LUCAS DOS SANTOS DIAS

Envolvimento dos neutrófilos na modulação da resposta imune em camundongos BALB/c vacinados com o peptídeo P10 na paracoccidiodomicose experimental

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Carlos Pelleschi Taborda

Versão original

São Paulo
2017

RESUMO

Dias LS. Envolvimento dos neutrófilos na modulação da resposta imune em camundongos BALB/c vacinados com o peptídeo P10 na paracoccidiodomicose experimental. [Tese (Doutorado em Microbiologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

A paracoccidiodomicose, uma micose sistêmica e endêmica em diversos países da América Latina, principalmente no Brasil, Colômbia, Argentina e Venezuela, é um importante problema de saúde pública. Embora exista tratamento, o mesmo é prolongado e casos de recidiva são comuns. Nesse sentido, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, como as vacinas, são extremamente importantes. Além disso, é imprescindível compreender a participação de diferentes populações celulares na resposta imune desencadeada pela vacina. Desse modo, o objetivo dessa tese foi avaliar a participação dos neutrófilos na resposta vacinal induzida pelo peptídeo P10 utilizando o modelo murino experimental na paracoccidiodomicose. Nossos resultados, *in vitro*, indicaram que a expressão de receptores como dectina-1, TLR-2 e TLR-4 em neutrófilos pode ser modulada sob efeito da vacina (peptídeo P10 associado ao lipídeo catiônico DODAB); *in vivo*, observamos que a vacina terapêutica reduziu a carga fúngica pulmonar em animais infectados por 15 ou 30 dias com redução de neutrófilos nos pulmões dos animais infectados por 15 dias. Estruturas sugestivas de NETs foram visualizadas nos pulmões dos animais com 15 dias de infecção. A administração passiva do anticorpo monoclonal Gr-1 (clone RB6/8C5), com especificidade contra Ly6C e Ly6G, levou a depleção dos neutrófilos. Vinte e quatro horas antes de cada imunização, a administração do anticorpo monoclonal Gr-1 indicou que neutrófilos são importantes no contexto da imunização, uma vez que a carga fúngica pulmonar não foi reduzida em comparação aos controles. Assim, concluímos que a vacina pode modular a infiltração dos neutrófilos no local da infecção, entretanto este fenômeno observado depende de variáveis entre elas, o momento que a infecção experimental é realizada.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, Neutrófilos, Vacina, Paracoccidiodomicose, P10.

ABSTRACT

Dias LS. Involvement of neutrophils in the modulation of the immune response in BALB/c mice vaccinated with the P10 peptide in experimental paracoccidioidomycosis. [thesis (Doctoral in Microbiology)]. - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

Paracoccidioidomycosis, a systemic mycosis and endemic in several Latin American countries, mainly in Brazil, Colombia, Argentina and Venezuela, is an important public health problem. Although there is treatment, it is prolonged and cases of relapse are common. In this sense, the development of new therapeutic approaches, such as vaccines, is extremely important. In addition, it is imperative to understand the participation of different cell populations in the immune response triggered by the vaccine. Thus, the aim of this thesis was to evaluate the participation of neutrophils in the vaccine response induced by the P10 peptide using the experimental murine model in paracoccidioidomycosis. Our results, *in vitro*, indicated that the expression of receptors such as dectin-1, TLR-2 and TLR-4 in neutrophils can be modulated under the effect of the vaccine (peptide P10 associated with the cationic lipid DODAB). *In vivo*, we observed that the therapeutic vaccine reduced lung fungal load in infected animals for 15 or 30 days with reduced neutrophils in the lungs of infected animals for 15 days. Structures suggestive of NETs were visualized in the lungs of animals with 15 days of infection. Passive administration of Gr-1 monoclonal antibody (clone RB6 / 8C5), with specificity against Ly6C and Ly6G, led to neutrophil depletion. Twenty-four hours before each immunization, administration of Gr-1 monoclonal antibody indicated that neutrophils are important in the immunization context, since lung fungal load was not reduced in comparison to controls. Thus, we conclude that the vaccine can modulate the infiltration of neutrophils at the site of infection, however this phenomenon observed depends on variables between them, the moment the experimental infection is performed.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, Neutrophils, Vaccine, Paracoccidioidomycosis, P10.

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de caráter granulomatoso endêmica em diversos países da América Latina, sendo Brasil, Colômbia e Venezuela os países que registram a maior parte dos casos. Alguns casos de importação foram registrados na Europa, Ásia e Estados Unidos. No Brasil, o Estado de São Paulo é responsável pela maior parte dos casos. Além disso, Os Estados do Mato Grosso, Mato do Grosso do Sul, Rondonia e Paraná registram atualmente muitos novos casos de PCM (Martinez, 2015).

No que diz respeito a etiologia da doença, é causada pelo fungo *Paracoccidioides* spp., sendo reconhecidas duas espécies: *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. É um fungo termodimórfico que apresenta-se na forma de bolor à 25 °C e na forma de levedura quando a 37 °C (Bagagli *et al.*, 2008). Há um consenso entre os pesquisadores de que a forma de bolor é a forma infectante e a levedura a forma patogênica.

É descrito que apenas uma pequena parcela dos indivíduos que entraram em contato com o fungo desenvolverão a doença (Benard, 2008). Desses, a maior parte irá manifestar a forma crônica (adulta) da doença que é essencialmente de base pulmonar associada ou não com o comprometimento de regiões muco-cutâneas, e que acomete geralmente indivíduos do sexo masculino, entre 35 e 60 anos e com atividades ligadas ao solo (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). A outra forma da doença é a aguda (juvenil), caracterizada por início rápido e pelo comprometimento do sistema retículo-endotelial tanto em homens quanto mulheres (Benard, 2008). Em relação a faixa etária acometida ou são indivíduos jovens ou idosos.

O tratamento da PCM pode ser feito com derivados azólicos ou a associação sulfametoxazol-trimetropim na maioria dos casos. Entretanto, alguns casos mais graves requerem a utilização de anfotericina B (Shikanai-Yasuda, 2015). Embora haja tratamento, o mesmo é longo (de 6 meses até 2 anos) e casos de recidivas são frequentes. Além disso, alguns pacientes desenvolvem sequelas que podem incapacitá-los para a execução de suas atividades (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

Os casos de recidiva e sequelas observados na PCM demonstram claramente a necessidade de uma terapia mais efetiva. Nesse sentido, as possibilidades são

inúmeras. Por um lado, há a formulações de novos antifúngicos ou a modificações daqueles já disponíveis de modo a melhorar a distribuição, a biodisponibilidade e reduzir o tempo de tratamento e os efeitos tóxicos. Em outro polo, há o desenvolvimento de vacinas ou imunomoduladores que visam melhorar a resposta imune do hospedeiro e levar a resolução da doença. Nesse último polo é interessante perceber o desenvolvimento das chamadas vacinas terapêuticas e a possibilidade de administrar as mesmas junto a um regime de antifúngico, podendo reduzir dose e tempo de tratamento.

No que se refere a vacina em PCM, o nosso grupo de pesquisa, coordenado pelo Dr. Carlos Pelleschi Taborda, tem contribuído de forma expressiva. Há pelo menos 10 anos são realizados diversos estudos envolvendo o peptídeo P10 como antígeno vacinal voltado para PCM. Esse peptídeo é derivado de uma glicoproteína de 43 kDa, uma importante proteína de *P. brasiliensis* envolvida em diversos processos.

Os dados obtidos com P10 ao longo do tempo demonstram claramente sua efetividade em diferentes abordagens. No entanto, para que os estudos possam avançar e chegar até a fase clínica, é necessário que haja uma melhor caracterização da resposta imune envolvida, sobretudo no que diz respeito a participação de alguns tipos celulares.

