um tubo contendo formalina (Merck, Alemanha) 10% e enviada para a realização da análise histopatológica.

3.19 Imunossupressão dos Camundongos Balb/c

Os camundongos foram induzidos à imunossupressão, onde o fosfato sódico de dexametasona foi administrado na água de beber dos animais, em uma concentração de 0,15 mg Kg⁻¹, durante 30 dias, considerando que cada animal beba

cerca de 5ml de água por dia, com um peso corporal médio de 25g. Esse período foi definido com medições diárias de HTT, pois, a partir do vigésimo dia, os animais não respondiam mais ao antígeno bruto Fava Netto, quando comparados com os grupos-controle. Os animais foram mantidos em ambiente livre de patógenos, onde suas gaiolas foram protegidas por filtros estéreis, a água de beber, a ração e a maravalha foram autoclavadas e todos os procedimentos foram realizados no fluxo laminar.

3.20 Reação de HTT

Para verificar a integridade da resposta imune-celular, reações de HTT contra o antígeno bruto de Pb 18 foram avaliadas durante a administração da dexametasona. No coxim plantar da pata esquerda dos camundongos, foi injetado, pela via subcutânea, 25µl de solução do antígeno bruto. A espessura da pata dos animais foi medida 24h após a injeção utilizando-se calibrador visual (precisão de 0,01 mm, Mitutoyo, Japan). As medições foram diárias, e as alterações na espessura das patas dos animais foram avaliadas.

3.21 Terapia com drogas antimicrobianas nos animais anérgicos

A terapia foi iniciada 15 dias após a infecção e será de 30 dias consecutivos, com doses a cada 24h para o itraconazol e para o sulfametoxazol-trimetoprim. As doses serão definidas com as concentrações de 15/3 mg kg⁻¹ de sulfametoxazol-trimetoprim (respectivamente) e 10 mg kg⁻¹ de Itraconazol. Os antimicrobianos serão administrados pela via intraperitoneal; todas as quantidades administradas das drogas serão baseadas nos tratamentos seguidos em humanos.

3.22 Análise de diferentes adjuvantes associados com P10 e P10, apenas, usados para tratar camundongos Balb/c infectados com *P. brasiliensis*

Animais foram infectados com 3×10^5 cels de Pb 18 e, após 30 dias, a terapia foi iniciada. Foi utilizado adjuvante de Freund emulsificado com a mesma quantidade de P10 (50µl). Alumen (Hidróxido de Alumínio) foi administrado no mesmo volume que o P10 (50µl), e MPLA (Monofosforilipidio A), na concentração de 1µg por animal, onde também foram levados ao vórtex juntamente com o peptídeo. Todos foram administrados num total de 4 doses, sendo uma por semana. Após a quarta dose, e quando os animais completaram 90 dias de infecção, todos foram sacrificados e os ensaios de unidades formadoras de colônias foram realizados.

3.23 Análise Estatística

Os animais tratados e os controles foram analisados pelo teste t do Student e/ou pelo Kruskal-wallis statistic (Primer; McGraw-Hill, New York, NY).

4 RESULTADOS.

4.1 Purificação da glicoproteína de 43 kDa (gp43)

O exoantígeno bruto produzido em meio UBA foi separado das leveduras por filtração. Do sobrenadante, posteriormente, realizamos a purificação da proteína em coluna de afinidade (CNBr-4b) acoplada com anticorpos monoclonais (17c) contra a gp43. Conforme mostra a figura 1, na coloração pela prata, observamos na coluna (a) a corrida eletroforética do padrão de proteínas de diferentes massas moleculares, e na coluna (b) a gp43 purificada.

Figura 1- Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) do exoantígeno purificado de *P. brasiliensis*, gp43 (B), liberado no meio UBA. Coloração pela prata. Os valores em kDa (B) representam as massas moleculares dos padrões: Soro Albumina-Bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Lactado Dehidrogenase (35 kDa), Endonuclease de Restrição Bsp98I (25 kDa) e Lisozima (14,4 kDa).

4.2 Teste de sensibilidade dos antimicrobianos frente ao isolado virulento de Pb 18

Para certificar a atividade antifúngica das drogas utilizadas neste trabalho, avaliamos, por ensaios *in vitro*, os efeitos dos antimicrobianos da Anfotericina B (fungizon® Bristol Mayers Squibb, Brasil), Cetoconazol (Janssen-Cilag®, Brasil), Fluconazol (Pfizer®, USA), Itraconazol Janssen-Cilag®, Brasil), Sulfametoxazol (Sigma, St. Louis, MO) e Sulfametoxazol/Trimetoprim (Bac-sulfitrin, Ducto, Brasil) frente ao isolado virulento de Pb 18, de acordo com a técnica da macrodiluição, descrita por Shadomy et al. (1980 & 1987) e Handam & Resende (1998).

Os resultados obtidos em nosso laboratório e representados na tabela 1 estão de acordo com aqueles relatados nas literaturas. As pequenas variações observadas referem-se às diferenças na interpretação visual, o que é perfeitamente aceitável.

Tabela 1: Teste de sensibilidade de drogas antifúngicas frente ao isolado virulento de Pb 18 (Antifungigrama).

Droga	Concentração Inibitória mínima ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
	Resultados obtidos	Resultados das Literaturas
Anfotericina B	0.08/0.21	0.06/0.243 (Lacaz et al., 1959)
Cetoconazol	0.0025/0.0082	0.001/0.007 (San-Blás et al., 1993)
Fluconazol	0.12/64	0.125/64 (MacGinnis et al., 1997)
Itraconazol	0.0006/0.025	0.0005/0.031 (Restrepo et al., 1984)
Sulfametoxazol	200/600	300/600 (Restrepo & Arango, 1980)
Sulfal/Trimet.	64/12.8/8/1.6	46.9/9.4/0.97/0.2 (Stevens & Vo, 1982)

Tabela. (1). Resultados obtidos segundo a técnica da macrodiluição. Valores mínimos e máximos da inibição do *P. brasiliensis* encontrados nos testes *in vitro* das drogas anfotericina B (fungizon® Bristol Mayers Squibb, Brasil), cetoconazol (Janssen-Cilag® Brasil), fluconazol (Pfizer® USA) itraconazol (Janssen-Cilag® Brasil), sulfametoxazol (Sigma, St. Louis, MO) e sulfametoxazol/trimetoprim (Bac-sulfitrin, Ducto Brasil).

4.3 Unidades Formadoras de colônias - 1º protocolo: Avaliação do grau de infecção dos animais, com o tratamento iniciado 48h após a infecção intratraqueal (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção).

4.3.1 Camundongos Balb/c infectados e tratados com itraconazol, imunizados, ou não, com peptídeo 10 (P10)

Avaliamos a eficácia do itraconazol associado, ou não, à imunização com o P10, no controle da paracoccidioidomicose experimental, com o tratamento iniciado 48 após a infecção dos animais por via intratraqueal (Fig. 2)

Nos animais que foram sacrificados com 30 dias de infecção, tratados com dosagens diárias de itraconazol e imunizados com P10, observamos diminuição

significativa de UFCs em seus pulmões e diminuição da disseminação para outros órgãos como o baço e o fígado, quando comparamos com os resultados obtidos nos animais que foram apenas tratados com itraconazol.

Com 90 dias de infecção, o grupo de animais tratados apenas com itraconazol apresentou maior disseminação da doença e sensível aumento de UFCs nos pulmões, sendo que, em animais tratados com itraconazol associado à imunização com P10, não se observou o mesmo padrão (Fig. 2).

Figura 2: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados com itraconazol, por 30 dias, associado, ou não, à imunização com P10, e sacrificados após 30 e 90 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e/ou incompleto de Freud e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$: diferença entre animais tratados apenas com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

4.3.2 Camundongos Balb/c infectados e tratados com fluconazol, imunizados, ou não, com P10

Ao analisarmos os órgãos dos camundongos Balb/c sacrificados com 30 dias de infecção e tratados apenas com fluconazol, verificamos maior número de UFCs

nos pulmões desses animais e maior disseminação da doença. Observamos, entretanto, diminuição significativa nas UFCs dos pulmões dos animais tratados com fluconazol e imunizados com P10, com menor disseminação da doença para outros órgãos, como o baço e o fígado (Fig.4).

Nos animais que foram analisados com 90 dias de infecção, observamos disseminação da doença para o baço, e aumento nas UFCs dos pulmões dos camundongos somente tratados com fluconazol; mas a associação da droga com a imunização com P10 resultou na diminuição das UFCs dos pulmões, com pequena disseminação de células fúngicas para outros órgãos (Fig.3).

Figura 3: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com Fluconazol, por 30 dias, associado, ou não, à imunização com P10, e sacrificados após 30 e 90 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e/ou incompleto de Freud e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$: diferença entre animais tratados apenas com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

4.3.3 Camundongos Balb/c infectados e tratados com cetoconazol, imunizados, ou não, com P10

Com 30 dias de infecção, não observamos diminuição significativa nas UFCs dos pulmões dos animais que foram tratados apenas com cetoconazol em relação aos animais que foram tratados com a droga e imunizados com P10.

Nos pulmões dos animais analisados com 90 dias de infecção, observamos aumento nas UFCs nos animais tratados apenas com cetoconazol. Com a interrupção do tratamento, o número de células viáveis recuperadas dos pulmões desses animais aumentou, ocasionando o que denominamos de pequena recidiva. O grupo de camundongos tratado com cetoconazol e imunizado com P10 resultou na diminuição significativa nas UFCs dos pulmões e no bloqueio da disseminação para outros órgãos (Fig. 4).

Figura 4: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com cetoconazol, por 30 dias, associado, ou não, à imunização com P10, e sacrificados após 30 e 90 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e/ou incompleto de Freud e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$: diferença entre animais tratados apenas com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

4.3.4 Camundongos Balb/c infectados e tratados com anfotericina B, imunizados, ou não, com P10. Após 30 dias de infecção, não observamos diminuição significativa nas UFCs dos pulmões dos animais tratados com a anfotericina B e imunizados com P10, quando comparamos com o grupo de animais infectados e tratados apenas com a droga. A anfotericina B, administrada sozinha, demonstrou um bom desempenho, com diminuição das células viáveis nos pulmões dos animais. Ao associarmos a droga à imunização com o P10, observamos, entretanto, menor disseminação da doença para outros órgãos, como o baço e o fígado (Fig. 5).

Com 90 dias de infecção, a droga associada ao P10 foi capaz de impedir a progressão da doença, mantendo o número nas UFCs dos pulmões dos animais e evitando a disseminação da doença para o fígado e o baço (Fig. 5).

Figura 5: UFCs de pulmão, baço e fígado de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com anfotericina B, por 30 dias, com doses a cada 48 horas, associado, ou não, à imunização com P10, e sacrificados após 30 e 90 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e/ou incompleto de Freud e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$: diferença entre animais tratados apenas com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

4.3.5 Camundongos Balb/c infectados e tratados com sulfametoxazol, imunizados, ou não, com peptídeo 10 (P10)

Após 30 dias de infecção, ocorreu diminuição significativa nas UFCs dos pulmões dos animais tratados com sulfametoxazol e imunizados com o P10, quando comparamos os resultados das UFCs encontradas nos pulmões dos animais que foram apenas tratados com sulfametoxazol. A disseminação da doença para outros órgãos, como o baço e o fígado, também diminuiu nos grupos dos animais que receberam o tratamento associado à imunização com P10. (Fig. 6).

Ao analisarmos os animais com 90 dias de infecção, o que se observou foi um aumento significativo nas UFCs dos pulmões dos animais, com a descontinuidade do tratamento. O grupo de animais que recebeu apenas a droga adoeceu de maneira marcante, com grande número de fungos nos pulmões e disseminação da doença

para o baço e o fígado. A associação da droga com o P10 foi suficiente para impedir o progresso da doença, reduzindo as contagens nas UFCs dos pulmões e impedindo a disseminação da doença (Fig. 6). Todos esses ensaios foram feitos em duplicatas.

O tratamento dos camundongos com as drogas antifúngicas, associado à imunização com P10, diminuiu cerca de 50 – 65% das UFCs nos pulmões dos camundongos Balb/c, no intervalo de infecção que desenvolvemos no primeiro protocolo (30 e 90 dias de infecção).

Figura 6: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com sulfametoxazol (sulfa), por 30 dias, associado, ou não, à imunização com P10, e sacrificados após 30 e 90 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e/ou incompleto de Freud e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$: diferença entre animais tratados apenas com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

4.4 Padrões das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, e IFN- γ nos camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados, com intervalo de 48 h, após a infecção, com as drogas antifúngicas associadas, ou não, à imunização com P10 (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção). As dosagens

de citocinas foram feitas por Elisa, a partir do homogeneizado dos pulmões dos camundongos Balb/c, infectados e tratados com as drogas em associação, ou não, com o P10.

As concentrações de citocinas, detectadas nos animais com 30 dias de infecção, apresentaram aumento significativo de IFN- γ na maioria dos grupos de animais que receberam as drogas antifúngicas associadas à imunização com o P10, exceto no grupo que foi tratado com anfotericina B associado ao P10, onde não se observaram modificações significativas quanto ao IFN- γ , provavelmente devido ao tempo de infecção, sugerindo uma ação mais efetiva e prolongada do P10, à medida que aumenta o seu período de exposição. Quando analisamos os níveis de IL-12, ocorreu aumento significativo no grupo tratado com anfotericina B, em associação com P10. Para a IL-10, foi observada diminuição dessa citocina em todos os grupos tratados e imunizados com P10. Em relação à citocina IL-4, não se observou redução em seus níveis nos grupos tratados com anfotericina B e itraconazol, em associação com P10. Os resultados estão expressos na tabela 2.

Ao analisarmos os grupos de animais com 90 dias de infecção, observamos um aumento significativo na produção de IFN- γ e IL-12, na maioria dos grupos tratados com as drogas antifúngicas e imunizados com P10. Ao analisarmos IL-4 e IL-10, observamos diminuição significativa dessas citocinas nos pulmões da maioria dos grupos de animais que foram tratados apenas com as drogas. É importante ressaltar que, de maneira geral, ocorreu um aumento nos níveis de IFN- γ e IL-12, na maioria dos grupos que receberam imunização, onde, nesses mesmos, a diminuição das citocinas IL-4 e IL-12 também foi marcante, ocorrendo, assim, um deslocamento

da resposta imune para um padrão predominantemente Th1. Os resultados estão expressos na tabela 2.

