

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

MARCELLY MARIA DOS SANTOS BRITO

**Morfologia, virulência e perfil genético de
Paracoccidioides brasiliensis:
Avaliação pré e pós-passagem em modelo
murino de isolados provenientes de forma clínica
crônica humana da paracoccidioidomicose**

RIO DE JANEIRO

2012

**Morfologia, virulência e perfil genético de *Paracoccidioides brasiliensis*:
Avaliação pré e pós-passagem em modelo murino de isolados
provenientes de forma clínica crônica humana da paracoccidioidomicose**

MARCELLY MARIA DOS SANTOS BRITO

Tese apresentada ao curso de Pós Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Cintia Moraes Borba
Orientador: Dr. Rodrigo Caldas de Menezes

Rio de Janeiro

2012

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por me acolher nos momentos de dificuldade, por me mostrar o caminho quando todos os obstáculos pareciam intransponíveis e por me dar tantas oportunidades de ser uma pessoa melhor a cada dia.

À minha família e familiares por tudo que sou. AMO VOCÊS!
OBRIGADA POR TUDO!

Aos melhores orientadores que eu poderia ter: Dr^a. Cíntia de Moraes Borba e Dr. Rodrigo Caldas de Menezes.

À minha super orientadora, Cíntia, por toda a inspiração e todos os ensinamentos que conduziram a este trabalho. Obrigada por toda a confiança, paciência, sensibilidade, amizade e dedicação de longa data. Pelas broncas e palavras de incentivo que tanto me ajudaram a crescer durante esses anos. Por tudo que fez e, que tenho certeza, faria tantas outras vezes fosse necessário, e que me fizeram ter forças para não desistir: MUITO, MUITO, MUITO OBRIGADA!

Ao meu maravilhoso orientador, Dr. Rodrigo por todos os ensinamentos, pela paciência, confiança, dedicação e amizade. A quem sempre me ajudou, mesmo antes de ser orientador oficial: MUITO OBRIGADA! Seus ensinamentos e sua calma foram fundamentais nesta jornada.

À Dra. Rosane Christine Hanh pela gentileza de enviar os isolados utilizados neste trabalho.

Ao Dr. Marcelo Pelajo e toda a equipe do Serviço de Patologia do IOC, em especial a Luzia Caputo, por toda a ajuda e atenção.

À Fernanda e toda a equipe do Laboratório de Genética pela total disposição na ajuda com as fotos dos inúmeros géis.

À toda equipe da pós-graduação pela notável vontade de ajudar em todos os momentos. Em especial à Priscilla e ao Marcelo pela paciência, competência e carinho em todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos, em especial àqueles que foram mais que colegas: Érica, Camila, Cíntia, Daiana, Fernanda, Marcela e Roberta.

À amiga, e eficientíssima secretária, Cláudia Melo por toda a ajuda, paciência e torcida. Todos esses anos de convivência com você foram um privilégio. MUITO OBRIGADA por tudo!

À Rosemary, mais conhecida por Rose, pelo carinho, atenção, torcida e momentos de muitas risadas.

À Áurea por toda amizade, incentivo e ensinamentos. De sua “aluna torta” / agregada: MUITO OBRIGADA!

Às minhas companheiras de luta: Danielly, Mariana e Simone. Em especial a Dany e a Simone pelos momentos de desespero (poucos... rs!) e alegrias (muitos mesmo!); no final tudo se acerta. OBRIGADA pela amizade!

À Tatielle e Gabriela pela amizade, companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho e por toda a ajuda. Meu aprendizado não seria o mesmo sem vocês. OBRIGADA!

À Márcia Lopez por toda a atenção, paciência e dicas tão preciosas.

Às minhas irmãs de coração Ana Paula e Luciana, minhas terapeutas preferidas. OBRIGADA pelo incentivo, paciência, torcida e amor.

Aos meus queridos amigos Everton, Fernanda, Mônica, Renata e Osana que mesmo de longe estão sempre torcendo por mim. Adoro vocês!

Aos meus pequenos amores que alegam a minha vida: Ana Carolina, Felipe, Gabriel, Jennifer, Manuela, Milena e Pedro, que mesmo sem saber, sempre recarregaram minha força.

A todos os amigos por entenderem a minha ausência neste período e estarem sempre torcendo por mim. Adoro todos vocês!

À Fiocruz: IPEC e IOC pelo apoio financeiro.

Enfim, a todas as pessoas maravilhosas que este trabalho me permitiu conhecer.

***“O rio atinge seus objetivos, porque
aprendeu a contornar obstáculos”.***

Lao-Tsé

Brito, M.M.S. **Morfologia, virulência e perfil genético de *Paracoccidioides brasiliensis*: Avaliação pré e pós-passage em modelo murino de isolados provenientes de forma clínica crônica humana da paracoccidioidomicose** Rio de Janeiro, 2012. 99f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.

RESUMO

Estudos sobre os aspectos morfológicos, genéticos e de virulência, inerentes ao *Paracoccidioides brasiliensis* antes e depois da interação com hospedeiro experimental são de grande importância para. Oito isolados avaliados não apresentaram diferenças macro e micromorfológicas pós-passage em animal quando comparadas a morfologia pré-passage. Entretanto eles diferiram entre si em relação à micromorfologia, *in vitro*, com diferenças na gemulação e presença de filamentos à temperatura de 36°C. Em relação à virulência, segundo os critérios adotados, índice esplênico, reisolamento de células fúngicas, lesões em diferentes órgãos e taxa de sobrevivência, o isolado Pb235CRS foi considerado o mais virulento; os isolados Pb261, Pb31MAS, Pb285, Pb246, Pb281 apresentaram virulência intermediária e os isolados Pb29EE e Pb639 foram os menos virulentos. A genotipagem por RAPD dos isolados demonstrou modificações no perfil de bandas do DNA após interação com o hospedeiro animal, aos 100 dias da inoculação, porém não foi possível correlacionar esses dados com os demais obtidos. Os resultados obtidos em nosso estudo apontam que diferenças entre isolados existem e podem interferir na evolução da doença.

Palavras chaves: *Paracoccidioides brasiliensis*, morfologia, virulência, perfil genético, RAPD.

Brito, M.M.S. **Morphology, virulence and genetic profile of *Paracoccidioides brasiliensis*: Evaluation pre and post passage in murine model of isolates from human chronic clinical forms of paracoccidioidomycose.** Rio de Janeiro, 2012. 99f. Thesis [Doctorate in Clinical Research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.

ABSTRACT

Studies of aspects inherent to *Paracoccidioides brasiliensis*, especially before and after the interaction with the experimental host are of importance to extend the knowledge about its pathogenesis. Morphology, genetic profile and virulence of eight strains of *P. brasiliensis* isolated from patients with chronic form of disease from Mato Grosso state were evaluated before and after passage in experimental murine model. Eight isolates evaluated did not show macro and micromorphological differences after animal passage when compared to pré-animal passage. However, differences among them were observed in relation to presence of yeast and filament forms, *in vitro*, at 36°C. Evaluation of virulence, in accordance with the criteria used, splenic index, fungal cells recovered, lesions in different organs and survival rate, showed that Pb235CRS was the most virulent isolate; Pb261, P31MAS, Pb285, Pb246, Pb281 had intermediate virulence and Pb639, Pb29EE were the less virulent isolates. Genotyping by RAPD of these isolates showed changes in the profile of DNA after 100 days of interaction with the animal host. It was not possible to correlate the data from morphology, genotyping and virulence. The results obtained in our study pointed out differences among isolates that may interfere with the disease evolution.