Nesse sentido, em um dos estudos realizados pelo nosso grupo foi observado um intenso infiltrado neutrofílico nos pulmões de camundongos infectados com *P. brasiliensis* e que foram tratados com a vacina de P10. Paralelamente, esses animais apresentaram menor carga fúngica, resposta imune do tipo Th1 e tecido pulmonar mais preservado, quando comparado com o grupo controle, somente infectado com as leveduras.

Diante dos dados expostos acima, fica evidenciado a necessidade de melhor entendimento sobre a participação dos neutrófilos na dinâmica vacinal. É necessário investigar a vacina e a modulação das diferentes populações celulares como os neutrófilos, sobretudo no que se refere a expressão de receptores de reconhecimento padrão (TLRs, Dectina-1, entre outros) e na habilidade de morte e de fagocitose. Por outro lado, é importante demarcar a atividade dos neutrófilos no processo de imunização e na resposta imune final desencadeada pela vacina. Deste

modo, todo o exposto se enquadra como justificativa para a execução do presente trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais sobre a paracoccidioidomicose

As micoses pulmonares constituem importante problema de saúde pública para a população em geral, em virtude do número crescente de indivíduos acometidos, principalmente pacientes com algum tipo de comprometimento imunológico (terapia imunossupressora pós-transplante, uso de corticóide, SIDA e tratamento oncológico). Estas micoses atingem percentual bastante elevado em indivíduos em idade produtiva, levando muitas vezes, a incapacitação, sequelas e ocasionalmente a óbito (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

Dentre essas micoses, a paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica mais prevalente na América Latina, com 80% dos casos sendo registrados no Brasil, seguido de Colômbia, Venezuela e Argentina (Brummer *et al.*, 1993; Martinez, 2015). No Brasil, a maior parte dos casos se concentram nas regiões sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo), centro-oeste (Mato Grosso do Sul e Goiás) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Entretanto, outras regiões tem casos registrados, destacando-se os Estados do Pará, Tocantins, Maranhão e mais recentemente o Estado de Rondônia (Martinez, 2015).

A paracoccidioidomicose também foi registrada na Europa, EUA, África e Ásia, mas todos os casos foram revisados e considerados de importação uma vez que os indivíduos acometidos relataram terem visitado ou trabalhado em áreas endêmicas na América Latina (Martinez, 2015).

O primeiro pesquisador a descrever a PCM foi Adolfo Lutz, em 1908, em um trabalho no qual analisou dois pacientes que apresentavam lesões na mucosa oral (Negroni, 1993). A micose primeiramente foi denominada como Doença de Lutz-Splendore-Almeida, Blastomicose brasileira e depois por blastomicose sul-americana. Em 1971, durante o encontro internacional sobre PCM em Medellín (Colômbia), o termo paracoccidioidomicose foi aceito e utilizado mundialmente desde então (Almeida *et al.*, 2003).

Coutinho *et al.* (2002) estudando 3.181 óbitos por paracoccidioidomicose no Brasil, a partir de séries temporais de 16 anos (1980-1995), revelaram que durante esse período a PCM mostrou grande magnitude, sendo considerada como oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva entre as infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. A taxa de mortalidade média anual foi de 1,45/milhão de habitantes, predominando em indivíduos do sexo masculino, com 84,75% dos óbitos. O grupo etário entre 30-59 anos foi o mais atingido, seguido dos indivíduos com 60 anos ou mais (Coutinho *et al.*, 2002).

Em estudo desenvolvido por Bittencourt *et al.* (2005), sobre a mortalidade por paracoccidioidomicose no Estado do Paraná, no período de 1980 a 1998, utilizando-se como fonte de dados os registros de óbitos do SIM e a população estimada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a taxa de mortalidade média anual foi de 3,48 por milhão de habitantes e destacou-se como a quinta causa de mortalidade entre as doenças infecciosas e parasitárias predominantemente crônicas, apresentando a mais alta taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas (Bittencourt *et al.*, 2005).

Posteriormente, Prado *et al.* (2009), analisando dados epidemiológicos de 1996 a 2006, mostrou que no território brasileiro os maiores índices de mortalidade dessa micose concentram-se na região Sudeste, destacando-se os Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, e na região Sul, nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul. A PCM foi a principal causa de morte entre as micoses sistêmicas (Prado *et al.*, 2009).

Os estudos de incidência mostram que áreas estabilizadas apresentam uma estimativa entre 1 a 4 casos/cem mil habitantes/ano. Entretanto, Estados como Rondônia atingem 9,4 casos/cem mil habitantes/ano e algumas cidades do Estado podem até ultrapassar esses índices (Vieira *et al.*, 2014).

Nessa dinâmica epidemiológica, alterações sócio-ambientais podem mudar a distribuição da doença no território brasileiro ou mesmo a incidência e prevalência. Nesse sentido, alterações climáticas provocadas pelo fenômeno *El niño* entre 1982 e 1983 foram associadas com casos de PCM aguda/subaguda ocorridos de 1 a 2 anos depois na região Sudeste (Barrozo *et al.*, 2010). O aumento de casos no Estado de Rondônia tem sido associado ao desmatamento e consequente implantação de áreas destinadas a agricultura ou a criação de gado (Vieira *et al.*, 2014). Em

contrapartida, tem sido observado uma redução no número de casos de PCM aguda no Estado do Mato Grosso do Sul, provavelmente resultante do combate ao trabalho infantil (Fabris *et al.*, 2014).

Não obstante, é relevante saber que a PCM é inserida como um grave problema de saúde pública uma vez que acomete principalmente homens na fase mais produtiva da vida, visto que 84,75% dos casos ocorrem entre 30 e 60 anos, e que resultam em sequelas secundárias à infecção podendo incapacitar o indivíduo para o trabalho (Brummer *et al.*, 1993; Martinez, 2015).

Entretanto, apesar de todo o contexto epidemiológico, o Ministério da saúde não incluiu a paracoccidioidomicose na lista de doenças de notificação compulsória, assim alguns autores não acreditam que os dados existentes reflitam a realidade da doença (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

2.2 Etiologia e filogenia

O principal agente etiológico da paracoccidioidomicose é o fungo termodimórfico do gênero *Paracoccidioides* spp. Inicialmente, Splendore, em 1912, designou o fungo como *Zymonema brasiliensis*, mas Floriano de Almeida, em 1930, comparando as diferenças acentuadas nas características morfológicas e biológicas do fungo da micose sul-americana e de *Coccidioides immitis* propôs o nome de *Paracoccidioides brasiliensis*, assim classificando o novo achado em um novo gênero e espécie. Recentemente foi descrito uma nova espécie, *P. lutzii*, responsável principalmente por casos da doença na região Centro-Oeste do território brasileiro (Teixeira *et al.*, 2009).

Alguns pesquisadores supõem que o fungo *Paracoccidioides* spp. ocorre como saprófito no solo, onde provavelmente está na forma de micélio. Sua transição morfológica é dependente de temperatura, apresentando forma miceliana entre 19 °C – 23 °C e forma de levedura entre 36 °C – 37 °C (San-Blas *et al.*, 2002).

Recentemente foi descrito o que parece ser um novo isolado não cultivável de *P. brasiliensis* que está envolvido em lesões cutâneas em golfinhos (Vilela *et al.*, 2016). Essa conclusão foi obtida a partir de análises genéticas de DNA extraído de granulomas cutâneos em golfinhos da espécie *Tursiops truncatus*. Essa análise

revelou 100% de homologia com *P. brasiliensis* e 93% com *P. lutzii* (Vilela *et al.*, 2016).