Tabela 2: Níveis de citocinas dos pulmões de camundongos Balb/c, com 30 e 90 dias de infecção, imunizados, ou não, com peptídeo 10 (48 após i.t.).

citocinas pg/mL	IL-4		IL-10		IL-12		IFN- γ	
	30	90	30	90	30	90	30	90
Dias de Infecção								
Sham	952 +/- 62	962 +/- 62,4	5680 +/- 461	5680 +/-461	16950 +/-1744	18950 +/-2744	826 +/- 171	836 +/- 71
Adjuvante	988+/-111	854+/-70,7	4997+/-488	4221+/-726	15021/-1012	10121+/-1014	911+/-111	914+/-102
Não tratados	2616 +/- 271	1771 +/- 170,7	15652 +/-2416	12850+/-2853	36033 +/-2251	35800 +/-2848	2906 +/- 327	3170 +/- 14
P10	1640 +/- 250	1065 +/- 163,3	12525 +/-1611	8500 +/-628,3	46233 +/- 3767	31600 +/-2707	4396 +/- 352	4515 +/- 77
Fluconazol	2900 +/- 903	4480 +/- 728#	23600+/-2608#	22650+/-2089#	37566+/-4564	95100+/-5433	5446 +/- 333	4400 +/- 669
Fluco + P10	2850 +/- 534	2530 +/- 314	16633 +/-2609	14400+/-2565	56600+/-3786*	94500+/-4534	6970 +/- 405*	6280 +/- 854*
Cetoconazol	5293 +/- 913#	2055 +/- 249	25500+/-2500#	10035+/-1987#	47566 +/-4429	43950 +/-2767	5610 +/- 355	2885 +/- 390
Ceto + P10	2936 +/- 258	1845 +/- 237	21666 +/-2159	7750 +/- 353	64200+/-4333*	52100+/-1989*	6990 +/- 493*	3955 +/- 577*
Itraconazol	2893 +/- 273	2170 +/- 328#	20700+/-2577#	11950+/-2433	58000 +/-2873	48765+/-2888	2643 +/- 399	1750 +/- 295
Itra + P10	3486 +/-705	1130 +/- 284	15613 +/- 608	13050+/-2453	49500+/-3786	48600+/-4121	4313 +/- 256*	2790 +/- 454*
Anfotericina B	1546 +/- 274	1345 +/- 106	16100+/-2458#	13500 +/- 707	35533+/-3132	42900 +/-2565	4240 +/- 117	3490 +/- 697
Anfo + P10	2486 +/- 405	2295 +/- 389#	13500 +/-1707	12700 +/- 424	61266+/-4034*	46300+/-2765*	3390 +/- 140	4630 +/- 899*
Sulfametoxazol	4597 +/- 697#	3145 +/- 863#	21366 +/-3450	22450+/-2353#	52200+/-2878	33700+/-2555	3603 +/- 361	2505 +/- 548
Sulfa + P10	3026 +/- 587	1265 +/- 345	19333 +/-2577	13000 +/- 1221	51427+/-3777	61266+/-4324*	4560 +/- 311*	8520 +/- 513*

Tabela 2: Dosagens de citocinas pelo método Elisa de homogeneizado dos pulmões de camundongos Balb/c, infectados por via intratraqueal com 3×10^5 cels de *P. brasiliensis* e tratados com as drogas antifúngicas, associadas, ou não, à imunização com P10, e sacrificados com 30 e 90 dias de infecção. Os valores destacados em negrito indicam a predominância das respostas Th1/Th2, de acordo com as citocinas produzidas (IL-12/INF- γ ou IL-4/IL-10, respectivamente). *: significância ($p < 0,05$) em relação aos camundongos tratados apenas com as drogas; #: significância ($p < 0,05$) relativa aos camundongos tratados com as drogas associadas à imunização com P10.

4.5 Histologia do pulmão de camundongos Balb/c tratados com sulfametoxazol, 48h após a infecção intratraqueal e associados, ou não, ao peptídeo 10 (P10) (Animais sacrificados com 30 e 90 dias de infecção)

Na Figura 7, podemos comparar, através de cortes histológicos corados com Gomori, os diferentes grupos estudados.

Em estudos realizados em nosso laboratório com dados histológicos, em cortes corados com HE (dados não mostrados), verificamos que os pulmões dos camundongos apenas infectados apresentaram intensa infiltração de macrófagos, linfócitos, células epitelióides, parênquima pulmonar inflamado, muito comprometido e granulomas desorganizados com muitas células fúngicas em seu interior. Nos animais submetidos ao tratamento quimioterápico associado à imunização com P10, detectamos, entretanto, a formação de granulomas com melhor organização em relação ao grupo descrito acima, e com marcante redução no número de células fúngicas e inúmeras áreas preservadas. Ao submetermos os mesmos cortes para coloração com Gomori, observamos grande quantidade de células fúngicas viáveis nos pulmões dos animais que foram apenas tratados com as drogas. Nos animais que foram tratados e imunizados com P10, verificamos poucas células fúngicas, com menor porcentagem de áreas inflamadas (Fig. 7).

Figura 7: Comparação histológica dos pulmões de camundongos Balb/c infectados e tratados 48 horas após i.t. (90 dias de infecção). (A): animais infectados e não-tratados; (B): animais infectados e apenas imunizados com P10; (C): animais infectados e tratados apenas com sulfametoxazol; (D): animais infectados e tratados com sulfametoxazol associado à imunização com P10. Foram analisados 100 campos microscópicos para cada grupo, encontrando-se os seguintes resultados: Grupo A: granulomas com leveduras (14%), e áreas não-inflamadas (11%); Grupo B: granulomas com leveduras (10%) e áreas não-inflamadas (51%); Grupo C: granulomas com leveduras (22%) e áreas não-inflamadas (19%); Grupo D: granulomas com leveduras (10%) e áreas não-inflamadas (51%). Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas nos grupos tratados com P10. Lâminas coradas por Gomori. Aumento de 10x.

4.6 Detecção de anticorpos contra gp43 de *P. brasiliensis* em camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal com o isolado virulento de Pb18, imunizados, ou não, com P10, sem administração das drogas antifúngicas (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção)

Os camundongos infectados e não-imunizados, após 30 dias, apresentaram o seguinte perfil de imunoglobulinas específicas: IgM>IgG2a>IgG1>IgG3 (Figura 8a); a imunização com o P10 não alterou, de forma significativa, a concentração dos isotipos apresentando o seguinte perfil: IgM>IgG2a>IgG3>IgG1 (Figura 8b).

Utilizando-se o mesmo método descrito acima para determinar a concentração de cada isotipo. Foram obtidos os seguintes resultados, após 90 dias de infecção: animais não-imunizados com o P10: IgG2a>IgG1=IgM>IgG3=IgG2b (Figura 8c) e animais imunizados com P10: IgG2a>IgGM>IgG2b>IgG1>IgG3 (Figura 8d).

Figura 8: Curva de titulação de anticorpos contra gp-43 dosados no soro dos animais infectados, tratados e/ou imunizados, e sacrificados com 30 ou 90 dias de infecção.

Figura 8: Análise, por ELISA, dos diferentes isotipos presentes no soro de camundongos Balb/c, infectados intratraquealmente com Pb18, após 30 e 90 dias de infecção. (a): animais somente infectados (30 dias de infecção), (b): animais infectados e imunizados com P10 (30 dias de infecção), (c): animais somente infectados (90 dias de infecção), (d): animais infectados e imunizados com P10 (90 dias de infecção). A concentração de cada isotipo foi determinada através do ponto médio de cada curva.

4.7 Detecção de anticorpos contra gp43 de *P. brasiliensis* em camundongos

Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados, com intervalo de 48 h, após

infecção, com fluconazol associado, ou não, à imunização com P10 (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção)

A concentração de cada Isotipo foi determinada por curva de titulação, onde foi utilizado o ponto médio da curva, como referência, para a determinação do título.

Os camundongos tratados com fluconazol, após 30 dias de infecção, apresentaram o seguinte perfil de imunoglobulinas específicas: IgG1>IgG2a>IgM>IgG3 (Figura 9a). Quando o tratamento da doença com as drogas antifúngicas foi associado à imunização com P10, observamos alteração, de forma significativa, na concentração de IgG2a, apresentando o seguinte perfil: IgG2a=IgM>IgG1=IgG3 (Figura 9b). O aumento de IgG2a nos animais imunizados com P10 ocorreu devido ao aumento de IFN- γ (citocina que regula esse isotipo, tabela 2).

Utilizando-se o mesmo método descrito acima para determinar a concentração de cada isotipo, foram obtidos os seguintes resultados, após 90 dias de infecção: animais tratados com fluconazol: IgG2a>IgG1>IgM>IgG3 (Figura 9c) e animais tratados com fluconazol + imunização com P10: IgG2a=IgGM>IgG3=IgG1>IgG2b (Figura 9d).

Figura 9: Curva de titulação de anticorpos contra gp-43 dosados no soro dos animais infectados, tratados e/ou imunizados, e sacrificados com 30 ou 90 dias de infecção.

Figura 9: Análise, por ELISA, dos diferentes isotipos presentes no soro de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente com Pb18, após 30 e 90 dias de infecção. (a): animais tratados com fluconazol (30 dias de infecção), (b): animais tratados com fluconazol e imunizados com P10 (30 dias de infecção), (c): animais tratados com fluconazol (90 dias de infecção) e (d): animais tratados com fluconazol e imunizados com P10 (90 dias de infecção). A concentração de cada isotipo foi determinada através do ponto médio de cada curva.

4.8 Detecção de anticorpos contra gp43 de *P. brasiliensis* em camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados, com intervalo de 48 h, após infecção, com anfotericina B associado, ou não, à imunização com P10. (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção)

Os camundongos tratados com anfotericina B, após 30 dias, apresentaram o seguinte perfil de imunoglobulinas específicas: IgG2a=IgM>IgG1>IgG2b (Figura 10a). A associação do tratamento medicamentoso e a imunização com o P10

alterou, de forma significativa, a concentração de alguns isotipos, principalmente do isotipo IgG2a, apresentando o seguinte perfil: IgG2a>IgM>IgG3=IgG1>Ig 2b (Figura 10b).

Após 90 dias de infecção, a concentração dos isotipos nos camundongos tratados com anfotericina B foi: IgG2a=IgGM>IgG3>IgG1 (Figura 10c) e nos animais tratados com anfotericina B + imunização com P10 foi: IgG2a>IgM>IgG3=IgG1>IgG2b (Figura 10d).

Figura 10: Curva de titulação de anticorpos contra gp-43 dosados no soro dos animais infectados, tratados e/ou imunizados, e sacrificados com 30 ou 90 dias de infecção.

Figura 10: Análise, por ELISA, dos diferentes isotipos presentes no soro de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente com Pb18, após 30 e 90 dias de infecção. (a): animais tratados com anfotericina B (30 dias de infecção), (b): animais tratados com anfotericina B e imunizados com P10 (30 dias de infecção), (c): animais tratados com anfotericina B (90 dias de infecção) e (d): animais tratados com anfotericina B e imunizados com P10 (90 dias de infecção). A concentração de cada isotipo foi determinada através do ponto médio de cada curva.

4.9 Detecção de anticorpos contra gp43 de *P. brasiliensis* em camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados, com intervalo de 48 h, após infecção, com itraconazol associado, ou não, à imunização com P10 (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção)

Os camundongos tratados com itraconazol, após 30 dias, apresentaram o seguinte perfil de imunoglobulinas específicas: IgG2a>IgG1>IgM>IgG3 (Figura 11a). A associação do tratamento medicamentoso com a imunização com o P10 alterou a concentração de alguns isotipos, apresentando o seguinte perfil: IgG2a=IgG1>IgM=IgG3 (Figura 11b).

Após 90 dias de infecção, o perfil dos isotipos foi: animais tratados com itraconazol: IgG2a>IgGM>IgG3>IgG1>IgG2b (Figura 11c) e animais tratados com itraconazol + imunização com P10: IgM>IgG3>IgG2a=IgG1>IgG2b (Figura 11d).

Figura 11: Curva de titulação de anticorpos contra gp-43 dosados no soro dos animais infectados, tratados e/ou imunizados, e sacrificados com 30 ou 90 dias de infecção.

Figura 11: Análise, por ELISA, dos diferentes isotipos presentes no soro de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente com Pb18, após 30 e 90 dias de infecção. (a): animais tratados com itraconazol (30 dias de infecção), (b): animais tratados com itraconazol e imunizados com P10 (30 dias de infecção), (c): animais tratados com itraconazol (90 dias de infecção) e (d): animais tratados com itraconazol e imunizados com P10 (90 dias de infecção). A concentração de cada isotipo foi determinada através do ponto médio de cada curva.

4.10 Detecção de anticorpos contra gp43 de *P. brasiliensis* em camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados, com intervalo de 48 h, após infecção, com Cetoconazol associado, ou não, à imunização com P10 (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção)

Os camundongos tratados com cetoconazol, após 30 dias, apresentaram o seguinte perfil de imunoglobulinas específicas: IgG2a=IgM>IgG1 (Figura 12a). A

associação do tratamento medicamentoso com a imunização com o P10 não alterou a concentração dos isotipos $\text{IgG2a}=\text{IgM}>\text{IgG 1}$ (Figura 12b).

Após 90 dias de infecção, os animais tratados com cetoconazol apresentaram o seguinte perfil: $\text{IgG2a}>\text{IgM}>\text{IgG1}>\text{IgG3}$ (Figura 12c) e animais tratados com cetoconazol + imunização com P10: $\text{IgG2a}=\text{IgGM}>\text{IgG3}>\text{IgG1}$ (Figura 12d).

Figura 12: Curva de titulação de anticorpos contra gp-43 dosados no soro dos animais infectados, tratados e/ou imunizados, e sacrificados com 30 ou 90 dias de infecção.

Figura 12: Análise, por ELISA, dos diferentes isotipos presentes no soro de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente com Pb18, após 30 e 90 dias de infecção. (a): animais tratados com cetoconazol (30 dias de infecção), (b): animais tratados com cetoconazol e imunizados com P10 (30 dias de infecção), (c): animais tratados com cetoconazol (90 dias de infecção) e (d): animais tratados com cetoconazol e imunizados com P10 (90 dias de infecção). A concentração de cada isotipo foi determinada através do ponto médio de cada curva.