Key words: *P. brasiliensis*, morphology, virulence, genetic profile, RAPD.

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1. Aspectos morfológicos dos isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , pré e pós-passagem em animal, cultivados em meio PYG ágar, a 36°C.	27
Tabela 2. Variação de peso (gramas) dos camundongos, inoculados com oito isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , aos 100 e 200 dias de inoculação.	29
Tabela 3. Aspecto macroscópico observado durante a necropsia dos camundongos, inoculados com oito isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , aos 100 e 200 dias de inoculação.	31
Tabela 4. Índice esplênico dos camundongos inoculados com isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e PBS.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Macromorfologia. Colônias de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> pré-passagem em animal, cultivadas em meio PYG ágar, a 36°C, por 10 dias. A - Pb235CRS; B – Pb281 e C – Pb31MAS.	25
Figura 2. Micromorfologia. <i>Paracoccidioies brasiliensis</i> , isolado Pb639, apresentando grande número de células leveduriformes com brotamentos (→), após crescimento em meio PYG ágar, a 36°C. (aumento original 400x).	26
Figura 3. Micromorfologia. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , isolado Pb235CRS, apresentando células leveduriformes e filamentos delicados (→), após crescimento em meio PYG, a 36°C (aumento original 400x).	26
Figura 4. Observação macroscópica de lesões. Camundongo inoculado com <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , isolado Pb235CRS, apresentando diversas lesões granulomatosas (→) na cavidade torácica e abdominal.	30
Figura 5. Tempo de sobrevivência dos camundongos inoculados. Percentual cumulativo de sobrevivência dos camundongos inoculados, intravenosamente, com 10 ⁵ células viáveis de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> aos 200 dias de observação. *P=0,0007	33

Figura	Página
Figura 6. Corte histológico de diafragma de camundongo, aos 100 dias de inoculação com <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , isolado Pb235CRS. Tecido apresentando processo inflamatório piogranulomatoso com riqueza de células leveduriformes (→). PAS (aumento original 630X).	36
Figura 7. Corte histológico de coração de camundongo, aos 100 dias de inoculação com <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , isolado Pb285. Tecido cardíaco apresentando processo inflamatório granulomatoso com estruturas fúngicas leveduriformes (→). PAS (aumento original 630X).	36
Figura 8. Corte histológico de diafragma de camundongo, aos 100 dias de inoculação com <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , isolado Pb281. Tecido apresentando processo inflamatório piogranulomatoso com riqueza de células leveduriformes (→). PAS (aumento original 630X).	36
Figura 9. Corte histológico de pulmão de camundongo, aos 100 dias de inoculação com <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , isolado Pb639. Tecido pulmonar sem alterações. HE (aumento original 400X).	37
Figura 10. Número de células de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> recuperadas de fragmentos do baço de camundongos inoculados com os isolados estudados. Cada coluna representa a média de UFC recuperada de fragmentos do baço de três camundongos eutanasiados aos 100 dias de inoculação, com exceção dos isolados Pb29EE e Pb639 (aos 60 dias de inoculação). * $P < 0,05$.	40

Figura	Página
Figura 11. Número de células de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> recuperadas de um lobo do pulmão de camundongos inoculados com os isolados estudados. Cada coluna representa a média de UFC recuperada de um lobo do pulmão de três camundongos eutanasiados aos 100 dias de inoculação, com exceção dos isolados Pb29EE e Pb639 (aos 60 dias de inoculação). * $P < 0,05$.	41
Figura 12. Número de células de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> recuperadas de fragmentos do fígado de camundongos inoculados com os isolados estudados. Cada coluna representa a média de UFC recuperada de fragmentos do fígado de três camundongos eutanasiados aos 100 dias de inoculação, com exceção dos isolados Pb29EE e Pb639 (aos 60 dias de inoculação). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,05$.	42
Figura 13. Número de células de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> recuperadas do rim de camundongos inoculados com os isolados estudados. Cada coluna representa a média de UFC recuperada do rim de três camundongos eutanasiados aos 100 dias de inoculação, com exceção dos isolados Pb29EE e Pb639 (aos 60 dias de inoculação). * $P < 0,05$.	43
Figura 14. Comparação em gel de agarose 2,5%, dos perfis de fragmentos de DNA amplificados por RAPD-PCR dos isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> pré (A) e pós-passagem (B) em animal utilizando o <i>primer</i> 2. Linha 1: BL21- controle (<i>E. coli</i>); Linha 2: Pb261; Linha 3: Pb285; Linha 4: Pb235CRS; Linha 5: Pb281; Linha 6: Pb246; Linha 7: Pb639; Linha 8: Pb31MAS; linha 9: Pb29EE. Os números à direita e à esquerda indicam o marcador de peso molecular (PM): 100bp DNA Ladder. Setas (gel B) destacando bandas que apareceram após passagem em animal.	46

Figura	Página
<p>Figura 15. Comparação em gel de agarose 2,5%, dos perfis de fragmentos de DNA amplificados por RAPD-PCR dos isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> pré (A) e pós-passagem (B) em animal utilizando o <i>primer</i> 4. Linha 1: BL21- controle (<i>E. coli</i>); Linha 2:Pb261; Linha 3: Pb285; Linha 4: Pb235CRS; Linha 5: Pb281; Linha 6: Pb246; Linha 7: Pb639; Linha 8: Pb31MAS; linha 9: Pb29EE. Os números à direita e à esquerda indicam o marcador de peso molecular (PM): 100bp DNA Ladder. Setas (gel B) destacando bandas que apareceram após passagem em animal.</p>	47
<p>Figura 16. Comparação em gel de agarose 2,5%, dos perfis de fragmentos de DNA amplificados por RAPD-PCR dos isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> pré (A) e pós-passagem (B) em animal utilizando o <i>primer</i> 6. Linha 1: BL21- controle (<i>E. coli</i>); Linha 2:Pb261; Linha 3: Pb285; Linha 4: Pb235CRS; Linha 5: Pb281; Linha 6: Pb246; Linha 7: Pb639; Linha 8: Pb31MAS; linha 9: Pb29EE. Os números à direita e à esquerda indicam o marcador de peso molecular (PM): 100bp DNA Ladder. Setas (gel B) destacando bandas que apareceram após passagem em animal.</p>	48
<p>Figura 17. Dendrograma baseado em perfis de amplificação de DNA dos oito isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>, pré-passagem em animal, por RAPD-PCR com o <i>primer</i> 2. Quatro grupos (a, b, c, d) foram destacados considerando 76% de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA.</p>	51

Figura	Página
Figura 18. Dendrograma baseado em perfis de amplificação de DNA dos oito isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , pós-passagem em animal, por RAPD-PCR com o <i>primer</i> 2. Cinco grupos (a, b, c, d, e) foram destacados considerando 76% de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA.	52
Figura 19. Dendrograma baseado em perfis de amplificação de DNA dos oito isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , pré-passagem em animal, por RAPD-PCR com o <i>primer</i> 4. Seis grupos (a, b, c, d, e, f) foram destacados considerando 76% de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA.	53
Figura 20. Dendrograma baseado em perfis de amplificação de DNA dos oito isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , pós-passagem em animal, por RAPD-PCR com o <i>primer</i> 4. Seis grupos (a, b, c, d, e, f) foram destacados considerando 76% de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA.	54
Figura 21. Dendrograma baseado em perfis de amplificação de DNA dos oito isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , pré-passagem em animal, por RAPD-PCR com o <i>primer</i> 6. Cinco grupos (a, b, c, d, e) foram destacados considerando 76% de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA.	55