Inicialmente *Paracoccidioides* spp. era considerado como fungo imperfeito, em virtude da sua fase sexual não ter sido caracterizada, mas com o refinamento das técnicas moleculares este fungo passou a ser classificado como pertencente à família Onygenaceae *sensu lato* (ordem Onygenales, filo Ascomycota) {Formatting Citation}. Posteriormente, foi proposto um clado monofilético distinto de Onygenaceae *lato sensu*, sendo denominada família Ajellomycetaceae que incluem os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (Untereiner *et al.*, 2004). Um importante traço compartilhado por todos os membros dessa família é a sua adaptação aos vertebrados.

Os estudos filogenéticos tem classificado *P. brasiliensis* em quatro espécies crípticas (S1, PS2, PS3 e PS4) com diferentes características evolutivas e distribuição geográfica. S1 é considerado um grupo monofilético recombinante e com ampla distribuição da América do Sul, sendo responsável pela maior parte dos casos de PCM. PS2 também é recombinante só que parafilético, e é encontrado no Brasil e na Venezuela. Já PS3 é uma população clonal e monofilética, sendo registrada só na Colômbia. Por sua vez, o grupo PS4 foi recentemente introduzido e é classificado como um grupo monofilético de isolados clínicos da Venezuela (Matute, 2005; Theodoro *et al.*, 2012).

Em relação a *P. lutzii*, estima-se que o seu grupo monofilético foi separado dos grupos S1, PS2 e PS3 a aproximadamente 30 milhões de anos atrás. Esta espécie é endêmica nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil (Estados de Rondônia, Mato Grosso e Goiás) e compartilha algumas áreas geográficas com o grupo S1 (Teixeira *et al.*, 2013).

2.3 Aspectos ecológicos do fungo *Paracoccidioides*

O fungo *Paracoccidioides* spp. é predominantemente encontrado em regiões de clima úmido, com temperaturas médias de 17 a 24 °C, alto índice pluviométrico, solo ácido e vegetação densa, como florestas tropicais e subtropicais (Restrepo, 1985; Brummer *et al.*, 1993). Em um elegante trabalho foi observado que *Paracoccidioides* spp. cresce bem em solos arenosos e argilosos quando a umidade

é alta, enquanto que na condição de baixa umidade não há crescimento (Terçarioli *et al.*, 2007). Também foi observado que o fungo é incapaz de crescer em alguns solos contendo altas quantidades de alumínio trocável e baixa saturação de bases (Terçarioli *et al.*, 2007).

Além destes fatores, os hospedeiros de *Paracoccidioides* spp. têm grande relevância na compreensão de sua ecologia. Excetuando o homem, o hospedeiro mais comum é o tatu-de-nove-faixas (*Dasypus novemcinctus*), sendo o fungo isolado desses animais por grupos de pesquisa do Brasil e da Colômbia (Corredor *et al.*, 1999; Restrepo *et al.*, 2001; Bagagli *et al.*, 2003). Nesta espécie de tatu o fungo tem sido isolado em 75-100% dos animais capturados em áreas hiperendêmicas de PCM, mostrando uma alta frequência de infecção (Restrepo *et al.*, 2001; Bagagli *et al.*, 2003). Estes isolados são indistinguíveis dos isolados clínicos em termos de antígeno, virulência e perfil molecular, confirmando que o mesmo genótipo infecta animais e humanos (Hebeler-Barbosa *et al.*, 2003). Corredor *et al.* (2005) isolaram *Paracoccidioides* de outra espécie desse mamífero: tatu de cauda nua (*Cabassous centralis*).

Os tatus apresentam algumas características que parecem favorecer a infecção por leveduras de *Paracoccidioides* spp., como ótima temperatura corporal (entre 32,7 e 35 °C), baixa imunidade celular e constante contato com o solo (Eduardo Bagagli *et al.*, 2008). É hipotetizado que o parasitismo nesses animais possibilitaria a preservação da forma saprófita e contribuiria para a reprodução sexual, por promover a proximidade de tipos de acasalamentos em um ambiente protegido, como o tecido ou órgãos do tatu (Bagagli *et al.*, 2006). Além disso, os tatus parecem ter um importante envolvimento na evolução de *Paracoccidioides* spp. para a condição zoofílica (Bagagli *et al.*, 2006). O fungo também já foi isolado de cães, pinguins, bicho-preguiça e fezes de morcego (Grose, Tamsitt, 1965; de Farias *et al.*, 2011; Trejo-Chávez *et al.*, 2011).

2.4 Infecção e manifestações clínicas

A aquisição do fungo pelo hospedeiro humano ocorre através da inalação de conídios produzidos na sua fase miceliana. O tamanho reduzido destes (menores que 5 µm) permite ao fungo atingir os alvéolos pulmonares, local de início da

infecção e onde ocorre a transição para a sua fase leveduriforme (Restrepo *et al.*, 2001). A levedura apresenta parede celular espessa e birrefringente, como diâmetro variando de 5 a 30 µm e podendo apresentar brotamentos únicos ou múltiplos, sendo este último aspecto chamado de “roda de leme” (De Oliveira *et al.*, 2015).

Alguns fatores que influenciam a dinâmica da infecção humana por *Paracoccidioides* incluem o desmatamento acelerado e o revolvimento do solo para o plantio (Barrozo *et al.*, 2009). É especulado que tais atividades trazem o fungo, que inicialmente encontrava-se entre 2 a 20 cm abaixo da terra, para a superfície onde poderá ser inalado pelo trabalhador (Bagagli *et al.*, 2008). Outro fator relevante para infecção do indivíduo trata-se da interação entre temperatura, umidade relativa do ar e chuva, que podem favorecer a formação de aerossóis contendo os esporos do fungo (Barrozo *et al.*, 2009).

Após inalação dos conídios ou fragmentos de micélio pelo hospedeiro, o patógeno é convertido para a forma de levedura, estabelecendo a infecção. O fungo pode permanecer confinado aos pulmões ou se disseminar largamente a órgãos e tecidos, dando origem a diferentes manifestações clínicas da doença. A classificação clínica da PCM compreende a PCM-infecção e a PCM-doença. Em pacientes com PCM-infecção, a resposta imunológica apresenta-se satisfatória e o desenvolvimento do foco infeccioso é contido, embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica, evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina (Benard *et al.*, 1996) .

A maioria dos indivíduos que entram em contato com o fungo consegue conter a infecção e não desenvolver a doença, este dado pode ser comprovado quando se analisa a alta taxa de moradores de áreas endêmicas que apresentam positividade no teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardia (HTT) para antígenos do fungo, mas não apresentam sintomas da doença (Bethlem *et al.*, 1999). Nestas situações, há formação de lesões fibróticas no pulmão (complexo primário pulmonar) e o foco infeccioso desaparece. O fungo permanece em latência, mas continua viável e, caso haja um desequilíbrio na relação parasita-hospedeiro, a infecção pode progredir para PCM-doença (Franco *et al.*, 1987).

A PCM-doença pode ser dividida em duas formas clínicas principais: aguda ou subaguda e crônica. A razão dessa distinção clínica não está clara e presume-se

que características específicas da relação parasita-hospedeiro contribuam para isso (Benard, 2008). A forma aguda é mais severa e pode levar semanas ou meses para manifestar-se, sendo responsável pelas altas taxas de mortalidade provocadas pela doença. Pode afetar ambos os sexos e atinge o sistema reticuloendotelial, com hipertrofia dos linfonodos, hepatomegalia e/ou esplenomegalia (Singer-Vermes *et al.*, 1995; Fabris *et al.*, 2014). Exames histológicos do pulmão demonstram processos granulomatosos frouxos, pouco organizados, contendo numerosos fungos viáveis (Queiroz-Telles, Escuissato, 2011).

Os pacientes com a forma aguda/subaguda da doença apresentam respostas imunes mediadas por células altamente deprimidas, permitindo o desenvolvimento de uma resposta imune humoral com presença de altos títulos de anticorpos, tanto específicos, quanto inespecíficos, pois há uma ativação policlonal de células B. Há, neste caso, o predomínio de um padrão Th2 e eosinofilia (Benard *et al.*, 1997).