4.11 Detecção de anticorpos contra gp43 de *P. brasiliensis* em camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados, com intervalo de 48 h, após infecção, com sulfametoxazol associado, ou não, à imunização com P10 (Os animais foram sacrificados com 30 e 90 dias de infecção)

A concentração de cada Isotipo foi realizada por curva de titulação, onde foi utilizado o ponto médio da curva, como referência, para a determinação do título.

Os camundongos tratados com sulfametoxazol, após 30 dias, apresentaram o seguinte perfil de imunoglobulinas específicas: IgG2a>IgM>IgG1>IgG3 (Figura 13a). A associação do tratamento medicamentoso com a imunização com o P10 não alterou, de forma significativa, a concentração dos isotipos: IgG2a=IgM>IgG1 (Figura 13b).

Após 90 dias de infecção, os animais tratados com sulfametoxazol apresentaram o seguinte perfil: IgM=IgG2a=IgG1>IgG3 (Figura 13c) e animais tratados com sulfametoxazol + imunização com P10: IgGM=IgG2a=IgG1>IgG3=IgG2b (Figura 13d).

Figura 13: Curva de titulação de anticorpos contra gp-43 dosados no soro dos animais infectados, tratados e/ou imunizados, e sacrificados com 30 ou 90 dias de infecção.

Figura 13: Análise, por ELISA, dos diferentes isotipos presentes no soro de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente com Pb18, após 30 e 90 dias de infecção. (a): animais tratados com sulfametoxazol (30 dias de infecção), (b): animais tratados com sulfametoxazol e imunizados com P10 (30 dias de infecção), (c): animais tratados com sulfametoxazol (90 dias de infecção) e (d): animais tratados com sulfametoxazol e imunizados com P10 (90 dias de infecção). A concentração de cada isotipo foi determinada através do ponto médio de cada curva.

4.12 Unidades Formadoras de colônias - 2º protocolo: Avaliação do grau de infecção dos animais com o tratamento iniciado 30 dias após a infecção intratraqueal (Os animais foram sacrificados com 60 e 120 dias de infecção)

Após o primeiro protocolo ter sido realizado, com o tratamento da doença iniciado 48 horas após a infecção dos animais, realizamos um segundo protocolo, onde as drogas começaram a ser administradas 30 dias após a infecção intratraqueal, com a doença totalmente estabelecida. Totalizando 60 e 120 dias de

infecção, realizamos os experimentos de verificação do grau de comprometimento dos órgãos dos animais, através das unidades formadoras de colônia. Esse segundo protocolo foi desenvolvido com parâmetros semelhantes aos desenvolvidos no protocolo anterior, mas a droga sulfametoxazol foi substituída por uma associação de sulfametoxazol/trimetoprim, que é a droga de uso mais comum, atualmente, principalmente em ambientes hospitalares. As dosagens de anticorpos anti-gp43 não foram realizadas, pois, a partir de 90 dias de infecção, as quantidades detectadas desses anticorpos permaneceram com títulos constantes.

4.12.1 Camundongos Balb/c infectados e tratados com itraconazol, imunizados, ou não, com peptídeo 10 (P10)

Com 60 dias de infecção, os animais tratados com Itraconazol associado ao P10, apresentaram redução significativa de UFCs nos pulmões, quando comparados com os que receberam o tratamento somente com a droga (Fig. 14).

Com 120 dias de infecção, observamos redução significativa de UFCs nos pulmões dos animais tratados e associados com P10, e diminuição da disseminação do fungo para outros órgãos, em relação aos animais que receberam apenas o antifúngico (Fig. 14).

Figura 14: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com itraconazol, por 30 dias, associado, ou não, à imunização com P10, e sacrificados após 60 e 120 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e / ou incompleto de Freud e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$: diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

4.12.2 Camundongos Balb/c infectados e tratados com fluconazol, imunizados, ou não, com peptídeo 10 (P10)

Nos animais tratados com fluconazol e imunizados com P10, observamos que, com 60 dias de infecção, ocorreu redução significativa das UFCs dos pulmões e baço, mas os animais que receberam tratamento somente com fluconazol apresentaram maior disseminação da doença, com aumento das UFCs em seus pulmões (Fig.15).

Na análise dos animais, com 120 dias de infecção, observamos que ocorreu diminuição significativa das UFCs dos pulmões nos animais tratados com fluconazol e associados à imunização com P10, e pouca disseminação do fungo para outros órgãos, como o baço e o fígado (Fig. 15).

Figura 15: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com fluconazol, por 30 dias, associado, ou não, à imunização com P10, e sacrificados após 60 e 120 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e / ou incompleto de Freud e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$: diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

4.12.3 Camundongos Balb/c infectados e tratados com cetoconazol, imunizados, ou não, com peptídeo 10 (P10)

Os camundongos Balb/c, tratados com cetoconazol e imunizados com P10, apresentaram redução significativa das UFCs dos pulmões com 60 dias de infecção, quando comparados com animais não-imunizados. A diminuição da disseminação para o baço e o fígado foi observada, mas não em valores significativos (Fig. 16).

Com 120 dias de infecção, o efeito da droga associada à imunização do P10 reduziu as UFCs dos pulmões, de maneira significativa, onde os animais que não foram imunizados com P10 apresentaram aumento das UFCs dos pulmões e maior disseminação do fungo para o baço e o fígado (Fig. 16).

Figura 16: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados (30 dias após i.t.) com cetoconazol, por 30 dias, associado, ou não, à imunização com P10, e sacrificados após 60 e 120 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e / ou incompleto de Freud e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$: diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

4.12.4 Camundongos Balb/c infectados e tratados com anfotericina B, imunizados, ou não, com peptídeo 10 (P10)

Animais imunizados com P10 e tratados com anfotericina B, ao serem analisados, com 60 dias de infecção, não apresentaram redução significativa das UFCs dos pulmões, quando comparamos com o tratamento realizado somente com a droga, pois a anfotericina B possui um efeito relevante, mas a disseminação para outros órgãos, como o baço e o fígado, não foi observada na associação do tratamento com a droga e na imunização com o P10 (Fig. 17).

Com 120 dias de infecção, os animais tratados com anfotericina B, associados à imunização com P10, reduziram significativamente as UFCs dos seus pulmões, quando comparamos os animais que receberam apenas a droga, onde o P10 demonstrou melhor ação, por um longo período de infecção (Fig. 17).

Figura 17: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com anfotericina B, por 30 dias, com doses a cada 48 horas, associadas, ou não, à imunização com P10, e sacrificados após 60 e 120 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e / ou incompleto de Freud e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$: diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

4.12.5 Camundongos Balb/c infectados e tratados com sulfametoxazol/trimetoprim, imunizados, ou não, com peptídeo 10 (P10)

Nesse segundo protocolo, não utilizamos o sulfametoxazol, conforme realizado no primeiro protocolo, e, sim, a associação com trimetoprim, droga esta, que é utilizada rotineiramente em nossos hospitais, no tratamento da paracoccidiodomicose. E, quando analisamos os animais com 60 dias de infecção, observamos redução significativa dos animais tratados e imunizados com P10 (Fig. 18).

Os animais tratados apenas com a droga, quando analisados com 120 dias de infecção, apresentaram enorme recidiva, com aumento de UFCs incontáveis em seus pulmões; entretanto, os animais que receberam o tratamento associado à imunização com o P10, reduziram significativamente as UFCs de seus pulmões, e

observamos menor disseminação da doença para órgãos como o baço e o fígado (Fig. 18).

Figura 18: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados intratraquealmente e tratados com sulfametoxazol/trimetoprim (sulfa/trim.), por 30 dias, associado, ou não, à imunização com P10, e sacrificados após 60 e 120 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), animais infectados e tratados com adjuvante completo e / ou incompleto de Freud e animais infectados, porém somente imunizados com P10 (P10). * $p < 0,05$: diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

4.13 Padrões das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, e IFN- γ nos camundongos Balb/c infectados por via intratraqueal e tratados com intervalo de 30 dias, após a infecção, com as drogas antifúngicas associadas, ou não, à imunização com P10. As dosagens de citocinas foram realizadas com o mesmo processo utilizado no primeiro protocolo, onde o homogeneizado de pulmão foi preparado dos animais com 60 e 120 dias de infecção e estocado a -70°C , para os procedimentos de ELISA.

Nos animais com 60 dias de infecção e tratados com cetoconazol, fluconazol e sulfametoxazol/trimetoprim, verificamos aumento significativo de IL-4 e IL-10;

entretanto, animais que foram tratados e imunizados com P10 não demonstraram esse perfil, onde a imunização com P10 nesses grupos de animais levou ao aumento significativo de IL-12. Em animais tratados com Itraconazol associado ao P10, ocorreu apenas aumento significativo de IL-12. No grupo de animais tratados com anfotericina B, imunizados, ou não, com P10, não observamos nenhuma alteração significativa, quando comparados com os grupos de animais-controle (Tab.9).

Nos animais submetidos ao 2º protocolo, exatamente como relatado no primeiro experimento, observamos uma resposta mista de citocinas ligadas aos padrões Th1 e Th2. No grupo de animais imunizados com o P10 ocorreu, entretanto, um aumento significativo de citocinas do tipo Th1.

Nos animais tratados apenas com sulfametoxazol/trimetoprim, ocorreu aumento significativo de IL-4 e IL-10 e, quando analisamos esse grupo, tratado e imunizado com P10, observamos aumento significativo de IFN- γ e IL-12. Nos grupos dos animais tratados com as drogas itraconazol e fluconazol, que receberam a imunização com P10, o que se observou foi, também, aumento significativo de IFN- γ e IL-12, quando comparados com os grupos-controle (Tab.3).

Tabela 3. Níveis de citocinas dos pulmões de camundongos Balb/c, com 30 dias de infecção, imunizados, ou não, com peptídeo 10 (30 dias após i.t.).

citocinas pg/mL Dias de Infecção	IL-4		IL-10		IL-12		IFN- γ	
	60	120	60	120	60	120	60	120
Sham	752+/-78	845+/-85	4680+/-511	3852+/-665	13211+/-958	11789+/-1214	712+/-222	648+/-65
Adjuvante	988+/-111	854+/-70	4997+/-488	4221+/-326	15021/-1012	10121+/-1014	911+/-111	914+/-102
Não tratados	2654+/-112	2312+/-522	16021+/-612	10520+/-1584	38021+/-1562	29522+/-2011	2615+/-214	3852+/-545
P10	1510+/-88	1121+/-232	11115+/-522	6250+/-1128,3	78521+/-2123	63160 +/- 3602	5741+/-612	6412+/-1369
Fluconazol	3120+/-166#	3321 +/-665#	24021+/-1021#	27321+/-2358#	59564+/-1855	63555+/-4312	2985+/-251	3621+/-511
Fluco + P10	1712+/-98	2011+/-501	14333+/-633	22619+/-1545	77512+/-2213*	88888+/-3101*	6021+/-452*	9021+/-741*
Cetoconazol	5312+/-615#	3842+/-852#	26313+/-1245#	14222+/- 2354#	45326+/-2651	52321+/-2988	3011+/-365	2014+/-636
Ceto + P10	3021+/-188	2011+/-654	20231+/-999	11050+/-1655	76582+/-2365*	56500+/-4021*	7112+/-522*	8844+/-766*
Itraconazol	3011+/-318	3015+/-925#	19744+/-823#	17455+/-2011#	59621+/-1025	54114+/-3022	2744+/-329	2113+/-527
Itra + P10	2633+/-215	1855+/-357	13212+/-655	11456+/-1045	79625+/-1653*	44112+/-2958	6623+/-444*	9571+/-1712*
Anfotericina B	1546+/- 274	1879+/-603	17100+/-555#	14101+/-1789	33265+/-2012	44101+/-3012	3111+/-363	4511+/-951
Anfo + P10	1115+/-63	2011+/-518	11011+/-456	13011+/-1412	68222+/-2322*	64111+/-5114*	7751+/-454*	6255+/-18748*
Sulfam./Trimet	5311+/-512#	5845+/-1232#	23121+/-1066#	21456+/-1654#	33665+/-1988	38258+/-2145	2655+/-388	2487+/-358
Sulfa/trim + P10	2955+/-311	3695+/-989	15321+/-633	14258+/-1658	69852+/-2011*	60115+/-2532*	5111+/-522*	10421+/-654*

Tabela 3: Dosagens de citocinas pelo método Elisa de homogeneizado dos pulmões de camundongos Balb/c, infectados por via intratraqueal com 3×10^5 cels de *P. brasiliensis* e tratados com as drogas antifúngicas, associadas, ou não, à imunização com P10, e sacrificados com 60 e 120 dias de infecção. Os valores destacados em negrito indicam a predominância das respostas Th1/Th2, de acordo com as citocinas produzidas (IL-12/INF- γ ou IL-4/IL-10, respectivamente). #: significância ($p < 0,05$) relativa aos camundongos tratados apenas com as drogas; *: significância ($p < 0,05$) relativa aos camundongos tratados com as drogas associadas à imunização com P10.

4.14 Histologia do pulmão de camundongos Balb/c tratados com antifúngicos, 30 dias após a infecção intratraqueal, e associados, ou não, ao P10 (Os animais foram sacrificados com 60 e 120 dias de infecção)

Na Figura 19, podemos comparar, através de cortes histológicos corados com Gomori, os diferentes grupos estudados. Para melhor exemplificarmos, decidimos enfatizar apenas os grupos de animais tratados com sulfametoxazol/trimetoprim, em associação, ou não, com o P10.

Na figura 19, mostramos, em coloração por Gomori, onde os camundongos começaram a ser tratados com sulfametoxazol/trimetoprim e / ou imunizados com P10, 30 dias após a infecção intratraqueal. Podemos observar, nos pulmões dos camundongos infectados, tratados apenas com a droga, ou não tratados, maior intensidade de células viáveis, comparado com os animais que foram tratados e imunizados com P10. Em coloração por HE (dados não mostrados), observamos intensa infiltração, principalmente de macrófagos; observamos, também, a presença de células gigantes e intensa quantidade de células fúngicas. Nos pulmões dos camundongos infectados e apenas tratados com sulfametoxazol/trimetoprim, verificamos que houve uma recidiva, após o término do tratamento, com intensificação da quantidade das células fúngicas encontradas e relatadas, anteriormente, pelas UFCs desses pulmões (Fig.18). Ao analisarmos os pulmões dos camundongos tratados com sulfametoxazol/trimetoprim, associado à imunização com o P10, houve, entretanto, redução da quantidade de leveduras presentes e grande aumento das áreas preservadas desses pulmões, onde, nesse caso,

claramente, a imunização dos camundongos com P10 foi de essencial ajuda na contenção da doença.