Figura	Página
Figura 22. Dendrograma baseado em perfis de amplificação dos oito isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , pós-passagem em animal, por RAPD-PCR com o primer 6. Sete grupos (a, b, c, d, e, f, g) foram destacados considerando 76% de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA.	56

SIGLAS E ABREVIATURAS UTILIZADAS

bp*	Pares de base
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
CO ₂	Gás carbônico
DNA*	Ácido desoxirribonucléico
dNTP*	Desoxinucleosídeo trifosfato
DTH*	Reação de hipersensibilidade tardia
EDTA*	Acido etilenodiamino tetraacético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
gp43	Glicoproteína de 43 kDa
HE	Hematoxilina-Eosina
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
iv	Intravenosa
kDa	103 Daltons
LAMP	Circuito de amplificação mediada isotérmica
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
Log	Logaritmo
L	Leveduriforme
M	Micelial
PAS	Ácido periódico de Schiff
Pb	<i>Paracoccidoides brasiliensis</i>
PBS*	Solução tamponada com fosfato
PCM	Paracoccidiodomicose
PCR*	Reação de polimerase em cadeia
PS*	Espécie filogenética
PYG	Meio de cultura (peptona+ extrato de levedura+ glicose)
RAPD*	DNA polimórfico amplificado ao acaso

RFLP*	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
RT-PCR*	Reação de polimerase em cadeia em tempo real
S*	Espécie
SSR*	Sequências repetitivas simples
SH	Radical sulfidrila
TAE	Tris base+ ácido acético glacial + EDTA
UF	Unidades fúngicas
UFC	Unidade formadora de colônia
UPGMA*	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>

* Abreviaturas em inglês

As unidades de medidas utilizadas no texto seguem a nomenclatura do Sistema Internacional de Unidades (SI).

SUMÁRIO

1. Introdução	
1.1. Paracoccidioidomicose	1
1.2. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	5
1.3. Morfologia do fungo	7
1.4. Virulência	8
1.5. Perfil genético	13
2. Justificativa	15
3. Objetivos	
31. Objetivo geral	16
32. Objetivos específicos	16
4. Metodologia	
4.1. Morfologia	
4.1.1. Isolados	17
4.1.2. Macro e micromorfologia	17
4.2. Virulência	
4.2.1. Preparo das suspensões celulares	17
4.2.2. Animais e inoculação experimental	18
4.2.3. Necropsia e histopatologia	19
4.2.4. Determinação do índice esplênico	20
4.2.5. Unidade formadora de colônias	20
4.3. Genotipagem	
4.3.1. Extração e quantificação do DNA	20
4.3.2. RAPD-PCR	22
4.3.3. Perfis de fragmentos de DNA	22

4.4. Estatística	23
5. Resultados	
5.1. Análise morfológica	
5.1.1. Macromorfologia pré e pós-passagem em animal	24
5.1.2. Micromorfologia pré e pós-passagem em animal	25
5.2. Análise da virulência	
5.2.1. Infecção experimental	28
5.2.2. Sobrevivência	32
5.2.3. Análise histopatológica	34
5.2.4. Índice esplênico	37
5.2.5. Reisolamento de células fúngicas	39
5.3. Análise molecular	
5.3.1. Polimorfismo de DNA	44
6. Discussão	57
7. Conclusões	73
8. Referências	75
ANEXO	99

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B862

Brito, Marcellly Maria dos Santos

Morfologia, virulência e perfil genético de *Paracoccidioides brasiliensis*: avaliação pré e pós-passagem em modelo murino de isolados provenientes de forma clínica crônica humana da paracoccidioidomicose / Marcellly Maria dos Santos Brito. – Rio de Janeiro, 2012.

xviii, 99 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2012.

Bibliografia: f. 75-98

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Morfologia. 3. Virulência. 4. Perfil genético. 5. RAPD. I. Título.

CDD 579.5

1. INTRODUÇÃO

1.1- PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica endêmica mais prevalente na América Latina, principalmente no Brasil, causada por *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida 1930 (Fagundes-Pereyra *et al.*, 2006). Apresenta distribuição heterogênea, com áreas de alta e baixa endemicidade. Dados de inquéritos epidemiológicos com paracoccidioidina no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina, demonstraram que cerca de 50% da população rural de zonas endêmicas foram expostos ao agente da PCM, porém, uma pequena parte destes desenvolve alguma forma da doença (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A PCM foi descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz (1908), na cidade de São Paulo, depois de receber um paciente com lesão na mucosa oral. Após o cultivo do microrganismo, Lutz verificou que o fungo apresentava formas distintas em tecido e em cultura. Alfonso Splendore, em 1913, cultivando o agente etiológico da doença descrita por Lutz o denominou *Zymonema brasiliense* (Fonseca-Filho, 1939), denominação que perdurou até 1930, quando foi caracterizado por Almeida (1930) como sendo do gênero *Paracoccidioides* e da espécie *brasiliensis*. Essa doença já foi conhecida por vários nomes, como hyphoblastomycose pseudo-coccídica a blastomicose sul-americana. Somente em 1971, no “Primeiro Simpósio Pan Americano sobre Paracoccidioidomicose”, na cidade de Medellín foi definitivamente denominada como paracoccidioidomicose. Desde sua descrição vários autores a têm estudado sob o ponto de vista clínico, imunológico, anatomopatológico, evolutivo, epidemiológico e terapêutico (Viana, 1913; Fonseca-Filho, 1939; Lacaz *et*

al., 1982; Mussati, 1982; Restrepo, 1982; Franco *et al.*, 1982; Negroni, 1982; Londero, 1982; Negro 1982; Kerr *et al.*, 1988; Wanke & Londero, 1998; Bethlem *et al.*, 1999; Blotta *et al.*, 1999; Borgia *et al.*, 2000).

A PCM afeta os pulmões, sistema reticuloendotelial, áreas mucocutâneas e outros órgãos (Franco, 1987; Brummer *et al.*, 1993). Apresenta-se como uma doença predominantemente crônica granulomatosa, sendo esta a lesão resultante da reação de hipersensibilidade tardia (DTH) contra antígenos do fungo o que impede a disseminação deste pelo organismo promovendo sua contenção (Romani, 1997). Macrófago é a principal célula presente nos granulomas, com função de liberar substâncias microbidas (radicais superóxidos, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio), além da presença de plasmócitos, eosinófilos e fibroblastos (De Brito & Franco, 1994).

A via respiratória baixa é a porta de entrada da infecção natural (Palmeiro *et al.*, 2005). Experimentos realizados com animais infectados com conídios de *P. brasiliensis* por via inalatória, mostraram que os camundongos apresentaram uma doença progressiva com disseminação para outros órgãos, sugerindo que humanos podem adquirir a infecção pela mesma via (McEwen *et al.*, 1987). Assim, subsequente a inalação de conídios, ocorre o desenvolvimento do complexo primário pulmonar que na dependência de uma série de fatores, como fatores do hospedeiro, virulência fúngica e condições ambientais, pode ser eliminado, evoluir para doença (aguda ou crônica) ou para um estado de equilíbrio agente-hospedeiro (foco quiescente com fungos viáveis) (Severo *et al.*, 1979; Marques *et al.*, 2007; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A PCM é descrita, principalmente, acometendo a população rural, que apresenta baixo nível sócio-econômico, altas taxas percentuais de subnutrição e

alcoolismo crônico (Franco, 1987). As atividades profissionais ligadas ao solo são fatores de risco significantes. Observa-se, em todas as casuísticas, que a maioria das pessoas afetadas exerceu atividade relacionada com o manejo de solo contaminado com o fungo nas duas primeiras décadas de vida, época em que provavelmente adquiriu a infecção. Todas as raças são susceptíveis, porém as formas mais graves da doença são vistas em imigrantes vindos de regiões não endêmicas (Franco, 1987).