A forma crônica da PCM corresponde a mais de 90% dos casos, atingindo trabalhadores rurais do sexo masculino com idade entre 30 e 50 anos (Verli *et al.*, 2005). O fungo pode ficar latente durante meses ou anos e quando manifestado, afeta mucosa e pulmões, podendo levar à morte devido ao comprometimento das funções pulmonares (Singer-Vermes *et al.*, 1995; Queiroz-Telles, Escuissato, 2011).

Na fase assintomática, a PCM caracteriza-se pela presença de granulomas nos pulmões ou linfonodos que, dependendo do sistema imune do hospedeiro, são reativados, ocorrendo progressão da doença e disseminação do fungo para outros órgãos (Souza *et al.*, 1998; Cavassani *et al.*, 2006). Dependendo do caso, a PCM pode deixar sequelas graves no paciente, pois provoca fibrose nos órgãos atingidos (Benard, 2008). Cerca de 25% dos doentes apresentam lesões restritas aos pulmões (forma unifocal), os demais podem apresentar a forma multifocal da doença que compromete principalmente as mucosas, pele e linfonodos (Brummer *et al.*, 1993).

Os pacientes com a forma crônica da PCM apresentam níveis elevados de IL-12 e IFN- γ , citocinas relacionadas a desenvolvimento da resposta imune celular, sugerindo controle da infecção ou uma manifestação menos grave da doença (Baida *et al.*, 1999). O hospedeiro apresenta a resposta imune celular parcialmente preservada, com baixos títulos de anticorpos e granulomas epitelióides melhor

organizados contendo poucos fungos, contrário ao que acontece na forma aguda (Franco *et al.*, 1987; Brummer *et al.*, 1993).

A aparente resistência das mulheres à doença ocorre devido à presença de níveis altos do hormônio estradiol, que inibe a transformação de micélio para a forma infectante da levedura. É proposto que o 17- β estradiol bloqueia a síntese de proteínas das leveduras de *Paracoccidioides* que se expressam durante a transformação da fase de micélio para levedura (Loose *et al.*, 1983; Salazar *et al.*, 1988).

Posteriormente à resolução da doença, alguns pacientes podem apresentar algumas sequelas graves ou moderadas, algumas das quais podem ser incapacitantes. As principais sequelas envolvem o pulmão, onde pode ser observada intensa fibrose pulmonar (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Esta alteração é provocada principalmente pelo acúmulo de colágeno no tecido que foi induzido pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e pelo fator de crescimento transformante beta (TGF- β), presentes a níveis maiores no estágio avançado da resposta inflamatória (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

Além do pulmão, outras partes do corpo também podem apresentar sequelas: glândula adrenal, sistema nervoso central, mucosas e pele. E, nestes casos as sequelas são as mais diversas. Os pacientes podem desenvolver doença de Addison, déficit motor, epilepsia, hidrocefalia, disfonia por lesão de corda vocal, obstrução laríngea com necessidade de traqueostomia, redução da rima bucal e microstomia peri-oral (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

2.5 Diagnóstico e tratamento

Em relação ao diagnóstico para PCM, existem diversas metodologias utilizadas, mas o método considerado padrão ouro é a identificação de elementos fúngicos das leveduras de *Paracoccidioides*, em exame a fresco de espécimes clínicos (escarro, lavado brônquico ou broncoalveolar, secreções, raspados de lesões e biópsia mucocutâneas) ou o isolamento do fungo em meio de cultura (Moreto *et al.*, 2011). Contudo, em algumas situações, dependendo do estado físico

ou clínico dos pacientes, torna-se impossível o acesso ao local de lesão e a coleta do material biológico (Marques-Da-Silva *et al.*, 2006).

Nestes casos, a pesquisa de antígenos e anticorpos circulantes específicos no soro de pacientes assume grande importância no diagnóstico indireto e comprobatório da infecção (Elias Costa *et al.*, 2000; Do Valle *et al.*, 2001). Assim, os ensaios sorológicos têm sido uma das principais ferramentas para o diagnóstico confirmatório e monitoramento das respostas dos pacientes ao tratamento, permitindo a obtenção de resultados mais rápidos, quando comparados aos exames de cultura e histológico (Del Negro *et al.*, 2000; Marques-Da-Silva *et al.*, 2006). De fato, em alguns casos o resultado sorológico se traduz na primeira indicação da doença, principalmente naqueles indivíduos que ainda não apresentam sinais clínicos aparentes (Zoilo Pires De Camargo, 2008).

Os testes diagnósticos sorológicos comumente empregados na confirmação da PCM são a imunodifusão dupla em gel de agarose (IDD) (Del Negro *et al.*, 2000; Camargo *et al.*, 2003), imunofluorescência indireta (Mistreta *et al.*, 1985; Del Negro *et al.*, 2000), ensaios imunoenzimáticos como o ELISA (de Almeida *et al.*, 2002) e *immunoblotting* (Do Valle *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2008). Além disso, algumas técnicas moleculares têm sido empregadas com a mesma finalidade, como a técnica da PCR, do *nested* PCR e do PCR em tempo real (Bialek *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2000; Buitrago *et al.*, 2009).

O tratamento dos casos de PCM é feito com antifúngicos da classe dos sulfanilamídicos (sulfametoxazol/trimetoprim), anfotericina B e os derivados azólicos (cetaconazol e itraconazol). Na maioria dos casos a terapia antifúngica empregada é satisfatória, levando à cura do paciente. Entretanto, o tratamento é longo, podendo durar de 2 a 6 meses e em alguns casos, perdurar por 2 ou mais anos, sendo comum a interrupção do tratamento (Marques *et al.*, 2006; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Além disso, casos de resistência aos derivados azólicos e a sulfametoxazol/trimetoprim têm sido registrados (Hahn *et al.*, 2003).

2.6 Neutrófilos e resposta imune

As diferentes manifestações da PCM correlacionam-se com fatores diversos, tais como virulência e patogenicidade do agente infeccioso e suscetibilidade do sistema imunológico do hospedeiro (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). A resposta imune

celular mediada é a principal forma de defesa do organismo contra a PCM (Gil Benard, 2008). Indivíduos assintomáticos, considerados resistentes à doença, ou com formas menos severas de PCM, em geral, apresentam resposta positiva em testes de hipersensibilidade tardia (HTT) para antígenos específicos de *Paracoccidioides* spp. (Mota *et al.*, 1985). Esse padrão de resposta é esperado, uma vez que as reações de HTT são mediadas por células T CD4⁺ do tipo Th1, responsáveis pela produção de interferon gama (IFN- γ) e de interleucina 2 (IL-2) e diversos autores têm demonstrado que respostas do tipo celular (Th1) predominam na resistência à PCM severa (Benard *et al.*, 1996; de Oliveira *et al.*, 2008).

Por outro lado, indivíduos com PCM disseminada apresentam predomínio de resposta do tipo Th2, com aumento da expressão de IL-4, IL-5 e IL-10, diminuição dos níveis de IFN- γ (Peraçoli *et al.*, 2003) e presença de elevados títulos de anticorpos específicos (Benard *et al.*, 1997; Chiarella *et al.*, 2007).

Não obstante, a resposta inata constitui a primeira linha de defesa do organismo, controlando o crescimento inicial dos patógenos e influenciando na resposta adaptativa. Essa resposta atua diretamente através da destruição do patógeno por meio da fagocitose e/ou pela secreção de compostos microbicidas. Além disso, pode estimular a resposta adaptativa através da produção de mediadores pró-inflamatórios, na indução de moléculas co-estimulatórias, e na captura e apresentação de antígenos (Calich *et al.*, 2008).