Figura.19: Comparação histológica dos pulmões de camundongos Balb/c infectados e tratados 30 dias após i.t. (120 dias de infecção). (A): animais infectados e não-tratados; (B): animais infectados e apenas imunizados com P10; (C): animais infectados e tratados apenas com sulfametoxazol; (D): animais infectados e tratados com sulfametoxazol associado à imunização com P10. Foram analisados 100 campos microscópicos para cada grupo, encontrando-se os seguintes resultados: Grupo A: granulomas com leveduras (24%) e áreas não-inflamadas (27%); Grupo B: granulomas com leveduras (15%) e áreas não-inflamadas (46%); Grupo C: granulomas com leveduras (32%) e áreas não-inflamadas (26%); Grupo D: granulomas com leveduras (12%) e áreas não-inflamadas (55%). Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas nos grupos tratados com P10. Lâminas coradas por Gomori. Aumento de 25x.

4.15 Análise da eficácia da imunização com P10 em animais apresentando anergia induzida por fosfato de dexametasona

Neste experimento, avaliamos os efeitos da imunização do P10 nos camundongos Balb/c, induzidos à imunossupressão. Os animais foram infectados e, após 15 dias, imunizados com 3 e 4 doses de P10, onde avaliamos o grau de

infecção através das unidades formadoras de colônia, recuperadas dos órgãos (pulmão baço e fígado).

4.15.1 Unidades formadoras de colônias dos camundongos Balb/c anérgicos, infectados e imunizados com Peptídeo 10 (P10)

Os animais apresentaram diminuição significativa das UFCs em seus pulmões, quando comparados com os pulmões do grupo-controle. Os animais anérgicos infectados e imunizados com P10 também apresentaram uma menor disseminação da doença para outros órgãos, como o baço e o fígado. Os resultados também mostram que, com 3 ou 4 doses de P10, as respostas são semelhantes. Os resultados estão mostrados na figura 20.

Figura 20: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c anérgicos, infectados intratraquealmente e imunizados com P10, e sacrificados após 45 de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-imunizados (controle), * $p < 0,05$: diferença entre animais-controle e imunizados com o peptídeo.

4.15.2 Unidades formadoras de colônias dos camundongos Balb/c induzidos à anergia, infectados e tratados com itraconazol, imunizados, ou não, com peptídeo 10 (P10)

Ao avaliarmos os pulmões dos camundongos anérgicos Balb/c, verificamos que os que foram tratados com itraconazol e imunizados com P10 apresentaram diminuição significativa das UFCs, quando comparados com camundongos anérgicos, infectados e tratados com itraconazol e não imunizados com P10, figura 21.

Figura 21: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c anérgicos, infectados intratraquealmente e tratados (15 dias após i.t.) com Itraconazol, por 30 dias, associado, ou não, à imunização com P10, e sacrificados após 45 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle),* $p < 0,05$: diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

4.15.3 Unidades formadoras de colônias dos camundongos Balb/c induzidos à anergia, infectados e tratados com Sulmatetoxazol/trimetoprim, imunizados, ou não, com peptídeo 10 (P10)

Os animais anérgicos que foram infectados e tratados apenas com sulfametoxazol/trimetoprim apresentaram maior recuperação de células fúngicas viáveis em seus pulmões, comparados com os animais que foram tratados e imunizados com o peptídeo.

Figura 22: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c anérgicos, infectados intratraquealmente e tratados (15 dias após i.t.) com sulfametoxazol/trimetoprim (sulfa/trim.), por 30 dias, associado, ou não, à imunização com P10, e sacrificados após 45 dias de infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados/imunizados (controle), * $p < 0,05$: diferença entre animais tratados com a droga e animais tratados e imunizados com o peptídeo.

4.16 Utilização de diferentes adjuvantes associados à imunização com P10 no tratamento da paracoccidioidomicose experimental

Os camundongos Balb/c foram infectados com 3×10^5 leveduras de Pb18 e, após 30 dias, receberam 4 imunizações semanais contendo 20 μ g de peptídeo associado, ou não, a diferentes adjuvantes. Foram testados: Adjuvante completo de

Freund (controle), Alumen (hidróxido de alumínio) e MPLA (Monofosforilipídeo). Após 90 de infecção, os animais foram sacrificados e os órgãos foram analisados por UFC. De forma surpreendente, observamos que o peptídeo, sozinho, foi capaz de induzir proteção seguido pelo MPLA, alumen e, por último, o Adjuvante completo de Freund.

Figura 23: UFCs de pulmão (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos Balb/c infectados, intratraquealmente, (90 dias de infecção) com 3×10^5 leveduras e imunizados com P10 associado a diferentes adjuvantes, após 30 dias de infecção. (P10): imunização com opeptídeo, sem a presença de adjuvante, (alumen): P10+hidróxido de alumínio, (MPLA): P10+Monofosforilipídeo A, (ACF): P10+adjuvante completo de Freund. * $p < 0,05$: diferença entre animais infectados e imunizados com diferentes tipos de adjuvantes em relação ao controle, e infectados/não-imunizados.

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que o mecanismo de defesa do hospedeiro influencia nas manifestações e na severidade das infecções fúngicas, onde, na maioria das vezes, a forma de apresentação clínica da doença depende da resposta imune do hospedeiro. Uma resposta imune eficiente é dependente do equilíbrio entre a resposta imune-celular e humoral. Estratégias para aperfeiçoar formulações vacinais, transferência passiva de anticorpos, uso de adjuvantes, etc, requerem conhecimento básico sobre os mecanismos naturais de controle ou de progressão da doença.

Pacientes com paracoccidioidomicose (PCM) geralmente são submetidos à terapia antifúngica, após o diagnóstico da doença. Existem três grupos de drogas que demonstraram vários graus de eficiência no tratamento da PCM: sulfonamidas, anfotericina B e derivados azólicos.

Entre as sulfonamidas (RIBEIRO, 1940), o sulfametoxazol, associado ao trimetoprim, é a droga mais empregada no tratamento da PCM (RESTREPO & ARANGO, 1980; PETRI WA Jr., 2001). A anfotericina B é o tratamento de escolha para infecções fúngicas sistêmicas, com maior ameaça e comprometimento à saúde humana; foram desenvolvidas várias formulações lipídicas da droga, no intuito de melhorar a eficácia e de reduzir seus efeitos colaterais tóxicos agudos e crônicos (ADLER-MOORE & PROFFIT, 2002). Derivados azólicos como cetoconazol, itraconazol e fluconazol foram usados no tratamento da PCM, com bons resultados, segundo alguns autores (MARTINEZ et al., 1999; PASKO et al., 1990; PELLEGRINO et al., 2003; RESTREPO et al., 1980; RESTREPO et al., 1973; RESTREPO et al., 1983a; VILLA et al., 2000). Apesar do progresso na tecnologia e

das opções terapêuticas modernas, o tratamento de pacientes com PCM é normalmente arrastado por longos períodos; toxicidade das drogas e relatos de recidivas devido à resistência do fungo ou de drogas pobremente efetivas são habituais.

Protocolos experimentais que utilizam drogas antifúngicas têm sido usados por vários pesquisadores, com relatos de resultados semelhantes. McEwen et al. (1985) infectaram camundongos por via intranasal com isolado de fungo virulento e tratou-os com itraconazol, durante 4 semanas. Os animais foram examinados durante 2 meses. A infecção foi letal em 70-80% dos camundongos do grupo-controle; entretanto, todos os animais tratados com doses de 10-200 mg kg⁻¹ dia⁻¹ sobreviveram. O Itraconazol foi ineficaz na erradicação da doença pulmonar nos camundongos sobreviventes, porém efetivo no tratamento dos sítios de localização da doença. Em nossos protocolos, usando infecção intratraqueal em camundongos, administramos doses de 10mg kg⁻¹, durante 30 dias, a cada 24 h, e obtivemos resultados semelhantes, com diminuição da disseminação da doença para o baço e o fígado.

Ueda et al. (1987), usando um modelo murino de PCM disseminado crônico (isolado de Pb18; via intravenosa), administraram cetoconazol (200 mg kg⁻¹ em 0.2% agar), diariamente, por gavagem, realizando três protocolos diferentes. No primeiro experimento, o tratamento contínuo foi realizado na fase inicial da infecção (terceiro dia) e prolongado até a vigésima semana; foi o mais efetivo, levando à redução das lesões histopatológicas, induzindo resposta imune-humoral e celular contra o *P. brasiliensis* e promovendo a diminuição de células fúngicas nos pulmões dos animais. No segundo experimento, com tratamento no início da doença e sacrifício dos animais com 8 e 16 semanas, também ocorreu diminuição das lesões nos

pulmões. No terceiro experimento, onde o tratamento foi iniciado na quarta semana, com administração de cetoconazol, e estendido até a vigésima semana, ocorreu uma lenta diminuição das lesões e precária resposta imune contra o *P. brasiliensis*, quando comparado com o primeiro e o segundo experimentos (UEDA et al., 1987). Hoyos et al. (1984) também usaram um modelo murino de PCM pulmonar crônica disseminada e trataram seus animais com cetoconazol (100 mg kg^{-1} em 0.3% agar), administrando-o duas vezes por dia (gavage), durante 1 ou 2 meses. O tratamento levou à diminuição das células fúngicas de *P. brasiliensis* do baço dos camundongos, o que não ocorreu quando analisados os pulmões desses animais, pois somente 60% de todos os animais tratados apresentaram diminuição de células do *P. brasiliensis* (Hoyos et al., 1984). Em nossos protocolos, administramos 8 mg kg^{-1} de cetoconazol por via intraperitoneal, a cada 24 h, durante 30 dias, e obtivemos resultados semelhantes, com 30, 60, 90 e 120 dias de infecção.

Resultados encorajadores com fluconazol e anfotericina B também já foram relatados. Martinez et al (1999) estudaram a eficácia do fluconazol e da anfotericina B, comparativamente, em animais inoculados por via intraperitoneal com *P. brasiliensis*. As drogas foram administradas após a primeira semana de infecção, 3 vezes por semana, durante 4 semanas. O fluconazol administrado i.p. na dosagem de 14 mg kg^{-1} foi mais efetivo ($P < 0.001$) que a anfotericina B, com doses de 2 mg kg^{-1} , reduzindo as UFCs dos pulmões e do baço dos animais. Quando administrado i.v. na dosagem de 3 mg kg^{-1} , o fluconazol foi tão efetivo quanto a anfotericina B, administrada à concentração de 0.8 mg kg^{-1} , reduzindo a massa fúngica pulmonar. Em nossos experimentos, tratamos camundongos i.p. com 10 mg kg^{-1} de fluconazol diariamente e, considerando-se que a anfotericina B foi administrada na dosagem de

1.5 mg/kg, a cada 48 horas, a droga, em nossos protocolos, foi mais efetiva, mas, em geral, obtivemos resultados semelhantes.

A interação sinérgica entre trimetoprim e sulfametoxazol contra *P. brasiliensis* tem sido estudada (STEVENS & VO, 1982). Recentemente, Scavone e Burguer (2004) estudaram a suscetibilidade de camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com sulfametoxazol/trimetoprim. A terapia com 30 ou 150 mg kg⁻¹ dia⁻¹ começou 24 h após a infecção, reduzindo o número de fungos viáveis no baço e nos pulmões, mas não no fígado, onde obtiveram o controle parcial do processo infeccioso. No tratamento com 150 mg kg⁻¹ dia⁻¹, em tempos diferentes após a infecção, não encontraram reações de HTT positiva, mas obtiveram um controle mais efetivo da doença quando a terapia foi iniciada com 15 dias de infecção, resultados que foram identificados pela UFCs (SCAVONE & BURGER). Em nosso modelo, os camundongos, tratados por via intraperitonal, com sulfametoxazol/trimetoprim, na dosagem de 15/3 mg kg⁻¹ dia⁻¹, mostraram que a droga pôde reduzir as UFCs dos pulmões desses animais durante o tratamento, mas quando este foi suspenso, ocorreu recidiva da infecção.

O uso de peptídeos como vacinas terapêuticas no tratamento de infecções fúngicas e, recentemente, em câncer (KNUTSON & DISIS, 2005; SLINGLUFF et al., 2004), poderá ser uma alternativa de adjuvante, capaz de reduzir a toxicidade de drogas convencionais e de amenizar, consideravelmente, o tempo de tratamento, prevenindo recidivas da doença e, até mesmo, revertendo estados anérgicos.

Várias moléculas imunogênicas têm sido identificadas em diversos patógenos fúngicos. Em *Coccidioides immitis*, a molécula SCWF (Soluble Cell Wall Fraction) é imunoreativa com células T de camundongos que foram expostos ao fungo (KIRKLAND et al., 1985). Outros grupos de pesquisadores testaram a

imunogenicidade de uma molécula denominada SOW (Spherule Outer Wall), onde camundongos BALB/c foram imunizados com a partícula SOW e desafiados por via intraperitoneal com artroconídeos de *C. immitis*. Os pulmões dos camundongos imunizados apresentaram redução nas unidades formadoras de colônias, comparados com os animais-controle apenas infectados (THOMAS et al., 1997). A molécula C-ASWS (Alkali-soluble, Water-soluble Antigen), de micélio de *C. immitis*, tem sido usada com sucesso na vacinação de camundongos. A administração de 1 mg do antígeno com adjuvante completo de Freund foi protetor em camundongos DBA/2j (KIRKLAND et al., 1991).

Para o fungo *Histoplasma capsulatum* foram identificados um extrato da parede celular e membrana celular (CW/M) do fungo e um complexo de proteína ribossomal, como agentes imunógenos (GARCIA et al., 1971; TEWARI et al., 1978). A proteína CW/M estimulou a resposta imune-celular em camundongos expostos ao *H. capsulatum* e, em adição à imunização com 160 µg da proteína ribossomal, conferiu proteção contra a infecção intravenosa do fungo em três linhagens de camundongos: BALB/c, C57BL/6 e CBA/J.