De acordo com os sintomas clínicos da doença foram definidas: forma juvenil aguda (subaguda), predominante em crianças e adolescentes, caracterizada por uma história clínica de curta duração, em média de um a dois meses, de manifestações clínicas compatíveis com o envolvimento do sistema mononuclear fagocitário; e a forma adulta crônica, manifestação mais comum afetando adultos entre 30 e 60 anos, de instalação lenta e gradual ocasionando lesões pulmonares em mais de 90% dos adultos doentes podendo permanecer localizadas ou envolver mais de um órgão ou sistema (Franco, 1987; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Ambos os sexos são igualmente infectados por *P. brasiliensis*, no entanto a doença é mais frequente em homens do que em mulheres numa proporção em torno de 10 a 78:1 (Restrepo *et al.*, 1997) e é a oitava causa mais comum de morte entre as doenças infecto-parasitárias crônicas recorrentes no Brasil, superando inclusive a leishmaniose, com taxa de mortalidade de 1,45 por milhão de habitantes (Coutinho *et al.*, 2002).

O diagnóstico da PCM pode ser realizado através de diferentes métodos, como exame micológico direto, cultura de *P. brasiliensis*, exames sorológicos, histopatologia e técnicas moleculares por PCR (San-Blas & Niño-Vega, 2008). Testes sorológicos apresentam resultados mais rápidos quando comparados a

exames de cultura e histopatológicos, e são amplamente utilizados na confirmação da doença (Blotta, 1999). A glicoproteína de 43 kDa (gp43) é um antígeno exocelular secretado durante a fase de infecção por *P. brasiliensis*, e este antígeno é detectado em todas as formas clínicas de paracoccidiodomicose, reconhecido em diversos testes sorológicos (Marques da Silva *et al.*, 2003). No entanto, a cultura e a histopatologia são mais recomendados para o diagnóstico da doença. Através da biópsia evidencia-se um granuloma supurativo com células gigantes e blastosporos, estruturas como cistos, com aproximadamente 30 µm de diâmetro, geralmente seguidos por esporos filhos, e para evidenciação do fungo, são empregadas as colorações de nitrato de prata metenamina (Gromori-Groccott) e PAS (Palmeiro *et al.*, 2005). A inflamação granulomatosa durante a paracoccidiodomicose pode assumir padrões que se correlacionam com a resposta imunológica do hospedeiro (Camargo & Franco, 2000; Marques *et al.*, 2007), podendo representar uma resposta imune específica do tecido parasitado na tentativa de destruir ou formar uma barreira para impedir a multiplicação e disseminação do fungo. Os granulomas podem se apresentar de diferentes formas: granulomatoso-epitelióide (compacto ou frouxo), necrosante-exsudativo ou misto.

O diagnóstico rápido é essencial para a introdução de uma terapêutica eficaz. O tratamento geralmente é prolongado, com muitos pacientes recebendo a terapia por um ou dois anos. As drogas frequentemente usadas no tratamento incluem a anfotericina B, sulfamidas e derivados azólicos. Assim, o retardo no diagnóstico e na ausência de terapia com drogas a doença pode levar a sequelas graves e inclusive ao óbito (Valle *et al.*, 1998; Hahn *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2003; Santo, 2008).

1.2- *Paracoccidioides brasiliensis*

Segundo Kirk *et al.* (2008), o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é considerado anamórfico, pois não se conhece ainda sua forma sexuada. No entanto, estudos filogenéticos sugerem sua posição dentro do filo Ascomycota, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae, semelhante ao *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *H. capsulatum var. duboisii* (San-Blas *et al.*, 2002). Desde sua descrição, em 1930, *P. brasiliensis* era considerado uma espécie clonal, com reprodução assexuada exclusiva. Entretanto, há evidências que indicam a presença de recombinações, levando ao surgimento de espécies crípticas (Carvalho *et al.*, 2005; Hebeler-Barbosa *et al.*, 2003; Matute *et al.*, 2006). Espécies crípticas são duas ou mais espécies distintas classificadas como uma única espécie; essas espécies preenchem o critério biológico de “espécie”, ou seja, são reprodutivamente isoladas umas das outras, embora sejam morfológicamente idênticas; elas possuem discretas diferenças genéticas e podem ser separadas apenas por meio de estudos não-morfológicos, tais como análise de sequência de DNA (Bickford *et al.*, 2007; McKenna, 2007).

Um complexo contendo pelo menos três espécies crípticas dentro da espécie *P. brasiliensis* foi identificado por Matute *et al.* (2006): S1 (*species 1*) com 38 isolados do Brasil, Argentina, Paraguai, Peru ou Venezuela; PS2 (*phylogenetic species 2*) com cinco isolados do Brasil e um da Venezuela; e PS3 (*phylogenetic species 3*) com 21 isolados da Colômbia. Diferenças no potencial de virulência e na expressão gênica foram relatadas nos isolados do Brasil (S1 e PS2) e também, que essas duas espécies crípticas são capazes de produzir PCM em humanos e em tatus (Hebeler-Barbosa *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2005). Estudos com o isolado de

P. brasiliensis, denominado P01, demonstraram que o mesmo não se agrupa com os isolados dos três grupos filogenéticos propostos por Matute *et al.* (2006), apresentando significativas divergências genéticas frente os isolados desses grupos (Carrero *et al.*, 2008; Teixeira, 2008). Fato que corrobora com os estudos de Carrero *et al.* (2008) e Teixeira (2008) com os isolados Pb01 e “Pb01-like”, provenientes dos Estados de Goiás e Mato-Grosso, onde propuseram uma nova espécie filogenética para o fungo, com nome de *Paracoccidioides lutzii*, sugerido por Teixeira (2008). Idéia apoiada por Salgado-Salazar *et al.* (2010) que ao analisarem genes mitocondriais apoiaram a descrição formal da espécie *P. lutzii*.

P. brasiliensis, possui uma natureza dimórfica (célula leveduriforme a 36 - 37°C e filamento a \pm 23°C). Seu dimorfismo foi observado pela primeira vez por Lutz em 1908, mas somente em 1931 Negroni registrou a transição *in vitro* da fase micelial para a fase leveduriforme (revisto por San-Blas *et al.*, 1977). Franco *et al.* (2000), em uma análise crítica dos trabalhos de isolamento de *P. brasiliensis* a partir do solo aponta-o como habitat do fungo, não esclarecendo totalmente as condições específicas para o crescimento. Entretanto, Medina & Bodziak Jr (1949), afirmaram que esse fungo é capaz de se desenvolver no solo, possivelmente em lugares úmidos, ricos em matéria orgânica, com pH entre 6,0 e 7,8. Estudo recente (Terçarioli *et al.*, 2007) demonstrou que *P. brasiliensis* é capaz de se desenvolver tanto em solos argilosos quanto em arenosos, desde que a taxa de umidade seja elevada. Mais recentemente, através de infecção experimental autores confirmaram a hipótese de tatus abrigarem o *P. brasiliensis*, reforçando a possibilidade destes desempenharem um papel importante no ciclo biológico do patógeno (Nishikaku *et al.*, 2008). Richini-Pereira *et al.* (2008) através de análises moleculares apontaram outros animais silvestres (porco da Índia, guaxinim, porco espinho e furão) como

novos hospedeiros de *P. brasiliensis*.