Como a PCM não é diagnosticada logo após a infecção inicial, os estudos se concentram em respostas tardias, como a resposta adaptativa humoral e a celular (Calich *et al.*, 2008). Nos pulmões, macrófagos alveolares, células dendríticas, neutrófilos e células NK são as principais células responsáveis em organizar e atuar na resposta inata. Na presença de IFN- γ , os macrófagos fagocitam o fungo, impedem a sua replicação intracelular *in vitro* e inibem o dimorfismo por ação do óxido nítrico (Gonzalez *et al.*, 2000).

Os neutrófilos, por sua vez, parecem ser a primeira barreira contra *Paracoccidioides* spp. e a produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio são essenciais nesse processo (Reeves *et al.*, 2003). Na estrutura do granuloma há população aumentada de neutrófilos que além de eliminar o fungo por

fagocitose, podem desenvolver vacúolos extracelulares para quando o tamanho de fungo é muito grande (Dias *et al.*, 2004).

De acordo com alguns autores, existe a habilidade única e intrínseca dos neutrófilos de alguns indivíduos em processar células de *Paracoccidioides brasiliensis*, o que os tornaria mais resistentes à paracoccidioidomicose (Goihman-Yahr *et al.*, 1980). Estudo usando camundongos BALB/c atímicos, revelou que a suscetibilidade à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* é exacerbada nesses animais, demonstrando a importância dos linfócitos T e de outras substâncias secretadas/produzidas pelo timo que agem na imunidade do hospedeiro. Além disso, esses camundongos foram capazes de controlar a infecção nos estágios iniciais, sugerindo que mecanismos da imunidade inata têm importante envolvimento na resistência a PCM e que, provavelmente, os neutrófilos estão envolvidos (Burger *et al.*, 1996).

Recentemente, foi demonstrado que neutrófilos parecem ser importante na fase aguda (24 a 96 horas) da infecção, uma vez que a depleção destas células, 24 horas antes da infecção, resultou em maior carga fúngica pulmonar (Pino-Tamayo *et al.*, 2016). Em contrapartida, a depleção dos neutrófilos na fase crônica da doença tem efeito inverso. Isto é, há resolução da doença, sugerindo assim que os neutrófilos nesse contexto são prejudiciais (Puerta-Arias *et al.*, 2016). Deste modo, fica claro o envolvimento dual dos neutrófilos na PCM.

Não obstante, é importante perceber que a importância dos neutrófilos parece estar diretamente relacionada a constituição genética do hospedeiro. Assim, em camundongos da linhagem B10.A, suscetíveis à infecção por leveduras do gênero *Paracoccidioides*, os neutrófilos são de extremo valor na resposta imune. Já em camundongos da linhagem A/J, resistentes à doença, os neutrófilos parecem não ser importantes (Pina *et al.*, 2006).

É relevante entender que os neutrófilos, nos últimos 20 anos, têm adquirido cada vez mais o interesse da comunidade científica. Muito contrário ao que se pensava antigamente, os neutrófilos são vistos hoje como células que podem modular a resposta imune adaptativa (Mócsai, 2013). Nesse sentido, já tem sido demonstrado que os neutrófilos podem realizar apresentação antigênica, recrutamento de células para o local da infecção e modulação de resposta Th1 e

Th17 (Abi Abdallah *et al.*, 2011; Trentini *et al.*, 2016). Há diversos estudos demonstrando a importância dessas células no contexto de vacinas (Calabro *et al.*, 2011; Jee *et al.*, 2015).

Dentro da resposta imune inata, os chamados receptores de reconhecimento padrão assumem um papel chave na modulação da resposta. Estes receptores reconhecem padrões moleculares associados a patógenos e que são, na maior parte das vezes, invariáveis (Thomas, Schroder, 2013). Receptores similares a Toll (Toll-like receptor – TLR) tem sido as estruturas mais bem estudadas na resposta inata a diferentes organismos (Gonzalez, 2013).

O envolvimento de TLR-2 e TLR-4 nos neutrófilos durante a infecção por PCM foi investigado Acorci-Valério *et al.* (2010), que observaram que o isolado Pb18 utiliza o receptor TLR-4 para entrar nos neutrófilos. Contudo, essa interação não induz nos neutrófilos o aumento de mecanismos microbicidas, o que parece sugerir que o fungo utilize TLR-4 para infectar células fagocíticas, multiplicar-se e escapar de outras ações da imunidade inata (Acorci-Valério *et al.*, 2010).

Além da explosão respiratória e a liberação de grânulos bioativos, ocorre a liberação de redes extracelulares (neutrophil extracellular traps –NET) formada por fibras que contém majoritariamente cromatina e proteínas granulares e, que são ativadas por IL-8, GM-CSF, LPS, PMA e IFN- γ (Thomas, Schroder, 2013). Esta rede tem capacidade de ligar-se a fungos e resultam na ativação da NADP oxidase e na formação de espécies reativas do oxigênio requeridas para induzir morte celular (Urban *et al.*, 2006).

Em humanos, a formação de NETs foi observada em lesões tegumentares de pacientes com PCM (Della Coletta *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado *in vitro* que neutrófilos humanos podem induzir um padrão diferente de NETs dependendo da virulência do isolado de *P. brasiliensis* (Della Coletta *et al.*, 2015). Nesse sentido, as NETs induzida por *P. brasiliensis* parece envolver a participação de dectina-1 (Bachiega *et al.*, 2015). Entretanto, outro estudo *in vitro* concluiu que a formação de NETs não leva a morte de *P. brasiliensis* (Mejía *et al.*, 2015).

2.7 Peptídeo P10 como antígeno vacinal

O longo tratamento antifúngico da PCM associado aos casos de recidiva, bem como o desenvolvimento de sequelas que incapacitam os indivíduos para a realização de suas atividades profissionais, torna-se urgente a necessidade de novas abordagens de terapia. Por um lado, isso pode ocorrer por vias clássicas como desenvolvimento de novos fármacos ou o melhoramento dos já existentes. Por outro lado, abordagens imunoterapêuticas parecem ser uma excelente saída.

Nesse sentido, o uso de vacinas profiláticas ou terapêuticas seriam uma opção para a proteção do hospedeiro ou para a redução do tempo de tratamento. Um dos estudos mais promissores em vacina diz respeito ao peptídeo P10, derivado da glicoproteína de 43 kDa (gp43) de *P. brasiliensis*. Esse peptídeo, constituído por 15 aminoácidos (QTLIAHTLAIRYAN), foi o único peptídeo capaz de induzir proliferação de linfócitos T. Além disso, a imunização de camundongos com o peptídeo levou a uma proteção vigorosa contra o isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18), sendo este efeito atribuído a forte resposta imune celular mediada pela secreção de IFN- γ e IL-2 por linfócitos T (Taborda *et al.*, 1998).

Um fator importante na utilização de peptídeos sintéticos, como vacinas em diferentes populações, é o reconhecimento dos epitopos por células T de indivíduos que apresentam moléculas distintas de MHC. Em camundongos, o peptídeo P10 é apresentado pelas moléculas do MHC de classe II de três haplótipos diferentes de camundongos (BALB/c: H-2^d; A/Sn: H-2^a; C57Bl/6: H-2^b) (Taborda *et al.*, 1998). Através do programa TEPITOPE, utilizado para seleção de sequências peptídicas com maior probabilidade de ligação a múltiplas moléculas de HLA-DR em caucasianos, foi demonstrado que o peptídeo P10 é promíscuo, sendo importante candidato vacinal para ser utilizado em humanos (Iwai *et al.*, 2003).