O principal antígeno de superfície do fungo *Pneumocystis carinii* é a glicoproteína MSG, ou glicoproteína A, que é um antígeno imunodominante reconhecido pelo soro de pacientes e de animais que foram expostos ao fungo. A injeção da glicoproteína MSG em ratos que receberam corticosteróides promoveu redução do fungo *P. carinni* nesses animais, quando comparados com os controles (THEUS et al., 1995).

Wutrich et al. (1998) observaram que o antígeno WI-1 (BAD1), de *Blastomyces dermatitidis*, quando administrado em camundongos, na presença de adjuvante completo de Freund, pela via subcutânea, gerou uma resposta imune-celular e

humoral. A resposta humoral era caracterizada pela produção de IgG1>IgG2b>IgG2a>IgG3, indicando uma ativação mista de células T do tipo Th1 e Th2. Parece que a produção de anticorpos, entretanto, não está envolvida na proteção. A imunização com BAD-1 aumentou a sobrevivência de animais infectados intranasalmente, possivelmente pela ativação da resposta imune-celular.

A gp43 é o antígeno mais estudado de *Paracoccidioides brasiliensis*, até o presente momento (revisão em TRAVASSOS et al., 2003). Além de produzir uma resposta imune-humoral, a gp43 contém epítomos que suscitam uma resposta imune-celular de hipersensibilidade tardia, originalmente observada através de testes de intradermorreação em pacientes com PCM ou em cobaias e camundongos inoculados, experimentalmente, com *P. brasiliensis* (RODRIGUES et al 1994; SARAIVA et al., 1996).

A gp43 contém uma sequência peptídica de 15-mer, denominado P10, com capacidade de estimular células T de humanos e de camundongos. As propriedades imunoprotetoras do P10 foram bem determinadas em modelos murinos de PCM. A imunização de P10 emulsificado em adjuvante completo de Freund levou à proteção de camundongos que foram infectados por via intratraqueal, com células leveduriformes de isolado virulento do *P. brasiliensis*. A progressão da doença foi avaliada através das UFCs e das análises histológicas. O efeito protetor do P10 está relacionado, indiscutivelmente, à indução de resposta imune do tipo Th1 IFN- γ -dependente (TABORDA et al., 1988).

Com a intenção de definir o papel do P10 como um adjuvante imunológico no tratamento da PCM associado às drogas, animais infectados foram analisados em dois protocolos, com tratamentos realizados em estágios iniciais e tardios da doença. Nos dois procedimentos de quimioterapia, observamos melhoras

significativas da PCM experimental, quando os camundongos infectados pela via intratraqueal foram tratados com antifúngicos e imunizados com P10. Em todos os casos, o tratamento combinado da droga com o peptídeo conferiu máxima proteção, com redução significativa das UFCs dos órgãos analisados, preservação da estrutura alveolar pulmonar e prevenção da disseminação do fungo. O sulfametoxazol, administrado sozinho ou associado com trimetoprim, foi capaz de controlar a doença apenas durante o tratamento medicamentoso, porém, ao interrompermos a aplicação da droga, foi observada uma reativação do foco endógeno da doença com aumento da colonização do fungo nos pulmões dos animais; entretanto, os camundongos que foram imunizados com P10 conseguiram controlar a doença, mesmo após a descontinuidade dos tratamentos.

Possivelmente devido à destruição fúngica aumentada, tratamentos individuais com as drogas favoreceram uma resposta do tipo Th-2, rica em IL-4 e em IL-10. Isso foi, particularmente, notado com os derivados sulfonamidas, que geralmente não estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias. O tratamento combinado da droga e vacinação com o P10 estimulou uma resposta imune mista, com predomínio de células T CD4⁺ do tipo Th-1, com produção de IL-12 e de IFN- γ . A proteção obtida com a vacinação pelo P10 foi comprovada pelos exames histopatológicos.

Ao contrário de algumas infecções fúngicas, como a histoplasmose disseminada e a candidíase, a PCM não está relacionada a doenças de base como Câncer e AIDS, mas sabemos que, na maioria dos casos das formas agudas e subagudas da paracoccidioidomicose (formas mais agressivas da doença), a imunidade humoral específica é preservada com os pacientes apresentando altos títulos de anticorpos, acompanhados por depressão severa da imunidade celular

(DEL NEGRO et al., 1994). Na tentativa de reproduzir a PCM experimental na sua forma aguda ou subaguda, camundongos Balb/c foram induzidos à imunossupressão com doses diárias de fosfato de dexametasona, onde, a partir do vigésimo dia, observamos que os animais não apresentavam hipersensibilidade do tipo tardia frente ao antígeno bruto injetado no coxim plantar (dados não mostrados). Verificamos que os animais anérgicos infectados com o isolado Pb18 e imunizados somente com P10 apresentavam redução significativa da carga fúngica nos pulmões e menor disseminação da doença, quando comparados com os animais-controle, que não apresentaram melhoras. Nos animais que foram tratados com as drogas sulfametoxazol/trimetoprim e itraconazol, associadas ao P10, as melhoras foram mais evidentes, e observamos que os camundongos voltaram a se alimentar normalmente. Avaliando esses comportamentos dos animais e analisando as unidades formadoras de colônias, constatamos que o P10 foi capaz de diminuir o avanço da doença para outros órgãos. Além disso, detectamos aumento nos níveis de citocinas, como IFN- γ e IL-12, nos pulmões (dados não mostrados), indicando uma restauração da imunidade celular desses animais.

Ainda que de maneira discreta, procuramos observar a resposta humoral no soro dos camundongos BALB/c infectados com Pb 18 e tratados com drogas antifúngicas, isoladamente, ou associado à imunização com o P10 (somente do protocolo 1). Os anticorpos, definitivamente, desempenham um papel importante no controle das infecções fúngicas, porém, na PCM, essa função ainda não é compreendida. Estudos prévios, realizados em nosso laboratório, demonstraram que existem anticorpos monoclonais contra a gp43 que podem reduzir, ou não, a carga fúngica dos pulmões de camundongos infectados (Buissa, 2006).

No modelo experimental, utilizando camundongos relativamente mais suscetíveis ou resistentes ao *P. brasiliensis*, Calich et al., (1994) correlacionaram a resposta de anticorpos ao *P. brasiliensis* (principalmente IgG1, IgG2b e IgA) e a ativação policlonal de células B, com infecção progressiva em camundongos suscetíveis (B10.A). Em contraste, camundongos resistentes (A/Sn), que apresentavam uma sobrevida maior, desenvolviam potente HTT no período inicial da infecção e produziam baixos títulos de anticorpos, sem evidência de ativação policlonal. Esses resultados foram interpretados como sendo mediados por respostas imune-celulares antagônicas, a primeira (não-protetora) envolvendo linfócitos T CD4⁺, subpopulação Th2, e citocinas associadas (IL-5, IL-4 e IL-10) e a segunda (protetora) envolvendo células T CD4⁺, subpopulação Th1, que produzem IL-2 e IFN- γ e ativam macrófagos (Calich et al., 1994).

Taborda et al. (1998) indicaram que animais infectados com Pb18 apresentavam discreto título de anticorpos contra a gp43, após um mês de infecção e substancial aumento no título após 3.5 meses. O padrão de resposta de anticorpos era compatível com a ativação mista de células T do tipo Th-1 e Th-2. Nos animais previamente imunizados com P10 e infectados por 3.5 meses, observou-se baixo título de anticorpos contra gp43 e o principal isotipo identificado foi IgG1. Em nosso trabalho atual, o protocolo foi modificado e as imunizações com P10 ocorreram 48 horas após a infecção intratraqueal. A análise do título de anticorpos e a identificação dos isotipos foram realizadas após 30 e 90 dias de infecção. Nossos dados indicaram uma ativação mista em todos os grupos estudados; contudo, foi observada uma discreta diminuição no título de anticorpos dos animais imunizados com P10. Essa resposta, entretanto, não é acompanhada de anergia em camundongos Balb/c e não interferiu no efeito protetor do P10.

Os resultados do presente trabalho reforçam a conclusão de que o P10 protege contra a infecção experimental e abre perspectivas para o estudo em humanos. Como observado em nossos protocolos, as imunizações foram, entretanto, realizadas na presença de adjuvante completo de Freund, que não é aceito para humanos, devido à gravidade das reações adversas. Na tentativa de transportar o modelo experimental padronizado para outros adjuvantes aceitos na imunização de humanos, repetimos alguns ensaios de proteção, onde o P10 foi emulsificado com alumen (hidróxido de alumínio), MPLA (Monofosforilípídeo A), adjuvante completo de Freund (controle) e somente P10 (sem adjuvante).

Para este experimento, foi utilizado o “protocolo 2”, onde os animais só receberam a primeira imunização 30 dias após a infecção intratraqueal e foram sacrificados com 90 dias. Os resultados iniciais indicaram que, entre os adjuvantes testados, a melhor imunização foi obtida com MPLA, seguido pelo alumen e, por último, pelo adjuvante completo de Freund. De forma surpreendente, a imunização com P10 sozinho, sem a presença de adjuvantes, obteve as melhores reduções de UFC. Semelhante resultado de imunização com peptídeo, sem a presença de adjuvante, foi previamente observado por Taborda ET AL. (2004); entretanto, o P10 era apresentado na forma de MAP (multiple antigen peptide). Animais imunizados com MAP10, na ausência de adjuvantes, reduziram, significativamente, a carga fúngica dos pulmões (Taborda et al., 2004).

Esses resultados reforçam a indicação do P10 como o principal candidato vacinal para ser testado na paracoccidiodomicose humana. A eficácia da imunização do P10, associado a outros adjuvantes, ou mesmo sozinho, abre novas perspectivas. Ainda existem alguns pontos que deverão ser esclarecidos como, por exemplo, geração de células de memória durante o processo de imunização e,

ainda, a ativação de linfócitos T regulatórios que estão sendo investigados, neste momento, por outros componentes de nossa equipe.

6 CONCLUSÕES

1 - Observamos que a utilização do P10, associado às drogas antifúngicas, no tratamento da PCM experimental, apresentou ação aditiva, levando à redução da carga fúngica dos animais infectados nos dois protocolos utilizados.

2 – A imunização com P10 foi capaz de impedir a reativação da doença, após a suspensão do tratamento com derivados sulfonamídicos.

3 - O P10, associado aos antifúngicos, reduziu ou impediu a disseminação do fungo para outros órgãos como o baço e o fígado, na maioria dos protocolos utilizados.

4 - A imunização com P10 favoreceu a produção de citocinas do tipo Th-1, com produção de IFN- γ e IL-12.

5 – O P10 foi capaz de reverter o quadro anérgico induzido pela administração de fosfato de dexametasona em camundongos infectados com Pb18.

6 – Entre os adjuvantes testados, o MPLA apresentou o melhor resultado, seguido pelo alumen e pelo adjuvante completo de Freund.

7 – A imunização com P10, sem a emulsificação de adjuvantes, conduziu à uma resposta protetora com redução significativa de UFC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERNATHY, R. S. Treatment of systemic mycoses. *Medicine*, v.52, p.385-394, 1973.
- ADLER-MOORE, J.; and PROFFITT T. Ambisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J Antimicrob Chemother.*, v.49, p.121-30, 2002.
- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.*, v.61, p.2952-2959, 1993.
- ALBORNOS, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia*. v.9, p.248-53, 1971.
- ALLEN, J. E. and Maizels, R. M. *Immunol. Today*, v.18, p.387-392, 1997.
- ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. *An. Fac. Med. São Paulo*, v.5, p.125-141, 1930.
- ALMEIDA, I. C.; NEVILLE, D. C. A.; MEHLERT, A.; TREUMANN, A.; FERGUSON, M. A. J.; PREVIATO, J. O.; TRAVASSOS, L. R. Structure of the N-linked oligosaccharides of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glycobiology*, v.6, p.507-515, 1996.
- ALMEIDA, S. R.; MORAES, J. Z.; CAMARGO, Z. P.; GESZTESI, J. L.; MARIANO & LOPESJ. D. Pattern of immune response to Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. *Cell. Immunol.*, v.190, p.68-76, 1998.
- ANSORGE, W. Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, v.11, p. 13-20, 1985.
- ARANGO, M.; YARZABAL, L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, v.79, p.15-23, 1982.
- ARRUDA, C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S. S.; NASCIMENTO, F. R.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. *Clin. Immunol.*, v.103, p.185-195, 2002.

ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; PINA, A.; KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A.; FRANCO, M. F.; KELLER, A. C.; CALICH, V. L. Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infect. Immun.**, v.72, p.3932-3940, 2004.

BAIDA H., BISELLI P. J., JUVENALE M., DEL NEGRO G. M., MENDES-GIANNINI M. J., DUARTE A. J. AND BENARD G. Differential antibody isotype expression to the major Paracoccidioides brasiliensis antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v.1, p.273-278, 1999.

BARBOSA, M. S.; BAO, S. N.; ANDREOTTI, P. F.; De FARIA, F. P.; FELIPE, M. S.; Dos SANTOS FEITOSA, L.; MNEDES-GIANNINI, M. J.; SOARES, C. M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infection and Immunity** v. 74 (1): p. 382-389, 2006.

BARBOSA, W.; VASCONCELOS, W. M. P. Ação da sulfametoxazol associada ao trimetopim na terapêutica da blastomicose sul-americana. **Rev Pat. Trop.**, v.2, p. 329-339, 1973.

BARRAVIERA, B.; MENDES, R. P.; MACHADO, J. M. et al.: Evaluation of treatment of paracoccidioidomycosis. Combination of sulfadiazine and trimethoprim. Preliminary report. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.31 (1), p.53-55, 1989.

BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D. S.; VAN DER MEIDE, P. H.; SLAYTER, M. V.; NACY, C. A. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v.143, p.266-274, 1989.

BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M. J.; JUVENALE, M.; MIRANDA, E. T.; DUARTE, A. J. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two Paracoccidioides brasiliensis glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J. Infect. Dis.**, v.175, p.263-7, 1997.

BENNET, J. E. Antifungal agents. In: MANDELL, BENNET, J. E.; DOLIN, R. Principles and practice of infectious diseases. 4th Ed. New York: **Churchill Livingstone**, cap.31, v.1, p.401-410, 1995.

BENNET, J. E. Fármacos antimicrobianos. In: HANDEMAN, LIMBERD, L. E.; MOLLINORF, B. P.; RUDSSON, R. W. GOODMAN, L. S. *Goodman and Gilman* – as bases farmacológicas da terapêutica. 9th ed. Rio de Janeiro: **Guanabara – Koogan** cap. 49, p.864-875, 1996.