1.3- MORFOLOGIA DO FUNGO

P. brasiliensis cresce em forma de levedura, em cultura, a 36 - 37°C, e em tecidos do hospedeiro. A baixas temperaturas, $\pm 23^{\circ}\text{C}$, cresce como fungo filamentosos. Na fase leveduriforme (L), em cultura, as colônias são cerebriformes, de cor creme e consistência cremosa. Ao exame microscópico observam-se células arredondadas, de diferentes tamanhos (4 a 30 μm), usualmente ovais a alongadas, multiplicando-se por brotamentos simples ou múltiplos e possuindo uma parede celular espessa, bastante refrátil. Células em curtas cadeias de blastosporos também podem ser observadas. A fase filamentosa ou micelial (M) é de crescimento lento (20 a 30 dias), produzindo colônias pequenas, irregulares, brancas, cobertas por curto micélio aéreo, que se adere firmemente ao ágar. Pigmento marrom difuso é produzido por alguns isolados. Microscopicamente, hifas delicadas, septadas, com clamidosporos intercalares, laterais ou terminais são observadas (Negroni, 1968; Lacaz *et al.*, 1998). Conídios geralmente não são produzidos, sendo verificado apenas clamidosporos em meios de rotina. Sob estresse nutricional o micélio produz conídios, de três tipos: artroconídios-tálicos; conídios solitários, originados de dilatações terminais de conidióforos micronematosos curtos; e conídios sésseis, formados diretamente de protusões nas células miceliais (Bustamante-Simon *et al.*, 1985; Bedout *et al.*, 1986; Cano & Vidal de Aguiar 1999).

Durante o processo dimórfico (L \Leftrightarrow M) o fungo *P. brasiliensis* apresenta diversos estágios morfológicos transicionais. Salazar & Restrepo (1984) verificaram que as mudanças morfológicas durante a transformação do micélio em levedura são

dilatações terminais e intercalares na hifa, que mais tarde evoluem para estruturas semelhantes à clamidosporos. Estas estruturas adquirem um contorno duplo semelhante à parede espessa das células leveduriformes de *P. brasiliensis* e finalmente dão origem às células multibrotantes.

Estudos enzimáticos e nutricionais sobre *P. brasiliensis* demonstraram que seu dimorfismo é unicamente dependente da temperatura (Nickerson, 1948; San-Blas & Centeno, 1977). Porém, Lima *et al.* (2004) ao estudar *in vitro* e *in vivo* o dimorfismo de *P. brasiliensis* preservados sob óleo não observaram a transição de M - L das amostras ao submetê-las a temperatura ideal de 36°C, demonstrando que a temperatura pode não ser o único fator para a transição.

1.4- VIRULÊNCIA

Fungos patogênicos causadores de micoses sistêmicas possuem vários fatores que permitem seu crescimento no hospedeiro, permitindo o estabelecimento da relação parasitária e contribuindo para a doença. Esses fatores são denominados *fatores de virulência* que auxiliam na aderência, colonização, disseminação e habilidade do fungo para resistir e escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Kurokawa, 1998).

Os microrganismos expressam estes fatores apenas na presença de um hospedeiro susceptível, por isso não é uma propriedade independente do microrganismo (Casadevall & Pirofski, 2001).

Várias características e componentes de *P. brasiliensis* têm sido associados com a virulência e patogenicidade, e incluem: capacidade dimórfica; produção de melanina (Da Silva *et al.*, 2006; Taborda *et al.*, 2008) constituintes da parede celular,

como α -1,3 e β -glucanas; proteínas que se ligam a estrógeno; antígeno extracelular gp43 (Hogan *et al.*, 1996), uma adesina de 30 kDa (Andreotti *et al.*, 2005), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (Barbosa *et al.*, 2006) e uma enzima extracelular da subfamília das serinas proteinases contendo radical SH (Carmona *et al.*, 1995).

Uma importante característica de vários fungos patogênicos é a habilidade inerente de modificar sua forma, dimorfismo, quando em tecido do hospedeiro. Esse dimorfismo é um potencial genético intrínseco de fungos como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *P. brasiliensis* (San-Blas *et al.*, 2002). A morfogênese e a mudança fenotípica permitem aos fungos se adaptar à vida em diferentes microambientes e sobreviver no tecido do hospedeiro (San-Blas *et al.*, 2000). O processo dimórfico em *P. brasiliensis*, o capacita a produzir uma fase morfológica mais adequada para a invasão e progressão da doença (Nickerson, 1948, San-Blas & Centeno, 1977). Estudos sobre paracoccidioidomicose experimental induzida por inalação de conídios, concluíram que os propágulos transformam-se rapidamente em células leveduriformes para se adequarem às condições do tecido do hospedeiro, e que uma vez realizado o processo dimórfico, são capazes de multiplicarem-se livremente dentro do parênquima pulmonar (McEwen *et al.*, 1987).

Pigmentos de melanina são polímeros multifuncionais produzidos por uma variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais. A proteção dos microrganismos contra as defesas do hospedeiro, pela melanina, é uma questão importante a se considerar na terapia antimicrobiana, uma vez que a eficácia clínica de algumas drogas antimicrobianas é complementada pela defesa do hospedeiro (Nosachuk & Casadevall, 2006). A capacidade de *P. brasiliensis* produzir melanina

foi descrita pela primeira vez por Gómez *et al.* (2001) e estudos demonstraram que as suas células produzem melanina na presença de L-DOPA (Gómez *et al.*, 2001; Da Silva *et al.*, 2006). Os autores extraíram partículas pigmentadas de conídios e leveduras após tratamento químico e também observaram a melanização *in vitro* de conídios sem adição de precursores da melanina, demonstrando a capacidade do fungo em produzir a melanina. Da Silva *et al.* (2006) relataram resistência de leveduras melanizadas de *P. brasiliensis* à fagocitose e morte por macrófagos e redução da susceptibilidade a anfotericina B.

Constituintes da parede celular de *P. brasiliensis* têm um papel importante na relação parasita-hospedeiro (San-Blas & Centeno, 1977, San-Blas & Vernet, 1977; San-Blas *et al.*, 1977a). Este aspecto está relacionado aos polissacarídeos da parede celular, principalmente as α -1,3 e β -glucanas (revisto por Hogan *et al.*, 1996). Através de modelos animais, demonstrou-se que o cultivo por tempo prolongado de isolados virulentos do fungo leva, inevitavelmente, à perda da sua virulência em modelos animais, diminuição da espessura da parede celular medida por microscopia eletrônica e a redução da concentração de α -1,3-glucana na parede das células. Com a inoculação sucessiva em animais ou crescimento *in vitro* em meios suplementados com soro fetal bovino, essas modificações são revertidas. Acredita-se que essa molécula possa proteger o fungo contra o ataque de leucócitos do hospedeiro, formando uma barreira, já que os fagócitos não possuem α -glucanases. Já o polissacarídeo β -glucana, com concentração na parede celular de *P. brasiliensis* inversamente proporcional à de α -1,3 -glucana, é um forte estimulador de resposta inflamatória e, portanto, sua presença em maior proporção torna mais fácil o reconhecimento do fungo pelo sistema imunológico do organismo parasitado e o conseqüente estabelecimento de resposta inflamatória contra o parasita, visando

a sua eliminação (Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Hogan *et al.*, 1996).