Uma interessante abordagem foi realizada com o objetivo de associar o peptídeo P10 com o tratamento antifúngico. Nesse estudo, o tratamento conjunto com drogas como: itraconazol e sulfametoxazol/trimetopim mais o P10 mostrou efeito protetor, quando administrado às 48 horas ou 30 dias após a infecção com *P. brasiliensis*, reduzindo a carga fúngica nos pulmões, preservando a estrutura alveolar e prevenindo a disseminação do fungo para baço e fígado (Marques *et al.*, 2006).

Esses resultados foram também observados em camundongos anérgicos submetidos à quimioterapia e imunizados com o peptídeo, apresentando resposta Th1 protetora com incremento significativo nos níveis de IFN- γ e IL-12 (Marques *et al.*, 2008). Isto sugere que a vacinação com P10 pode ser utilizada para melhorar a quimioterapia convencional e reduzir o tempo de tratamento, inclusive nos casos de pacientes anérgicos (Marques *et al.*, 2008).

Outra abordagem promissora foi a vacina específica de DNA, baseada em plasmídeos contendo o inserto do gene de P10 e da interleucina 12 (IL-12), para imunização profilática e terapêutica de camundongos BALB/c e B10.A infectados com o isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18) (Rittner *et al.*, 2012). Essa formulação vacinal foi efetiva na eliminação do fungo, com recuperação das estruturas pulmonares e produção significativa dos níveis de IL-12 e IFN- γ (Rittner *et al.*, 2012). Adicionalmente, a imunização com o plasmídeo que codifica o P10 induz a proliferação de células de memória assim como células T reguladoras, ajudando na redução do dano tecidual decorrente da resposta imune protetora (de Amorim *et al.*, 2013). Dessa forma, os plasmídeos são importantes alternativas para a prevenção e o tratamento da PCM experimental.

Outra possibilidade vacinal, igualmente moderna, foi testada com excelentes resultados. A isso se refere a utilização de células dendríticas. Tendo isso em consideração, camundongos que receberam células dendríticas pulsadas com o peptídeo antes (via subcutânea) e depois (via subcutânea e intravenosa) da infecção intratraqueal com *P. brasiliensis*, levou à redução da carga fúngica nos pulmões. Os níveis de IFN- γ e IL-12 foram aumentados ao tempo que houve uma redução na produção de IL-10 e IL-4, em comparação com os grupos de animais não imunizados e àqueles que não foram tratados com as células pulsadas (Magalhães *et al.*, 2012).

A utilização terapêutica de células dendríticas pulsadas com o P10 também mostrou-se efetiva em reduzir a carga fúngica pulmonar em camundongos da linhagem BALB/c e B10.A imunossuprimidos com dexametasona e infectados com *P. brasiliensis* (Silva, 2014). Além disso, os animais assim tratados mostraram um parênquima pulmonar mais preservado e um padrão de resposta imune misto Th1/Th2.

A administração convencional de vacina por via subcutânea também é efetiva e mostra que o peptídeo P10 associado ao lipídio catiônico DODAB é uma excelente combinação vacinal contra PCM (Mayorga *et al.*, 2012). Além disso, a administração da vacina por via nasal também pode ser realizada, e a combinação do P10 mais flagelina, potente ativador de TLR-5, mostrou resultados contundentes (Braga *et al.*, 2009).

A atividade imuno-ativadora do peptídeo P10 associado a flagelina foi capaz de reduzir o crescimento metastático de um tipo de melanoma em camundongos (de Melo *et al.*, 2015). Assim, sugere-se que o peptídeo P10 como um importante imunomodulador, abrindo maiores perspectivas de sua utilização em outras doenças.

REFERÊNCIAS*

- Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *International Immunology*, 2011;23(5): 317–26.
- Acorci-Valério MJ, Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, de Assis Golim M, Nakaira-Takahagi E, de Campos Soares ÂMV. Role of TLR2 and TLR4 in Human Neutrophil Functions Against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2010;71(2): 99–108.
- Acorci MJ, Dias-Melicio LA, Golim MA, Bordon-Graciani AP, Peraçoli MTS, Soares ÂMVC. Inhibition of Human Neutrophil Apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: Role of Interleukin-8. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2009; 69(2): 73–9.
- Almeida OP, Jorge Junior J, Scully C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Critical reviews in oral biology and medicine*, 2003; 14(4): 268–74.
- Alves da Costa T, Di Gangi R, Martins P, et al. Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice treated with modulated dendritic cells relies on inhibition of interleukin-10 production by CD8⁺ T cells. *Immunology*, 2015; 146(3): 486–95.
- Amaral EP, Ribeiro SCM, Lanes VR, et al. Pulmonary Infection with Hypervirulent Mycobacteria Reveals a Crucial Role for the P2X7 Receptor in Aggressive Forms of Tuberculosis. *PLoS Pathogens*, 2014; 10(7): e1004188.
- Araújo VC, Demasi APD, Soares AB, et al. Neutrophils in Oral Paracoccidioidomycosis and the Involvement of Nrf2. *PLoS ONE*, 2013; 8(10): e76976.
- Bachiega TF, Dias-Melicio LA, Fernandes RK, et al. Participation of dectin-1 receptor on NETs release against *Paracoccidioides brasiliensis*: Role on extracellular killing. *Immunobiology*, 2015; 221: 228–35.
- Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Publishing Group*, 2010;10(11): 787–96.
- Bagagli E, Bosco SMG, Theodoro RC, Franco M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infection, Genetics and Evolution*, 2006; 6(5): 344–51.
- Bagagli E, Franco M, Bosco SDMG, Hebel-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Medical mycology*, 2003; 41(3): 217–23.
- Bagagli E, Theodoro RC, Bosco, SMG, McEwen JG. *Paracoccidioides brasiliensis*:

** De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia*, 2008;165(4–5): 197–07.

Baida H, Biselli PJC, Juvenale M, et al. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infection*, 1999; 1(4): 273–78.

Balderramas HA, Penitenti M, Rodrigues DR, et al. Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. *Cytokine*, 2014; 67(1): 36–43.

Barrozo LV, Benard G, Silva MES, Bagagli E, Marques SA, Mendes RP. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2010; 4(3): 2–5.

Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Silva MES, Bagagli E, Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *International Journal of Epidemiology*, 2009; 38(6): 1642–49.

Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, 2008;165(4–5): 209–21.

Benard G, Hong MA, Del Negro GMB, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJS. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1996; 54(1): 7–12.

Benard G, Mendes-Giannini MJ, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJ. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *The Journal of infectious diseases*, 1997; 175(5): 1263–67.

Bernardino S, Pina A, Felonato M, et al. TNF- α and CD8+ T Cells Mediate the Beneficial Effects of Nitric Oxide Synthase-2 Deficiency in Pulmonary Paracoccidioidomycosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013; 7(8): e2325.

Bethlem EP, Capone D, Maranhao B, Carvalho CRR, Wanke B. Paracoccidioidomycosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 1999; 5(5): 319–25.

Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000; 38(8): 2940–42.

Bittencourt JIM, Oliveira RM de, Coutinho ZF. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. *Cadernos de Saúde Pública*, 2005; 21(6): 1856–64.

Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, et al. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *Journal of immunology*, 1998; 161(6): 3056–63.

Bonfim CV, Mamoni RL, Lima Blotta MHS. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology*, 2009; 47(7): 722–33.

Braga CJM, Rittner GMG, Munoz Henao JE, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* Vaccine Formulations Based on the gp43-Derived P10 Sequence and the Salmonella enterica FliC Flagellin. *Infection and Immunity*, 2009;77(4): 1700–07.

Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature Immunology*, 2014; 15(11): 1017–25.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical microbiology reviews*, 1993; 6(2): 89–117.

Buitrago MJ, Merino P, Puente S, et al. Utility of real-time PCR for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA in the diagnosis of imported paracoccidioidomycosis. *Medical mycology*, 2009; 47(8): 879–82.

Burger E, Vaz CCA, Sano A, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: Studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1996; 55(4): 391–98.

Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine*, 2011; 29(9): 1812–23.

Calich VLG, da Costa TA, Felonato M, et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*, 2008;165(4–5): 223–36.

Calich VLG, Pina A, Felonato M, et al. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2008; 53(1): 1–7.

Calich VL, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *British journal of experimental pathology*, 1985; 66(5): 585–94.

Camargo ZP, Berzaghi R, Amaral CC, Silva SH. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. *Medical mycology*, 2003; 41(6): 539–42.

Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol*, 2006; 177(9): 5811–18.

Chen F, Wu W, Millman A, et al. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nature immunology*, 2014; 15(10): 938–46.

Chiarella AP, Arruda C, Pina A, Costa TA, Ferreira RCVV, Calich VLG G. The relative importance of CD4+ and CD8+T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infection*, 2007; 9(9): 1078–88.

Schauer C, Janko C, Munoz LE, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nature Medicine*, 2014; 20(5): 511–17.

Corredor GG, Castaño JH, Peralta LA, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Revista iberoamericana de micología*, 1999; 16(4): 216–20.

Coutinho ZF, Da Silva D, Lazera M, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude*, 2002;18(5): 1441–54.

Da Silva FC, Svidzinski TIE, Patussi EV, Cardoso CP, De Oliveira Dalalio MM, Hernandes L. Morphologic organization of pulmonary granulomas in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2009; 80(5): 798–04.

Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007; 83(1): 64–70.

de Almeida, SM, Queiroz-Telles F, Doi EM, Ono M, Werneck LC. Anti-gp43 Antibodies in the Cerebrospinal Fluid of Patients With Central Nervous System Involvement by Paracoccidioidomycosis. *American Journal of Clinical Pathology*, 2002; 118(6): 864–68.

de Amorim J, Magalhães A, Muñoz JE, Rittner GMG, Nosanchuk JD, Travassos LR, Taborda CP. DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis induces long-term protection in presence of regulatory T cells. *Microbes and Infection*, 2013;15(3): 181–91.

De Camargo, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, 2008; 165(4–5): 289–302.

de Farias MR, Zeni Condas LA, Ribeiro MG, et al. Paracoccidioidomycosis in a Dog: Case Report of Generalized Lymphadenomegaly. *Mycopathologia*, 2011; 172(2): 147–52.

de Melo FM, Braga CJ, Pereira FV, et al. Anti-metastatic immunotherapy based on mucosal administration of flagellin and immunomodulatory P10. *Immunology and cell biology*, 2015; 93(1): 86–8.

De Oliveira HC, Assato PA, Marcos CM, et al. Paracoccidioides-host interaction: An overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. *Frontiers in Microbiology*, 2015; 6(NOV): 1–20.

de Oliveira LL, Coltri KC, Barros Cardoso CR, Roque-Barreira MC, Panunto-Castelo A. T helper 1-inducing adjuvant protects against experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2008; 2(3): 1–5.

Del Negro GMB, Pereira CN, Andrade HF, et al.. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. *Journal of Medical Microbiology*, 2000; 49(1): 37–46.

Della Coletta AM, Bachiega TF, de Quaglia e Silva JC, et al. Neutrophil Extracellular Traps Identification in Tegumentary Lesions of Patients with Paracoccidioidomycosis and Different Patterns of NETs Generation In Vitro. *PLoS Neglected Tropical*

Diseases, 2015; 9(9): 1–19.

Dias MFRG, Filgueira AL, de Souza W. A morphological and cytochemical study of the interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and neutrophils. Microscopy and microanalysis, 2004; 10: 215–23.

Do Valle AC, Costa RL, Fialho Monteiro PC, Von Helder J, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. Medical mycology, 2001; 39(4): 373–77.

Elias Costa MR, Da Silva Lacaz C, Kawasaki M, De Camargo ZP. Conventional versus molecular diagnostic tests. Medical Mycology, 2000; 38 (1): 139–45.

Fabris LR, Andrade ÚV, Santos AF, et al. Decreasing prevalence of the acute/subacute clinical form of paracoccidioidomycosis in mato grosso do sul state, brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2014; 56(2): 121–25.

Ferioti C, Bazan SB, Loures FV, Araújo EF, Costa TA, Calich VLG. Expression of dectin-1 and enhanced activation of NALP3 inflammasome are associated with resistance to paracoccidioidomycosis. Frontiers in Microbiology, 2015; 6(SEP): 1–13.

Franco L, Najvar L, Gomez BL, Restrepo S, Graybill JR, Restrepo A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. The American journal of tropical medicine and hygiene, 1998; 58(4): 424–30.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS. Paracoccidioidomycosis: A Recently Proposed Classification of Its Clinical Forms. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1987; 20(2): 129–32.

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. Journal of Cell Biology, 2007; 176(2): 231–41.

Goihman-Yahr M, Essenfled-Yahr E, de Albornoz MC, et al. Defect of in vitro digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. Infection and immunity, 1980; 28(2): 557–66.

Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, de Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. Journal of clinical microbiology, 2000; 38(9): 3478–80.

Gonzalez A. Innate Immune Response to the Dimorphic Fungal Pathogen Coccidioides: Molecular and Cellular Mechanisms. Journal of Clinical and Cellular Immunology, 2013.

Gonzalez A, De Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. Infection and Immunity, 2000; 68(5): 2546–52.

González A, Restrepo A, Cano LE. Pulmonary immune responses induced in BALB/c mice by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. Mycopathologia, 2008; 165(4–5): 313–30.

Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract

of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia*, 1965; 4(2): 124–5.

Hahn RC, Morato Conceição YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan JS. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses*, 2003; 46(8): 342–47.

Hebeler-Barbosa F, Morais FV, Montenegro MR, et al. Comparison of the Sequences of the Internal Transcribed Spacer Regions and PbGP43 Genes of *Paracoccidioides brasiliensis* from Patients and Armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Journal of Clinical Microbiology*, 2003; 41(12): 5735–37.

Herr R, Tarcha E, Taborda P, et al. Phylogenetic Analysis of *Lacazia loboi* Places This Previously Uncharacterized Pathogen within the Dimorphic Onygenales. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001; 39(1): 309–14.

Iwai LK, Yoshida M, Sidney J, et al. In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* frequently recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized ind. *Molecular medicine*, 2003; 9(9–12): 209–19.

Jee J, Bonnegarde-Bernard A, Duverger A, et al. Neutrophils negatively regulate induction of mucosal IgA responses after sublingual immunization. *Mucosal Immunology*, 2015; 8(4): 735–45.

Lincopan N, Espíndola NM, Vaz AJ, Costa MHB da, Faquim-Mauro E, Carmona-Ribeiro, A. M. Novel immunoadjuvants based on cationic lipid: Preparation, characterization and activity in vivo. *Vaccine*, 2009; 27(42): 5760–71.

Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1983; 80(24): 7659–63.

Loures FV, Pina A, Felonato M, Araújo EF, Leite KRM, Calich VLG. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. *Infection and Immunity*, 2010; 78(3): 1078–88.

Loures FV, Pina A, Felonato M, Calich VLG. TLR2 Is a Negative Regulator of Th17 Cells and Tissue Pathology in a Pulmonary Model of Fungal Infection. *The Journal of Immunology*, 2009; 183(2): 1279–90.

Low CY, Rotstein C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Medicine Reports*, 2011; 3.

Magalhães A, Ferreira KS, Almeida SR, Nosanchuk JD, Travassos LR, Taborda CP. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2012; 19(1): 23–9.

Marques-Da-Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, et al. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by detection of antigen and antibody in bronchoalveolar lavage fluids. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2006; 13(12): 1363–66.

Marques AF, da Silva MB, Juliano MAP, Munhõz JE, Travassos LR, Taborda CP. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infection*, 2008;10(12–13): 1251–58.