BERNARD, G.; DUARTE, A. J. S. Paracoccidioidomycosis: A model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection on the natural history of the endemic tropical diseases. **Clin. Inf. Dis.** V.31, p. 1032-1039, 2000.

BIAGIONI, L.; SOUZA, M. J.; CHAMMA, L. G.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; MOTA, N. G.; FRANCO, M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.78, p.617-621, 1984.

BITTENCOURT, A. I.; FREIRE-DE-ANDRADE, J. A. and FILHO, S. P. C. Paracoccidioidomycosis in a four-years-old boy. **Micophatologia**, v.93, p.55-59, 1986.

BODY, G. P. Tropical and systemic antifungal agents. **Med. Clin. Of North. America**. Houston, v.72, n3, p.637-659, 1988.

BORELLI, D. Some ecological aspects of paracoccidioidomycosis. In: Pan American Health Organization. **Scientific Publication**, v.254, p.59-64, 1972

BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; XINHUA SHU and WALMSLEY, R. the pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Pathogens, Review**, v.10 (2), p.80-87, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-54, 1976.

BRAJTBURG, J.; KOBAYASHI, D.; MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G. S. Antifungal action of anfotericin B in combination with other polyene or imidazole antibiotics. **J. Infec. Dis. Chicago**, v.146, p.138-146, 1982.

BRAJTBURG, J.; POWDERKY, W. G.; KOBAYASHI, G.; MEDOFF, G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. **Antimicrob. Agents. Chem.**, Washington, v.34, p.183-188, 1990.

BRETSCHER, P. A. Immunol. **Cell Biol.**, v.70, p.343-351, 1992.

BRUMMER, E.; E. CASTANEDA, A. RESTREPO. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.6, p.89-117, 1993.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; and. STEVENS D. A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN- γ for enhanced killing of *P. brasiliensis* or *B. dermatitidis*. **J. Immunol.**, v.140, p.2786-2787, 1988.

BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; HANSON, L. H.; STEVENS, D. A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of in vitro passage and storage **Mycopathologia (Den Haag)**, v.109, p.13-17, 1990.

BUISSA-FILHO, R., MARQUES, A. F., DA SILVA, M. B., PUCCIA, R. TABORDA, C. P. Effect of monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *P. brasiliensis* on the reduction of lung infection. In *IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis* - Aguas de Lindóia, São Paulo. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, V. 47, P. 41 2005.

CALICH V. L. G.; SINGER-VERMES L. M.; RUSSO M. et al. Immunogenetics in paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO A. et al. eds. *Paracoccidioidomycosis*. **Boca Raton: CRC Press** p.151-173 1994.

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

CALICH, V. L.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz J Med. Biol. Res.** v.31(5), p.615-23, 1998.

CAMARGO Z. P.; UNTERKIRCHER C.; CAMPOY S. P. and TRAVASSOS L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J. Clin. Microbiol.** v.26, p.2147-2151, 1988.

CAMARGO, Z. P.; GESZTESI, J. L.; SARAIVA, E. C.; TABORDA, C. P.; VICENTIN, A. P. and LOPES, J. D. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol.**, v.32, p.2377-2381, 1994.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v.63, p.1777-1783, 1995.

CARLSON, M. A.; CONDON R. E. Nephrotoxicity of amphotericin B. **J. Am. Coll. Surg.**, V.179, p.361-381, 1994.

CARVALHO, K. C.; GANIKO, BATISTA, W. L.; MORAES, F. V.; MARQUES, E. R.; GOLDMAN G. H.; FRANCO M. F. and PUCCIA R. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing know pbGP43 genotype. **Microb. Infect.**, v.7, p.55-65 2005.

CASADEVALL, A. Antibody immunity and invasive fungal infections. **Infect. Immun.**, v.63, p.4211-4218, 1995.

CASADEVALL, A.; DeSHAL, M.; FAN, M.; DROMER, F.; KOZELT. R.; PIROFSKI, L. A. Molecular and idiotypic analysis of antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. **Infect. Immune**. V.68, p.3864-3872, 1994.

CASADEVALL, A.; MUKHERJEE, J.; DEVI, R.; SCHNEERSON, J; ROBBINS J. B. and SCHARFF M. D. Antibodies elicited by a *Cryptococcus neoformans*-tetanus toxoid conjugate vaccine have the same specificity as those elicited in infection. **J. Infect. Dis.**, v.1665, p.1086-1093, 1992.

CASTAÑEDA, E.; BRUMMER E.; PERLMAN A. M.; MACEWEN J. G.; STEVENS D. A. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.26 (6), p.351-358, 1988.

CASTAÑEDA, E.; BRUMMER, E.; PAPPAGIANIS, E. & STEVENS, D. A. Impairment of cellular but not humoral immune responses in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. **Infect. Immun.**, v.56, p.1771-1777, 1988.

CHEQUER-BOU-HABIB, D.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; GALVÃO-CASTRO, B. The possible role of circulating immune complexes in the deficiency of cell-mediated immunity in paracoccidioidomycosis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.22, p.205-12, 1989.

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

CLEMONS, K. V.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Gen. Microbiol.**, v.135, p.1607-17, 1989.

CORTI, M.; VILLAFANE M. F.; NEGRONI, R.; PALMIERI, O. Disseminated paracoccidioidomycosis with pleuripleuritis in an AIDS patient. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.46, p.47-50, 2004.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROSA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis Mortality in Brazil (1980-1985). **Cad. Saúde Pública**, v.18 (5), p.1441-1454, 2002.

CUCE, L. C.; WROCLAWSKI, E. L.; SAMPAIO S. A.: Treatment of paracoccidioidomycosis with ketoconazole. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v.23 (2), p.82-95, 1981.

Da Silva, C. J.

DA SILVA, M. B.; MARQUES, A. F.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A., TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes Infect.**, v.8(1), p.197-205, 2006.

DE CAMPOS, E. P.; SARTORI, J. C.; HECTCH, M. et al.: Clinical and serologic features of 47 patients with paracoccidioidomycosis by amphotericin B. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v.26(4), p.212-217, 1984.

DE CAMPOS, E. P.; SARTORI, J. C.; HETCH, M. et al.: Clinical and sorologic features of 47 patients with paracoccidioidomycosis treated by amphotericin B. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.26 (4), p.212-217, 1984.

DE MURI, G. P.; HOSTETTER, M. Resistance to antifungal agents. **Antim. Rest. Ped.**, v.42, n.3, 1995.

DEL NEGRO G.; Tratamento. Controle de cura. Profilaxia. In: Paracoccidioidomicose. Blastomicose sul-americana. DEL NEGRO G.; LACAZ C. S. and FIORILLO, A. M. (Eds.), **Sarvier, Edusp, São Paulo, Brazil.** p.271-283, 1982.

DEL NEGRO G: Peculiaridades na terapêutica das micoses sistêmicas. **Rev. Ass. Med. Brasil** v.31 (3/4), p.47-51, 1985.

DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; ZAMITH, V. A. and SIQUEIRA, A. M. General clinical aspects: Polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in childhood. In: *Paracoccidioidomycosis*; FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A. DEL NEGRO G. Paracoccidioidomycosis. **CRC Press, Boca Raton, FL**, p. 225-232, 1994.

DIXON, D. M.; CASADEVALL A.; KLEIN, B.; MENDONÇA, L., TRAVASSOS, L. R. and DEEP, JR. G. S. Development of vaccines and their use in the prevention of fungal infections. **Med. Mycol.**, v.36, p.57-67, 1998.

DOLLERY, C. ed. Therapeutic Drugs-anfotericin B. London: Potter, Churchill Livengstone. p.113-116, 1991a.

DOLLERY, C. ed. Therapeutic-drugs-fluconazole. London: Churchill linvegstone-supll. 1, p.90-94, 1992a.

DOLLERY, C.; ed. Therapeutic – Drugs-itraconazol. London: **Churchil Livengstone**, suppl.1, p.114-119, 1992b.

DROMER, F.; CHARREIRE, J.; CONTREPOIS, A.; CARBON, C.; YENI, P. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody. **Infect. Immun.**, v.55, p.749-52, 1987.

EMANUEL, A., MILLINGTON, A. and ROCHA, L. Paracoccidioidomycose. Análise de uma casuística hospitalar observada num período de 11 anos no Distrito Federal. **An. Bras. Dermatol.**, v.58, p.257-260, 1983.

ESPINEL-INGROFF, A.; KERKERING, T. M.; GOLDSON, P. R.; and SHADOMY, S. Comparison study of broth macrodilution antifungal susceptibility tests. **F. Clin. Microbiol.**, v.29, p.1089-1094, 1991.

ESPINEL-INGROFF, A.; KERKERING, T.M.; NEGRONI, R.; RESTREPO, A. 1992. Susceptibilities of the yeast and mycelial phase of *Paracoccidioides brasiliensis* to five antifungal agents. **Rev. Argent. Micol.**, v.15, p.30 (abstract).

FARIAS, M. R.; WERNERE, J.; MARQUES, S. A.; MARQUES, M. E.; FRANCO, M.; RIBEIRO, G.; CUSTÓDIO, C. C.; CONDAS, L. A. Z.; BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, E. Canine paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. **Rev. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**, v. 47(14), p. 64, 2005.

FAVA-NETTO, C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (Blastomicose sul-americana). *Rev Inst Adolfo Lutz*, v.21, p.99-194, 1961.

FAVA-NETTO, C.; CASTRO, R. M.; GONÇALVES, A. P. Ocorrência familiar de blastomicose sul-americana. A propósito 14 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.7, p.332-6, 1965.

FORJAZ, M. H. H. Estudo de epidemiologia da paracoccidioidomycose. Rastreamento de áreas endêmicas e de "reservareas" no Brasil, através do traçado do perfil migratório-residencial-profissional, de pacientes diagnosticados em São Paulo. **Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.**

FRANCO, M. F.; MONTENEGRO, M. R. G. Anatomia patológica. In: PCM: blastomicose sul-americana. Eds. DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; FIORELLO A. M. São Paulo, **Sarvier**, p.97-117, 1982.

FRANCO, M. Pathology. In: **Franco M. et al.** Paracoccidioidomycosis, **CRC Press** p.142-146, 1994.

Franco, M.. Host parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.25, p.5-18, 1986.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; DA SILVA LACAZ, C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med. Mycol.**, v. 38(3), p.185-191, 2000.

FRANCO, M.; MENDES, R. P.; MOSCARDI-BACCHI, M. et al. Paracoccidioidomycosis. Baillière's. **Clin. Trop. Méd. Commun. Dis.**, v.4, p.185-220, 1989.

GARCIA, J. P. and HOWERD, D. H. Characterization of antigens from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.**, v.4, p. 116-125, 1971.

GARCIA, N. M.; DEL NEGRO, G. M.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T.; DE ASSIS, C. M.; LACAZ, C. S. Paracoccidioidomycosis: a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v. 35(3), p.227-235, 1993.

GEZUELE, E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. de heces de um pinguino de la Antártida. In: **IV Internacional Symposium on Paracoccidioidomycosis**. Caracas, Venezuela, Abstract B-2, 1989.

GIRMENIA, C.; MARTINO, P.; DE BERNARDIS, F. et al. Rising incidence of candida parapsilosis fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. **Clin. Inf. Dis.**, v.23, p.506-514, 1996.

GOLD, W., Amphotericin B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. *In vitro* studies. **Antibiotics Annual** -1955 -1956. **New York Medical Encyclopedia**, p.579-586, 1956.

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

GOLDANI, L. Z.; SUGAR A. M. Paracoccidioidomycosis and AIDS. An Overview. **Clin. Infect. Dis.**, V.21, p.1275-1281, 1995.

GOMEZ, A. M.; RHODES, J. C. and. DEEP, JR. G. S. Antigenicity and immunogenicity of an extract from the cell wall and cell membrane of *Histoplasma capsulatum* yeast cells. **Infect. Immun.**, V.59, p.330-336, 1991.

GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D.; DIEZ, S.; YOUNGCHIM, S.; AISEN, P.; CANO, L. E.; RESTREPO, A.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. **Infect. Immun.**, v.69, p.5760-5767, 2001.

GONZALEZ, A.; DE GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect. Immun.**, v.68, p.2546-52, 2000.

GREER, DL.; and RESTREPO, A. La epidemiología de la paracoccidioidomicosis. **Bol Of. Sanit. Panam.**, v.83, p.428-445, 1977.

GROSSO, D. M.; ALMEIDA, S. R.; MARIANO, M. and LOPES, J. D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in

Paracoccidioides brasiliensis pathogenesis. **Infect Immun.**, v.71, p.6534-3542, 2003.

GUPTA, A. K.; SAUDER, D. N.; SHEAR, N. H. Antifungal agents: An overview. Part I. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.30, p.911-933, 1994a.

GUPTA, A. K.; SAUDER, D. N.; SHEAR, N. H. Antifungal agents: An overview. Part. 1. **J. Am. Acad. Dermatol.** v.30, p.677-698, 1994a.

HAMDAN, J. S.; RESENDE, MA.; FRANZOT, SP.; CISALPINO, E. O. Haematological alterations induced by biochemical fractions of *Paracoccidioides brasiliensis* in mice. **Mycoses**, v.88, n.1, p.111-117, 1992.

HAN, Y.; CUTLER, J. E. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. **Infect. Immun.**, v.63, p.2714-2719, 1995.

HANDAN, J. S.; and. RESENDE, M. A. Lipid composition and effect of amphotericin B on yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia.**, v.102, p.97-105, 1998.

HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T.; LACAZ, C. S.; PEREIRA, A. D.; and DEL NEGRO, G. Ação *in vitro* do itraconazol (R-51211) sobre *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*. **Ann. Brás. Dermatol.**, v.63, p.299-302, 1988.

HILL, H. Z. The function of melanin or six blind people examine an elephant. **Bioessays.**, v.14, p.49-56, 1992.

HOSTETLER, J. S.; BRUMMER, E.; COFFMAN, R. L.; STEVENS, D. A. Effect of anti-IL-4, interferon-gamma and an antifungal triazole (SCH 42427) in paracoccidioidomycosis: correlation of IgE levels with outcome. **Clin. Exp. Immunol.**, v.94, p.11-16, 1993.

HOYOS, G. L.; MCEWEN; J. G.; BRUMMER, E., E.; CASTANEDA, RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Chronic murine paracoccidioidomycosis: Effect of ketoconazole on clearance of *Paracoccidioides brasiliensis* and immune response. **Sabouraudia**, v.22, p.419-426, 1984.