Questionamentos sobre a maior frequência da paracoccidiodomicose em homens adultos que em mulheres adultas e ocorrência em igual frequência entre os sexos antes da puberdade, demonstraram uma alta afinidade de proteínas do fungo a estrógenos e que o 17β -estradiol inibiu a transição de formas miceliais em leveduriformes. Tem sido sugerido que estrógenos do hospedeiro atuem ligando-se a proteínas fúngicas, retardando ou inibindo a adaptação do fungo aos tecidos do hospedeiro (Loose *et al.*, 1983; Restrepo *et al.*, 1984; Stover *et al.*, 1986; Salazar *et al.*, 1988).

Análises de componentes extracelulares de *P. brasiliensis* têm demonstrado a presença de glicoconjugados de diferentes pesos moleculares. A glicoproteína gp43 foi caracterizada como sendo um componente antigênico específico isolado do filtrado de cultura (Puccia *et al.*, 1986) e é facilmente reconhecida pelo soro de pacientes apresentando a doença ativa (Mendes-Giannini *et al.*, 1989) tendo, portanto valor diagnóstico (Camargo *et al.*, 1988; Mendes-Giannini *et al.*, 1988). Estudos têm sugerido o papel da gp43 como receptor para laminina e responsável pela adesão de células leveduriformes de *P. brasiliensis* a componentes da membrana basal. A secreção da gp43 atuaria como um mecanismo de escape do fungo contra a resposta humoral do hospedeiro e promoveria a ligação da superfície celular do parasita à laminina, facilitando sua disseminação e invasão nos tecidos (Lopes *et al.*, 1994; Vicentini *et al.*, 1994). Popi *et al.* (2002) demonstraram que a gp43 inibe a capacidade de fagocitose de macrófagos de camundongos, bem como sua atividade fungicida.

Dois estudos que isolaram e caracterizaram moléculas envolvidas na adesão de células de leveduras de *P. brasiliensis* a células do hospedeiro foram realizados

por Andreotti *et al.* (2005) que isolaram uma proteína/adesina de 30 kDa, pré-trataram células epiteliais com esta nova proteína e gp43, observando intensa inibição na adesão e Barbosa *et al.* (2006) que caracterizaram a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e demonstraram que esta pode estar envolvida na mediação da ligação das células fúngicas a fibronectina, colágeno tipo I e laminina, contribuindo assim para a aderência e disseminação do fungo no hospedeiro. Uma vez que a adesão e invasão de células hospedeiras são passos essenciais envolvidos na infecção e disseminação de patógenos, estes estudos apontam a relação destas duas novas moléculas na virulência de *P. brasiliensis*.

A atividade proteolítica de filtrados de cultura de *P. brasiliensis* foi estudada por Carmona *et al.* (1995), que identificaram uma enzima que poderia pertencer à subfamília das serino-proteinases contendo radical SH. O mesmo grupo de pesquisa demonstrou que a atividade proteolítica do filtrado de cultura de *P. brasiliensis* é capaz de clivar componentes de matriz extracelular e relacionou esta atividade à enzima descrita anteriormente, que pode ter um papel importante na patogenicidade desse fungo (Puccia *et al.*, 1998).

Modelos experimentais para o estudo de infecções têm sido utilizados com sucesso para o conhecimento da patogênese de vários fungos (Borba *et al.*, 2005; Capilla *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2007). O primeiro experimento bem sucedido em relação à paracoccidiodomicose foi realizado por Montenegro (1927) inoculando testículos de cobaias com fragmentos de tecidos humanos afetados, quando obteve orquite em 100% dos animais. Desde então, os trabalhos experimentais têm permitido estudos sobre a morfologia do fungo em tecido; a resposta tecidual contra o agente; as vias de disseminação da infecção, bem como a resposta imunológica e celular do hospedeiro frente a *P. brasiliensis* (Kerr *et al.*, 1988; Coelho *et al.*, 1994;

Borba & Schäffer, 2002).

1.5- PERFIL GENÉTICO

Existe um grande número de potenciais aplicações de técnicas moleculares na área de micologia. Técnicas moleculares como PCR (*polymerase chain reaction*), RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*), *semi-nested* PCR, RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), microssatélite, LAMP (*loop-mediated isothermal amplification method*), RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction*), entre outras, são ferramentas poderosas em ensaios diagnósticos, em estudos populacionais e de relações filogenéticas entre isolados ou espécies (Niño-Vega *et al.*, 2000; Hahn *et al.*, 2003; Matute *et al.*, 2006; Borba *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2009; Tatibana *et al.*, 2009; Koishi *et al.*, 2010; Buitrago *et al.*, 2009, 2011).

A aplicação de procedimentos em biologia molecular, especificamente a PCR, para detectar e identificar *P. brasiliensis* tem sido utilizada por vários autores por ser uma técnica rápida, de alta sensibilidade e especificidade, além de minimizar os riscos de contaminação do operador pelo fungo, quando comparada ao diagnóstico clássico, como cultura e inoculação em animal (Sandhu *et al.*, 1997; Goldani & Sugar 1998; Díez *et al.*, 1999; Bialek *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2000; Motoyama *et al.*, 2000; Imai *et al.*, 2000; Borba *et al.*, 2005; Matute *et al.*, 2006; Koishi *et al.*, 2010).

A utilização de *primers* escolhidos arbitrariamente para a distinção de isolados de *P. brasiliensis* de diversas origens geográficas e hospedeiros tem sido o objetivo de vários autores, com sucesso (Soares *et al.*, 1995; Calcagno *et al.*, 1998; Molinari-Madlum *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 1998; Hahn *et al.*, 2003; Borba *et al.*, 2008).

Ademais, a técnica de RFLP também foi utilizada para prover informações sobre relações epidemiológicas e filogenéticas entre isolados de diferentes regiões geográficas, porém os autores concluíram que os mesmos agrupamentos foram obtidos quando utilizaram a técnica de RAPD (Niño-Vega *et al.*, 2000). Kurokawa *et al.* (2005) destacaram que a análise pela técnica de RAPD em associação com virulência, aspectos morfológicos e imunológicos pode ser considerada adequada para detectar diferenças entre isolados de *P. brasiliensis*. Através da técnica de RAPD foi possível demonstrar que o isolado Pb01, com alta variabilidade genética (Carrero *et al.*, 2008), representaria uma nova espécie filogenética, uma vez que isso só seria possível se o isolado se agrupasse com outros indivíduos na natureza com o mesmo perfil genético, fato relatado em estudos anteriores com a técnica de RAPD (Soares *et al.*, 1995; Molinari-Madlum *et al.*, 1999). Essa técnica é muito utilizada devido a sua rapidez, segurança, desde que controles e testes de reprodutibilidade sejam realizados, e simplicidade de uso, além da amplitude dos resultados gerados. A técnica de RAPD-PCR mostra-se muito útil para caracterizar e medir a variabilidade genética, por utilizar o DNA diretamente e não sofrer influência dos fatores que afetam a expressão gênica.

2. JUSTIFICATIVA

Dentre os estados brasileiros com ocorrência de paracoccidioidomicose, Mato Grosso apresenta um número significativo de casos. Devido à natureza agrícola do estado, essa micose é considerada grave problema de saúde pública na região.