Marques AF, Da Silva, MB, Juliano MAP, Travassos LR, Taborda CP. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006; 50(8): 2814–19.

Martinez R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2015; 57:11–20.

Matute DR. Cryptic Speciation and Recombination in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as Revealed by Gene Genealogies. *Molecular Biology and Evolution*, 2005; 23(1): 65–73.

Mayorga O, Muñoz JE, Lincopan N, et al. The role of adjuvants in therapeutic protection against paracoccidioidomycosis after immunization with the P10 peptide. *Frontiers in Microbiology*, 2012; 3.

McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host and Microbe*, 2012;12(3): 324–33.

Mejía SP, Cano LE, López JA, Hernandez O, González Á. Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides Brasiliensis*. *Microbiology*, 2015; 161: 1008–17.

Mistreta T, Souza MJ, Chamma LG, Pinho SZ, Franco M. Serology of paracoccidioidomycosis. I. Evaluation of the indirect immunofluorescent test. *Mycopathologia*, 1985; 89(1): 13–7.

Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of experimental medicine*, 2013; 210(7): 1283–99.

Moreto TC, Marques MEA, de Oliveira MLSC, Moris DV, de Carvalho L R, Mendes RP. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2011; 105(8): 473–78.

Mota NG, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MT, et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1985; 79(6): 765–72.

Naranjo TW, Lopera DE, Diaz-Granados LR, Duque JJ, Restrepo MA, Cano LE. Combined itraconazole-pentoxifylline treatment promptly reduces lung fibrosis induced by chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in mice. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2011; 24(1): 81–91.

Negróni R. Paracoccidioidomycosis (south american blastomycosis, lutz's mycosis). *International Journal of Dermatology*, 1993; 32(12): 847–59.

Peraçoli MTS, Kurokawa CS, Calvi SA, et al. Production of pro- and anti-

inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infection*, 2003; 5(5): 413–18.

Pina A, Hila P, Saldiva N, Elena L, Restrepo C, Calich VLG. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006; 79(6): 1202–13.

Pino-Tamayo PA, Puerta-Arias JD, Lopera D, Urán-Jiménez ME, González Á. Depletion of Neutrophils Exacerbates the Early Inflammatory Immune Response in Lungs of Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mediators of Inflammation*, 2016; 1–17.

Prado M, da Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: A review from 1996 to 2006. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009; 104(3): 513–21.

Puerta-Arias JD, Pino-Tamayo PA, Arango JC, Gonzalez A. Depletion of neutrophils promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS ONE*, 2016; 11(9): 1–23.

Queiroz-Telles F, Escuissato D. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2011; 32(6): 764–74.

Reeves EP, Nagl M, Godovac-Zimmermann J, Segal AW. Reassessment of the microbicidal activity of reactive oxygen species and hypochlorous acid with reference to the phagocytic vacuole of the neutrophil granulocyte. *Journal of Medical Microbiology*, 2003; 52(8): 643–51.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*, 1985; 23(5): 323–34.

Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Medical mycology*, 2001; 39(3): 233–41.

Rittner GMG, Muñoz JE, Marques AF, Nosanchuk JD, Taborda CP, Travassos LR. Therapeutic DNA Vaccine Encoding Peptide P10 against Experimental Paracoccidioidomycosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2012; 6(2): e1519.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 2011; 11(4): 275–88.

Romani L, Puccetti P. Controlling pathogenic inflammation to fungi. *Expert review of anti-infective therapy*, 2007; 5(6): 1007–17.

Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infection and Immunity*, 1988; 56(3): 711–13.

San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Medical mycology*, 2002; 40(3): 225–42.

Santos PC, Santos DA, Ribeiro LS, et al. The Pivotal Role of 5-Lipoxygenase-Derived LTB₄ in Controlling Pulmonary Paracoccidioidomycosis. *PLoS Neglected*

Tropical Diseases, 2013; 7(8).

Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycosis Treatment. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 2015; 57(1): 31–7.

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso em paracoccidioidomicose. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2006; 39(3): 297–310.

Silva DF, Assis CM, Zamboni IM, Barreto LC, Kohara VS, Vicentini-Moreira AP. Use of immunoblotting assay improves the sensitivity of paracoccidioidomycosis diagnosis. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2008; 14(2): 313–21.

Singer-Vermes, L. M., Sakamoto TN, Vaz CA, Calich VL. (1995). Influence of the genetic pattern and sex of mice in experimental paracoccidioidomycosis. Clinical and experimental immunology, 1995; 101(1): 114–20.

Souza AR, Gesztesi JL, Moraes JZ, et al. Evidence of idiotypic modulation in the immune response to gp43, the major antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in both mice and humans. Clinical and Experimental Immunology, 1998; 114(1): 40–8.

Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, Franco M, Travassos LR. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. Infection and Immunity, 1998; 66(2): 786–93.

Taborda CP, Urán ME, Nosanchuk JD, Travassos LR. Paracoccidioidomycosis: Challenges in the Development of a Vaccine Against an Endemic Mycosis in the Americas. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2015; 57(1): 21–4.

Teixeira MDM, Theodoro RC, Oliveira FFM, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. Medical Mycology, 2013; 1–10.

Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Felipe MSS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009; 52(2): 273–83.

Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. BMC microbiology, 2007; 7(1): 92.

Tessarolli V, Gasparoto TH, Lima HR, et al. Absence of TLR2 influences survival of neutrophils after infection with *Candida albicans*. Medical Mycology, 2010; 48(1): 129–40.

Theodoro RC, Teixeira MDM, Felipe MSS, et al. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. PLoS ONE, 2012; 7(5): e37694.

Thomas CJ, Schroder K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. Trends in Immunology, 2013; 34(7): 317–28.

Trejo-Chávez A, Ramírez-Romero R, Ancer-Rodríguez J, Nevárez-Garza AMM, Rodríguez-Tovar LEE. Disseminated Paracoccidioidomycosis in a Southern Two-Toed Sloth (*Choloepus didactylus*). Journal of Comparative Pathology, 2011; 144(2–3): 231–34.

Trentini MM, de Oliveira FM, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. The Role of Neutrophils in the Induction of Specific Th1 and Th17 during Vaccination against Tuberculosis. Frontiers in Microbiology, 2016; 7(6): 1–13.

Untereiner WA, Scott JA, Naveau FA, Sigler L, Bachewich J, Angus A. The Ajellomycetaceae, a New Family of Vertebrate-Associated Onygenales. Mycologia, 2004; 96(4): 812.

Urban CF, Lourido S, Zychlinsky A. How do microbes evade neutrophil killing? Cellular Microbiology, 2006; 8(11): 1687–96.

Urban CF, Reichard U, Brinkmann ., Zychlinsky A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. Cellular Microbiology, 2006; 8(4): 668–76.

Verli FD, Marinho SA., Souza SC, Figueiredo MAZ, Yurgel LS. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2005; 38(3): 234–37.

Vieira G de D, Alves T da C, Lima SMD, Camargo LMA, Sousa CM de. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2014; 47(1): 63–8.

Vilela R, Bossart GD, St. Leger JA, et al. Cutaneous granulomas in dolphins caused by Novel uncultivated *Paracoccidioides brasiliensis*. Emerging Infectious Diseases, 2016; 22(12): 2063–69.

Wojtasiak M, Pickett DL, Tate MD, et al. Depletion of Gr-1+, but not Ly6G+, immune cells exacerbates virus replication and disease in an intranasal model of herpes simplex virus type 1 infection. Journal of General Virology, 2010; 91(9): 2158–66.

Yang CW, Strong BSI, Miller MJ, Unanue ER. Neutrophils Influence the Level of Antigen Presentation during the Immune Response to Protein Antigens in Adjuvants. The Journal of Immunology, 2010; 185(5): 2927–34.