IWAI, L. K.; YOSHIDA, M.; SYDNEY, J.; SHIKANAI-YATSUDA, M. A.; GOLDBERG, A. C.; JULIANO, M. A.; HAMMER, J.; JULIANO, L.; SETTE, A.; KALIL, J.; TRAVASSOS, L. R. and CUNHA NETO, E. In silico Prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 *paracoccidioides brasiliensis* frequently recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized individuals. **Mol. Med.**, v.9, p.209-219, 2003.

JACOBSON, E. S.; TINNELI, S. B. Antioxidant function of fungal melanin. **J. Bacteriol.**, v.175, p.7102-4, 1993.

JIANG, C.; MAGEE, D. M.; QUITUGUA, T. N.; and COX, R. A. Genetic vaccination against *coccidioides immitis*: Comparison of vaccine efficacy of recombinant antigen 2 and antigen 2 cDNA. **Infect. Immun.**, v.67, p.630-635, 1999.

JONHSON, W.; LANG, C. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in a squirrel monkey (*Samiri sciureus*). **Vet. Pathol.**, v. 14, p. 552-558, 1984.

KARP, C. L.; NEVA, F. A. Tropical infectious diseases in human immunodeficiency virus-infected patients. **Clin. Inf. Dis.** v.28, p.947-965, 1999.

KASHINO, S. S.; CALICH, V. L. G.; BURGER, E.; SINGER-VERMES, L. M. In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathologia (Den Haag)**, v.22, p.173-178, 1985.

KASHINO, S. S.; CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; ABRAHAMSOHN, P. A.; BURGER, E. Growth curves, morphologic and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia (Den Haag)**, v.99, p.119-128, 1987.

KIRKLAND, T. N.; and FIERER, J. Genetic control of resistance to *Coccidioides immitis*: a single gene that is expressed in spleen cells determines resistance. **J. Immunol.**, v.135, p.548-552, 1985.

KIRKLAND, T. N.; ZHU, S.; KRUSE, D.; HSU, L.; SESHAN, K. R.; COLE, G. T. *Coccidioides immitis* fractions which are antigenic for immune T lymphocytes. **Infect. Immun.**, v.59, p.3952-3961, 1991.

KNUTSON, K. L.; and Disis M. L. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.54, p.721-728.

LABUKI, K. & MONTENEGRO, M. R. Experimental paracoccidioidomycosis in the hamster: morphology, ultrastructure and correlation with of lesions with presence of specific antigens and serum level of antibodies. **Mycopathologia**, v.67, p.131-135, 1979.

LACAZ, C. S. Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. In: **Compêndio de micologia médica**, 6^a ed. São Paulo, **Sarvier**, pp.229-271, 1977.

LACAZ, C. S.; ULSON, C. M, and. SAMPAIO, S. A. P. Ação *in vitro* da anfotericina B sobre o *P. brasiliensis*. **Ver. Paul. De Med.**, v.54, p.357-360, 1959.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-5, 1970.

LAGUNA, F.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.; MARTINEZ-SUÁREZ, J. et al.: Patterns of fluconazol susceptibility in isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans*. **Clin. Inf. Dis.**, v.24, p.124-130, 1996.

LAVALLE, P.; SUCHILL, P.; DE OVANDO, F. Itraconazole for deep mycoses. Preliminary experience in Mexico. **Rev. Infect. Dis. Chicago**, v.9, suppl.1, p.64-70, 1987.

LIMA, M. A., SILVA-VERGARA, M. L., DEMACHKI, S., SANTOS, J. A. M. Paracoccidioidomicose em paciente com a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. Relato de necrópsia. **Rev. da Soc. Bras. Med. Trop.**, v.28, p.279-284, 1995.

LONDERO, A. T.; & RAMOS, C. D. Paracoccidioidomycosis: A clinical and mycologic study of forty-one cases observed in Santa Maria, RS, Brazil. **Amer. J. of Med.**, v.52, p.771-775 1972.

LOPES, C. F.; RESENDE, M. A.; ALVARENGA, R. J.; MOREIRA, Y. K. Associação de 5-fluocitosina e anfotericina B no tratamento da cromomicose. **Med. Cut. Ibero Lat. Am.**, v.7, n1/3, p.1-7, 1979.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localisada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hypo-blastomycoses americanas. **Brazil Méd.**, v. 22, p.141-144, 1908.

MACGINNIS, M. R.; PASARELL, L.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; COOPER, C. R., and RINALDI, M. G. *In vitro* evaluation antifungal of voriconazole against some clinically important fungi. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.41, p.1832-1834, 1997.

MACGINNIS, M.; R.; RINALDI, M. G. Antifungal drugs. Mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays activity in biologicals fluids, In Lorian V., Antibiotics in laboratory medicine, 3. ed Baltimore: **The Willians Wilkins Co.**, p.198-257, 1991.

MARCORIS, S. A. G.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S.; BOSCO, S. M. G.; HEBELER-BARBOSA, F.; SIMÕES, L. B.; THEODORO, R. C.; TRINCA, L. A.; BAGAGLI, E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v.101 (3), p.331-334, 2006.

MARQUES S. A., ROBLES, A. M., TORTORANO, A. M., TUCULET, M. A., NEGRONI, R., MENDES, R. P. Mycosis associated with AIDS in the Third world. **Medical mycology**, v.38, p.269-279, 2000.

MARQUES, A. F.; DA SILVA M. B.; JULIANO, M. A. P.; TRAVASSOS, L. R.; and TABORDA, C. P. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrob. Agents. And Chemother.**, v.50 (8), p.2814-2819, 2006.

MARQUES, S. A.; CONTERNO, L. O.; SGARBI, L. P.; VILLAGRA, A. M. P. C.; SAMBOGI, V. P. G.; BAGATIN, E., GONÇALVES, V. L. C. Paracoccidioidomycosis associated with acquired immunodeficiency syndrome. Report of seven cases. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.17, p.261-265, 1995.

MARQUES, S. A.; FRANCO, M. F.; MENDES, R. P.; SILVA, N. C. A.; BACCILI, C.; CURCELLI, G. D.; FERACINI, A. C. M.; OLIVEIRA, C. S.; TAGLIARINI, J. V.; & DILLON, N. L. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo – Brasil) **Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.25, p.87-92, 1983.

MARTINEZ, R.; MALTA M. H. B.; VERCEZE, A. V.; ARANTES, M. R. Comparative efficacy of fluconazole and amphotericin B in the parenteral treatment of experimental paracoccidioidomycosis in the rat. **Mycopathologia**. v.146, p.131-134, 1999.

MATTHEWS, R.; HODGETTS, S.; BURNIE, J. Preliminary assessment of a human recombinant antibody fragment to hsp90 in murine invasive candidiasis. **J. Infect. Dis.**, v.171, p.1668-71, 1995.

McEWAN, J. G. et al., Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med Vet. Mycol.**, v.25, p.165-175, 1987.

McEWEN, J. G.; PETERS, G. R.; BLASCHKE, T. F.; PERLMAN, A. M.; RESTREPO, A.; and STEVENS, D. A. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole in a murine model. **J. Trop. Med. And Hyg.**, v.88, p.295-299, 1985.

McGINNIS, M. R.; PASSAREL, L. In vitro testing of susceptibility of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazole and anfotericin B with consideration of philogeobectic implications. **J. Clin. Microbiol.**, Chicago, v.36, p.2353-2355, 1998.

MEDZHITOV, R.; and JANEWAY, JR. C. A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v.296, p.298-300, 2002.

MENDES, R. P.; NEGRONI, R.; ARECHAVALA, A. Treatment and control of cure. In: FRANCO, M.; Lacaz, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G., eds. Paracoccidioidomycosis. **Boca Raton: CRC Press**, p.373-392, 1994.

MENICHETTI, F.; FIORIO, M.; TOSTI, A. et al. High-dose fluconazole therapy for cryptococcal meningitis in patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, v.22, p.838-840, 1996.

MOK, P.W.; GREER, D. L. Cell-mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis. **Clin Exp. Immunol.**, v.28, p.89-98, 1977.

MORAES, C. B.; SCHAFFER, G. M. V. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. **Mycoses**, v.45, p.174-179, 2002.

MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J. Med. Microbiol.**, v.40, p.159-164, 1994.

MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M. Experimental paracoccidioidomycosis in the mouse. Histopathological and immunological findings after intravenous infection in the presence or absence of previous immunization. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.18, p.101-108, 1985.

MOTA N. G. S.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; PERAÇOLI, M. T. S.; AUDI, R. C.; MENDES, R. P.; MARCONDES, J.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. I.; FRANCO, M. E. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.79, p.765-772, 1985.

MUCHMORE, H. G.; MCKOWN, B. A.; MOHR, J. A. Effects of the steroid hormones on the proliferation of *Paracoccidioidomycosis brasiliensis*. **Biol. Oficina Sanit. Panam.**, v.77, p.55-70, 1974.

MUKHERJEE, J.; NUSSBAUM, G.; SCHARFF, M. D.; and CASADEVALL, A. Protective and nonprotective monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* originating from one B cell. **J. Exp. Med.**, v.181, p.405-409, 1995.

MUKHERJEE, J.; SCHARFF, M. D.; CASADEVALL, A. Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v.60, p.4534-41, 1992.

MURPHY JW, HIDORE MR, WONG SC. Direct interactions of human lymphocytes with the yeast-like organism, *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Invest.**, v.91, p.1553-66, 1993.

NAIF, R.; FERREIRA, L.; BARRAET, T.; NAIFF, M.; ARIAS, J. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcitus*) in the State of Para. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 28, p. 19-27, 1986.

NAIFF, R. D.; BARRETT, T. V.; NAIFF, M. F.; FERREIRA, L. C.; ARIAS, J. R. New records of *Histoplasma capsulatum* from wild animals in the Brazilian Amazon. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.38, p.273-7, 1996.

NARANJO, M. S.; TRUJILLO, M.; MUNERA, M. I. et al: Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.28 (1), p.67-76, 1990.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility testing of yeasts. Proposed Standard M27-A. Villanova, PA: **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, 1997.

NEGRONI, P. The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina. **Prensa Med. Argent.**, v.53, p.2381-2, 1966.

NEGRONI, R. Azole derivatives in the treatment of paracoccidioidomycosis. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.544, p.497-503, 1988.

NOBRE JUNIOR, V.; BRAGA, E.; RAYES, A.; SERUFO, J. C.; GODOY, P.; NUNES, N.; ANTUNES, C. M.; LAMBERTUCCI, Jr. Opportunistic infections in patients with AIDS admitted to an University hospital of the Southeast of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v.45, p. 69-74, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; VALADON, P.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* in murine infection. **Mol. Cell. Biol.**, v.19, p.745-50, 1999.

PASKO, M. T.; PISCITELLI, S. C.; and VAN SLOOTEN, A. D. Fluconazole: a new triazole antifungal agent. **Dicp.**, v.24, p.860-867, 1990.

PEDRO, R. J.; AOKI F. H.; BOCCATO, R. S. B. S.; BRANCHINI, M. L. M.; GONALVES JUNIOR, F. L.; PAPAORDANOU, P. M. O.; RAMOS, M. C. Paracoccidioidomycose e infecção pelo HIV da Imunodeficiência humana. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.31, p.119-125, 1989.

PELLEGRINO, A.; DE CAPRILES, C. H.; MAGALDI, S.; MONTES DE OCA, I.; RUIZ, M. E.; PEREZ, C.; and MATA-ESSAYAG, S. Case report: severe juvenile type paracoccidioidomycosis with hepatitis. **C. Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.68, p.301-303, 2003.

PERAÇOLI, M. T.; MOTA, N. G.; MONTENEGRO, M. R. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster. Morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. **Mycopathologia**, v.79, p.7-17, 1982.

PEREIRA, R. M.; TRESOLDI, A. T.; DA SILVA, M. T. et al. Fatal disseminated paracoccidioidomycosis in a two-year-old child. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v.46(3), p.127-131, 2004.

PETRI, W. A. Jr: Antimicrobial agents: Sulfonamides, trimethoprim-sulfamethoxazole, quinolones and agents in urinary tract agents. In: *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (10thed). Hardman Jg, Limbird L. E., Gilman A. G., (Eds.) **MacGraw-Hill, New York, USA**. v.44, p.1171-1188, 2001.

PFALLER, M. A.; RINALDI, M. G.; GALGIANI, J. N. et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.34, p.1648-1654, 1990.

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

POIRRIEZ, J. B.; FRANÇOIS, N.; FRUIT, J.; SENDID, B. G. S.; DEI-CAS, E. A case chromomycosis treated by a combination of cryotherapy, shing, oral 5-fluocytosine, and oral amphotericin B. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.63, p.61-63, 2000.

PRESTERL, E.; GRANINGER, W. New aspects in treatment of systemic mycoses. **Wien Klin Wochenschr**, v.21, p.740-750, 1998.

PUCCIA, R.; CARMONA, A. K.; GESZTESI, J. L.; JULIANO, L.; AND TRAVASSOS, L. R. Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. **Medical Mycology** v. 36 (5): p. 345-348, 1998.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A. J. and TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*. Identification of a specific antigen. **Infect Immun.**, v.53, p.193-203, 1986.

PUCCIA, R.; TAKAOKA, D. T.; TRAVASSOS, L. R. Purification of the 43 kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). **J. Med. Vet. Mycol.**, v.29, p.57-60, 1991.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R.; RODRIGUES, E. G.; CARMONA, A. K.; OLIVEIRA, M. C. F.; JULIANO, L. Purification of the specific exocellular antigen gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*. Immunological and proteolytic activities. **Molecular Biology of Pathogenic Fungi, a Laboratory Manual**. (B. Maresca and G.S. Kobayashi, (eds.) pp. 507-515, Telos Press, New York, 1994.

REBELLATO, C. L. K. Estudo de associação entre os antígenos HLA-A, B, C, DR e DQ e a paracoccidioidomicose infecção e a forma crônica da paracoccidioidomicose doença. Dissertação (Mestrado). **Universidade Federal do Paraná**. Curitiba, 1996.

RESTREPO F. M.; RESTREPO, M.; RESTREPO, A. Blood groups and HLA antigens in paracoccidioidomycosis. **Sabouraudia**, v.21 (1), p.35-35, 1983.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Saboraudia**, v.23, p.323-334, 1985.