Trabalhos utilizando modelo murino experimental têm proporcionado à ampliação dos conhecimentos acerca da morfologia de *Paracoccidioides brasiliensis* em tecido, as vias de disseminação, resposta do hospedeiro, comparação da virulência entre isolados, entre outros (Kerr *et al.*, 1988; Mendes da Silva *et al.*, 1996; Coelho *et al.*, 1994; Borba & Schäffer, 2002; Lima *et al.*, 2004; Borba *et al.*, 2005; Borba *et al.*, 2008). Diferenças morfológicas em isolados de *P. brasiliensis* após passagem em animal já foram descritas (Svidzinski *et al.*, 1999).

Fatores como os do hospedeiro, a virulência fúngica e as condições ambientais estão envolvidos na determinação do tipo da evolução da doença. Pelas buscas realizadas na base científica de dados PubMed, não foi encontrado qualquer estudo comparativo considerando-se a morfologia e o perfil genético, antes e após passagem animal, e a virulência de isolados de *P. brasiliensis*.

Diante do exposto é de fundamental importância e justificável o estudo com isolados de *P. brasiliensis* provenientes de pacientes da região de Mato Grosso buscando melhorar o conhecimento desse agente etiológico. Ademais, investigação sobre os aspectos inerentes ao fungo, em especial antes e depois da interação com o hospedeiro experimental visando uma possível correlação dos dados obtidos, ampliará os conhecimentos.

3. OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

- Avaliar os aspectos morfológicos e genotípicos e a virulência de isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* provenientes de pacientes do estado do Mato Grosso, apresentando forma clínica crônica da doença, e comparar tais aspectos pré e pós-infecção experimental murina.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características morfológicas dos diferentes isolados de *P. brasiliensis* pré e pós-passagem em modelo murino;
- Caracterizar molecularmente os diferentes isolados pré e pós-passagem em animal pela técnica de RAPD-PCR;
- Avaliar a virulência dos isolados através de modelo murino de infecção experimental;
- Correlacionar os dados morfológicos, genéticos e de virulência.

4. METODOLOGIA

4.1- MORFOLOGIA

4.1.1- Isolados

Foram utilizados oito isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* Pb235CRS, Pb246, Pb31MAS, Pb261, Pb285, Pb281, Pb639 e Pb29EE recém-isolados de pacientes, do sexo masculino, com forma clínica crônica da paracoccidioidomicose, provenientes do estado do Mato Grosso. Os isolados foram cedidos pela Dr^a Rosane Christine Hanh da Universidade Federal de Cuiabá. Os isolados foram subcultivados em meio de cultura PYG ágar (peptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, glicose 2%, ágar 1,5%) e mantidas à temperatura de 36°C em estufa FANEM modelo 347F, para os experimentos posteriores e estocados em glicerol a -70°C, no Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de fungos na Fundação Oswaldo Cruz.

4.1.2- Macro e micromorfologia

Para o estudo morfológico, os isolados foram avaliados pré e pós-passagem em animal na fase leveduriforme. A caracterização morfológica das colônias foi feita cultivando-as por 7 dias em placas de Petri contendo meio PYG ágar, à temperatura de 36°C. Para a observação microscópica foram realizadas lâminas contendo lactofenol de Amman acrescido de azul de algodão (fenol, 20g; ácido láctico, 20 ml; glicerol, 40 ml; água destilada, 20 ml; azul de algodão, 0,05g/100 ml) e observadas em microscópio ótico Zeiss modelo Axiophot.

4.2- VIRULÊNCIA

4.2.1- Preparo das suspensões celulares

Os isolados foram cultivados em meio PYG ágar e após 3 a 5 dias de

crescimento a 36°C, as células foram coletadas, suspensas em salina tamponada com fostato (PBS 50 mM, pH 7,2) e submetidas à agitação em *vortex* por 10 minutos visando a diminuir os grumos celulares. Em seguida, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e o resultado expresso em unidades fúngicas por ml (UF/ml). A UF foi definida como uma célula isolada, célula *mater* ligada às suas gêmulas ou uma célula e suas ramificações. A viabilidade das células foi determinada por unidade formadora de colônia (UFC) (Goihman-Yahr *et al.*, 1980) e variou de 89 a 96% .

4.2.2- Animais e inoculação experimental

Os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), após licenciamento do projeto pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Fiocruz (CEUA – FIOCRUZ), sob o número L041/07.

Camundongos BALB/c, machos, de seis a oito semanas de idade foram utilizados. Os camundongos foram mantidos em estantes ventiladas e receberam ração Novital® e água filtrada *ad libitum*.

Grupos de 20 camundongos, por isolado, após anestesia intraperitoneal com 0,2 ml de tiopental sódico (6,25 mg/ml), foram inoculados intravenosamente, via plexo retro-orbital, com 0,02 ml da suspensão de células contendo 10⁵ UF viáveis. Um grupo de 10 camundongos, para cada isolado, foi utilizado para experimentos de mortalidade e sinais clínicos da infecção, e os outros 10 para a determinação da UFC (unidade formadora de colônia), na tentativa de se determinar o número de células fúngicas viáveis nos órgãos coletados e estudos histopatológicos.

Um grupo de 10 camundongos, similarmente inoculado com PBS, foi utilizado

como controle. Os camundongos não utilizados, ao final dos experimentos foram eutanasiados por exposição prolongada ao CO₂, em cabine de segurança biológica VECO classe II A e descartados seguindo as normas de biossegurança

4.2.3- Necropsia e histopatologia

As necropsias foram realizadas nos 100^o e 200^o dias após a inoculação, com exceção dos camundongos inoculados com os isolados Pb29EE e Pb639, para os quais foi realizada uma necropsia aos 60 dias após uma nova inoculação. Grupos de três camundongos, escolhidos ao acaso dos grupos de 10 camundongos inicialmente inoculados com os isolados de *P. brasiliensis*, foram pesados, avaliados visualmente quanto ao emagrecimento (perda de massa muscular) e necropsiados, após eutanásia por exposição prolongada ao CO₂, em cabine de segurança biológica VECO classe II A. Os camundongos foram imobilizados dorsalmente em suporte de dissecação. Após desinfecção com solução alcoólica de iodo a 10% (v/v), foram abertas as cavidades torácica e abdominal. Realizado o exame macroscópico para observar possíveis lesões, foram retirados, assepticamente, os pulmões, rins, baço, intestino, coração, fragmentos do diafragma, peritônio e fígado.

Para o exame histopatológico um fragmento do fígado, baço, peritônio, intestino e diafragma, um lobo do pulmão, um rim e o coração, foram fixados em solução de formalina de Carson a 10% tamponada, processados para emblocamento em parafina e cortes de cinco micrômetros de espessura. Em seguida os cortes foram fixados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico-Schiff (PAS) e impregnação pela prata de Grocott de acordo com Behmer *et al.* (1976). Foram realizados também a necropsia e o exame histopatológico dos camundongos utilizados como grupo controle, conforme descrito

acima.

4.2.4- Determinação do índice esplênico

Ainda no momento da necropsia, quando da retirada do baço, o mesmo foi pesado e o índice esplênico foi calculado como sendo a razão entre os pesos do baço e do corpo do animal infectado, dividido pela razão entre os pesos do baço e do corpo do animal controle (Fernandes *et al.*, 1999). O aumento do órgão foi expresso em unidades em relação ao controle. O valor médio do peso relativo dos baços dos camundongos do grupo controle foi considerado como igual a uma unidade.