RESTREPO, A.; and JIMÉMEZ, B. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **F. Clin. Microb.**, v.12, p.279-281, 1980.

RESTREPO, A.; and TABARES, M. A. *In vitro* susceptibility of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal agents. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** v.26, p.322-328, 1984.

RESTREPO, A.; ARANGO, M. D. In vitro susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to sulfonamides. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.18, p.190-194, 1980.

RESTREPO, A.; DE BEDOUT, C.; CANO, L. E.; ARANGO, M. D.; & BEDOYA, V. Recovery of *Paracoccidioides brasiliensis* from a partially calcified lymph node lesion by microaerophilic incubation of liquid media. **Saboraudia**, v.19, p.295-300, 1981.

RESTREPO, A.; GOMES I.; CANO, L. E.; ARANGO, M. D.; GUTIERREZ, F.; SANIN, A.; and ROBLEDO, M. A. Treatment of paracoccidioidomycosis with Ketoconazole: a three-year experience. **Am. J. Med.**, v.74, p.48-52, 1983.

RESTREPO, A.; GOMEZ I.; ROBLEDO, M. A. Efficacy of ketoconazole in patients with recurrent paracoccidioidomycosis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v.24 (3), p.173-179, 1982.

RESTREPO, A.; GREER D. L.; & VASCONCELLOS, M. Paracoccidioidomycosis: A review. **Review of Medical and Veterinary Mycology**, v.8, p.97-123, 1973.

RESTREPO, A.; McEWAN, J. G.; & CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v.39. p.233-241, 2001.

RESTREPO, A.; McEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v.39, p.233-241, 1993.

RESTREPO, A.; MONCADA, L. H. Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. **Appl. Microbiol.**, v.28, p.138-44, 1974.

RESTREPO, A.; ROBLEDO, M.; GUTERREZ, F.; SANCLEMENTE, M. B.; CASTANEDA, E.; & CALLE, G. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis). A study of 39 cases observed in Medellín, Colômbia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.19, p.68-76, 1970.

RESTREPO, A.; STEVENS, D. A.; GOMES, I. et al. Ketoconazole: a new drug for the treatment of Paracoccidioidomycosis. **Reviews of infectious Diseases**, v.2, p.633-642, 1980.

RESTREPO-MORENO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In paracoccidioidomycosis: 121-130. FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; & DEL NEGRO, G. (Ed.). London: **Boca Raton CRC Press**. 1994.

RIBEIRO, D. O. Nova terapêutica para blastomicose. **Public. Méd. (São Paulo)**, v.12, p.36-54, 1940.

RICHARDSON, M. D.; WARBOK, D. W. Fungal infection: diagnosis and management. **Oxford: Blakwell.**, p.17-42, 1993.

RODRIGUES, E. G.; and TRAVASSOS, L. R. Nature of the reactive epitopes in *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide antigen. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.32, p.77-81, 1994.

ROMANO, C. C.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE, A. J.; & BENARD, G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine.**, v.18, p.149-157, 2002.

SAG, M. S. DIMUKES, W. Azole antifungal agents: emphasis on new triazole. **Antimicrob. Agents Chemoter.** Washington, v.32, p.1-8, 1988.

SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G.; COVA, L. J. A morphological mutant of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. Isolation and wall characterization. **J. Gen. Microbiol.**, v.93, p. 209-218, 1976.

SAN-BLÁS, G.; CALCAGNOM, A. M.; and SAN-BLÁS, F. A preliminary study of in vitro antibiotic activity of saperconazole and other azoles on *Paracoccidioides brasiliensis*. **F. Med. Vet. Mycol.**, v.31, p.169-174, 1993.

SAN-BLÁS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.** v.40 (3), p.225-242, 2002.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. **A review. Mycopathologia.**, v. 62, p.77-86, 1977.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F.; ORDAZ, D.; CENTENO, S.; ALBORNOZ, M. C. Chemical changes in cell wall structure of five strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v.22(3), p.255-7, 1984.

SANFORD, J. E.; LUPAN, D. M.; SCHLAGETER, A. M.; KOZEL, T. R. Passive immunization against *Cryptococcus neoformans* with an isotype-switch family of monoclonal antibodies reactive with cryptococcal polysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 58, p.1919-1923, 1990.

SANO, A.; TANAKA, R.; YOKOYOMA, K. et al. Characteristics of 17 *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycoscience**, v.38, p.117-122, 1997.

SARAIVA, E. C. O.; ALTEMANI, A.; FRANCO, M. F.; UNTERKIRCHER, C. S.; and CAMARGO, Z. P. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used paracoccidioidin. **J. Méd. Vet. Mycol.**, v.34, p.155-161, 1996.

SCAVONE, R.; BURGER, E. Paracoccidioidomycosis: reduction in fungal load and abrogation of delayed-type hypersensitivity anergy in susceptible inbred mice submitted to therapy with trimethoprim-sulfamethoxazole. **Medic. Microb. And Immun.** v.193 (1), p.53-59, 2003.

SEMIGHINI, C. P.; CAMARGO, Z. P.; PUCCIA, R.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by 5' nuclease assay. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v.44, p.383-386, 2002.

SHADOMY, S. & ESPINEL-INGROFF, A. Susceptibility testing with antifungal drugs, 647-653. In Lennette, E. H.; Balows, A.; Hausler, W. J. & Truant, J. P. (ed.). **Manual of clinical Microbiology**. 3rd. Washington, ASM. 1980.

SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A., and R. Y. Cartwright. Estudios de laboratorio con agentes Antifúngicos: pruebas de susceptibilidad Y bioensayos, 1229-1238. In E. H. Lennete, A. Balows, W. J.y (ed.). **Manual de Microbiologia clinica**. Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1987.

SHIKANAI-YATSUDA, M. A.; Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. **Expert Opinion**., V.6 (3), p.385-397, 2005.

SHIKANAI-YATSUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L.; e grupo de Consultores do consenso em paracoccidioidomicose. Consenso em Paracoccidioidomicose. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, V.39 (3), p.297-310, 2006.

SILVA, C. L.; FAZIOLI, R. A. A *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide having granuloma-inducing, toxic and macrophage-stimulating activity. **J. Gen. Microbiol.**, v.131, p.1497-501, 1985.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z. P.; MALTA, M. H.; MAFFEI, C. M.; CHADU, J. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol.**, v.38, p.193-199, 2000.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; LEITE MAFFEI, C. M. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol.**, v.36, p.37-42, 1998.

SILVA-VERGARA, M. L.; TEIXEIRA, A. C.; CURY, V. G. M.; COSTA JUNIOR, J. C.; VANUNCE, R.; CARMO, W. M.; SILVA, M. R. Paracoccidioidomycosis associated with human immunodeficiency vírus infection. **Med. Mycol.**, v.41, p.259-263, 2003.

SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. et al. Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* in the human disease an in an experimental murine model. **Clin. Exp. Immunol.** v.97, p.113-119, 1994.

SINGER-VERMES, L. M.; CIAVAGLIA, M. C.; CASHINO, S. S.; BURGER, E.; CALICH, V. L. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.30 (3), p.261-264, 1992.

SINGH, N.; BARNISH, M.; BERMAN, S. et al. Low-dose fluconazole as primary prophylaxis for cryptococcal infection in AIDS patients with CD4+ cell counts of ≤ 100 mm: demonstration of efficacy in a prospective, multicenter trail. **Clin. Inf. Dis.**, v.23, p.1282-1286, 1996.

SLINGLUFF, C. L.; PETRONI, JR., G. R.; YAMSHCHIKOV, G. V.; HIBBITTS, S.; GROSH, W. W.; CHIANESE-BULLOK, K. A.; BISSONETTE, E. A.; BARND, D. L.; DEACON, D. H.; PETTERSON, J. W.; PAREKH, J.; NEESE, P. Y.; WOODSON, E. M.; WIERNASZ, C. J.; and MERRIL, P. Immunologic and clinical outcomes of vaccination with a multiepitope melanoma peptide vaccine plus low-dose interleukin-2 administered either concurrently or on a delayed schedule. **J. Clin. Oncol.**, v.22, p.474-4485, 2004.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Anfotericin B – induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **J. Inf. Dis. London**, v.154, p.76-83, 1986.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; SLLIGH, J. E.; ELBERG, S.; BRAJTBURG, J.; KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of anfotericin B. **Ant. Ag. Chem.** Washington, v.32, p.702-705, 1988.

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

SOUZA, A. R.; GESZTESI, J. L.; DEL NEGRO, G. M. B.; BENARD, G.; SATO, J.; SANTOS, M. V. B.; ABRAHÃO, T. B.; LOPES, J. D. Anti-idiotypic antibodies in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Clin. Diag. Labor. Immunol.**, v.7, p.175-181, 2000.

SPLENDRE, A. Zymonematosis com localizazzione nella cavità della bocca, osservada in Brasile. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v.5, p.313-319, 1912.

STAMBUK, B. U.; PUCCIA, R.; ALMEIDA, M. L. C.; TRAVASSOS, L. R. and SCHENKMAN, S. Secretion of the 43 kDa glycoprotein antigen by *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.26, p.367-373, 1988.

STEVENS, D. A.; P. T. VO. Synergistic interaction of trimethoprim and sulphamethoxazole on *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.21, p.852-854.

STOVER, E. P.; SCHAR, G.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A.; FELDMAN, D. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v.51, p.199-203, 1986.

SUNDSTROM, P.; JENSEN, J.; and BALISH, E. Humoral and cellular immune responses to enolase after alimentary tract colonization of intravenous immunization with *Candida albicans*. **J. Infect. Dis.**, v.170, p.390-395, 1994.

TABORDA, C. P.; and CAMARGO, Z. P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen-gp43. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.31, p.155-160, 1993.

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

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

TABORDA, C.P.; NAKAIE, C. R.; CILLI, E. M.; RODRIGUES, E. G.; SILVA, L. S.; FRANCO, M. F.; and TRAVASSOS L. R. Synthesis and immunological activity of

a branched peptide carrying the T-cell epitope of gp-43, the major exocellular antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Scan. J. Immunol.**, v.59, p.58-65, 2004.

TEWARI, R. P.; SHARMA, D. K.; MATHUR, A. Significance of thymus derived lymphocytes in immunity elicited by immunization with ribosomes of live yeast cells. **J. Infect. Dis.** v.138, p.605-613, 1978.

THEUS, S. A.; ANDREWS, R. P.; STEELE, P.; WALZER, P. D. Adoptive transfer of lymphocytes sensitized to the major surface glycoprotein of *Pneumocysti carinii* confers protection in the rat. **J. Clin. Invest.**, v.95, p.2587-2593, 1995.

THOMAS, P. W.; HUNG, C. Y.; KIRKLAND, T. N.; and COLE, G. T. Characterization of a T cell fraction of the parasitic fase of *Coccidioides immitis*, abstr. F-68. In Abstracts of the 97th General Meetingg of the America Society for Microbiology 1997. **Amer. Soc. for Microbiol.**, Washington, DC., 1997.

THOMAS, P. W.; HUNG, C. Y.; KIRKLAND, T. N.; COLE, G. T. Characterization of a T cell reactive fraction of the parasitic phase of *coccidioides immitis*, abstr. F-68. In Abstracts of the 97h General Meeting of the American society for Microbiology **America Society Microbiology, Washington, D. C.**, 1997.

TORRES-GUERRERO, H.; EDMAN, J. C. Melanin-deficient mutants of *Cryptococcus neoformans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 303-13, 1994.

TRAVASSOS, L. R. Immunochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, and DEL NEGRO, G... Editors, paracoccidioidomycosis, **CRC Press, Boca Raton, FL** 175-186, 1994.

TRAVASSOS, L. R., TABORDA, C. P., IWAI, L. K., CUNHA-NETO, E., PUCCIA, R. The gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*; a major diagnostic antigen and vaccine candidate. **The micota XVII Human Fungal Pathogens. Ed. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.** p. 179-296, 2003.

TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R.; CISALPINO, P.; TABORDA, C. P.; RODRIGUES E. G.; RODRIGUES M.; SILVEIRA, J. F.; and ALMEIDA, I. C. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.** v.26, p.297-304, 1995.

UEDA, A. K.; FRANCO, M.; FABIO, S. A.; PRESTES. F. R. Ketoconazole in the treatment of experimental murine paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia.** v.98, p.27-34, 1987.

UNITED NATIONS ON AIDS/WORLD HEARTH ORGANIZATION. LATIN AMERICA AND THE CARIBBEAN. **AIDS Epidemic Update:** December 2002, p. 19-21, 2002.

VILLA, L. A.; TOBON, A.; RESTREPO, A.; CALLE, D.; ROSERO, D. S.; GOMEZ, B. L. and RESTREPO, A. Central nervous system paracoccidioidomycosis. Report of a case successfully treated with itraconazol. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.42 (2), p.231, 234, 2000.

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

WANKE, B.; & LONDERO, A. T.; FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO A.; DEL NEGRO, G. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In Paracoccidioidomycosis. **CRC Press, Boca Raton**, Fla, 1994.

WHEELER, M. H.; BELL, A. A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. In: McGINNIS, M. R. ed. **Current topics in medical mycology**, New York, Springer-Verlag. V.2, p.338-387, 1987.

WILDFEUER, A.; SEIDL, H. P.; PAULE, I.; HABERREITER, A. In vivo evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeasts, moulds and dermatophytes in comparasion with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvina. **Myc.**, v.41, p.309-319, 1998.

WILLIAMSON, P. R.; BENNETT, J. E.; POLIS, M. A.; ROBINS, J. B.; and SCHNEERSON, R. Immunogenicity and safety of a conjugate glucuronoxylomannan-tetanus conjugate vaccine in volunteers. **Cli. Infect. Dis.** v.17, p.540 (abstract), 1993.

WÜTHRICH, M.; CHANG, W. L.; KLEIN, B. S. Immunogenicity and protective efficacy of the WI-1 adhesin of *Blastomyces dermatitidis*. **Infect. Immun.**, v.66(11), p.5443-5449, 1998.

YARZABAL, L. A.; ANDRIEU, S.; BOUT D.; NAQUIRA F. Isolation of a specific antigen with alkaline phosphatase activity from soluble extracts of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v.14, p.275-80, 1976.

ZACHARIAS, D.; UEDA, A.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M.; SAN-BLAS, G. A comparative histopathological, immunological and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.24, p.445-54, 1986.