4.2.5- Reisolamento de células fúngicas

No momento da necropsia, o outro lobo do pulmão, o outro rim, fragmento do baço, do fígado dos camundongos inoculados foram retirados, assepticamente, pesados, macerados e homogeneizados em PBS estéril. A suspensão foi ajustada para 10 mg de tecido/ml e amostras de 100 µl de cada homogeneizado foram semeadas em placas de Petri contendo meio PYG ágar com cloranfenicol para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) nos órgãos estudados. As placas foram incubadas a 36°C, por 30 dias, para o reisolamento do fungo.

Os órgãos dos camundongos, utilizados como grupo controle, também foram processados como exposto acima.

4.3- GENOTIPAGEM

4.3.1 - Extração e quantificação do DNA

Os isolados de *P. brasiliensis*, pré e pós-passagem (100 dias após inoculação) em camundongo, foram semeados em tubos contendo meio PYG ágar e incubados à 36°C, por 10 dias. A massa celular foi coletada com alça de platina e transferida para tubo Falcon® de 50ml contendo uma solução estéril de timerosal (0,05%), para provocar a morte celular. Após 1 hora, as células foram lavadas em salina estéril e a massa foi liofilizada, macerada em nitrogênio líquido e armazenada em tubo tipo Eppendorf.

As células maceradas foram submetidas à extração de DNA utilizando o Kit comercial da Promega®, onde as células foram acrescidas de 600 µl da solução de lise e submetidas à rápida agitação e incubação a 65°C, por 15 minutos. Após foram adicionados 3 µl de Rnase e nova incubação a 37°C, por 15 minutos. Foram acrescentados 200 µl de solução para precipitação de proteínas e as células foram centrifugadas a 1.300 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi recolhido e transferido para outro tubo, onde foram adicionados 600 µl de isopropanol e levados a centrífuga a 1.300 x g por 1 minuto. O DNA precipitado foi lavado com 600 µl de etanol gelado a 70% e centrifugado 1.300 x g por 1 minuto. O etanol foi removido e o DNA foi seco à temperatura ambiente por 12 horas. A reidratação foi feita *overnight* a 4°C com 100 µl de solução para reidratação do kit.

As moléculas de DNA foram quantificados em espectrofotômetro GeneQuant®, Amersham Pharmacia, usando-se diluições de 1:100 em água. A pureza foi estimada pela razão entre os valores de densidade ótica obtidos a 260 e 280 nm. A qualidade das amostras de DNAs foi avaliada pela leitura visual da corrida eletroforética de 2 µl de DNA em gel de agarose a 0,8%, a 50 V, utilizando-se como marcador de peso molecular λ DNA *Hind* III.

4.3.2 - RAPD-PCR

Foi utilizada a técnica de RAPD-PCR que se caracteriza por ser uma reação de polimerase em cadeia com sequências iniciadoras escolhidas arbitrariamente. Foram utilizados 6 *primers* do Kit Ready-To-Go® RAPD: *primer* 1 (5'-d[GGTGCGGGAA]-3'); *primer* 2 (5'-d[GTTTCGCTCC]-3'); *primer* 3 (5'-d[GTAGACCCGT]-3'); *primer* 4 (5'-d[AAGAGCCCGT]-3'); *primer* 5 (5'-d[AACGCGCAAC]-3') e *primer* 6 (5'-d[CCCGTCAGCA]-3'). As reações foram preparadas utilizando-se 30 ng de DNA, 25 µl de água MilliQ estéril, 25 pmoles de *primer* e as pérolas do kit que contém Taq DNA polimerase, nucleotídeos e tampão padronizados para a reação da PCR. O DNA de *Escherichia coli* (BL21) foi utilizado como controle positivo das reações, conforme indicado pelo fabricante do kit. O programa de amplificação utilizado foi o recomendado pelo fabricante: 1 ciclo de 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos; e 1 ciclo de 72°C por 5 minutos em um termociclador Mastercycler Gradiente da Eppendorf.

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, a 80V, em tampão TAE (Tris base, 4,84 g; ácido acético glacial, 1,14 ml; EDTA 0,5 M, 2 ml, pH 8,0; água destilada, 1000 ml). Os géis foram corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/ml em tampão TAE e fotografados sob luz ultravioleta usando-se filme polaróide. Como marcador de peso molecular foi utilizado o 100 pb DNA Ladder.

4.3.3 - Perfis de fragmentos de DNA

Os perfis eletroforéticos de DNA foram utilizados para analisar a similaridade do perfil de DNA, pelo cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard e o

algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetic Mean*). A análise foi realizada pelo programa NTSYS-pc versão 2.02. Foi considerado como mudança significativa o desaparecimento e o aparecimento de bandas, pós-passagem em animal, com intensidade arbitrada como média ou alta

4.4- ESTATÍSTICA

Os dados da curva de sobrevivência dos camundongos inoculados foram analisados pelo teste de Kaplan Meier seguido de *long rank tests*. Comparações entre os isolados para a análise da virulência foram realizadas pelo teste não paramétrico Mann-Whitney.

5. RESULTADOS

5.1- ANÁLISE MORFOLÓGICA

5.1.1- Macromorfologia pré e pós-passagem em animal

Na análise morfológica pós-passagem em animal os isolados foram recuperados do fígado para a maioria deles, exceto os isolados Pb281 (recuperado do baço) e Pb285 (recuperado do rim). A recuperação das células se deu aos 100 dias após a inoculação para a maioria dos isolados, com exceção dos isolados Pb29EE e Pb639 que foram reisolados após 60 dias da inoculação (após nova inoculação para tentativa de reisolamento das células, uma vez que com 100 dias de evolução da infecção não foi possível a obtenção de células fúngicas dos órgãos dos camundongos).

Não foram observadas diferenças macromorfológicas entre os isolados pré-passagem em animal nem modificação destas pós-passagem. Em relação à macromorfologia, todas as colônias apresentaram coloração creme e variaram de membranosas e sulcadas a colônias com aspecto cerebriforme de consistência cremosa (Figura 1).

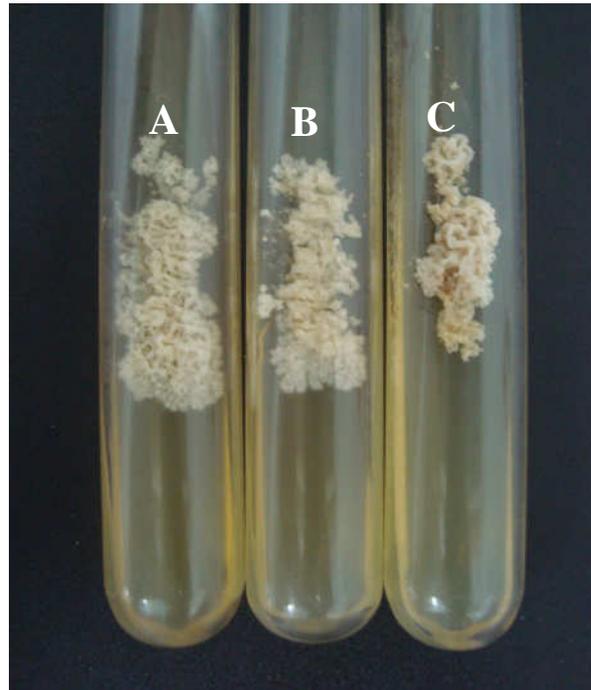


Figura 1. Macromorfologia. Colônias de *Paracoccidioides brasiliensis* pré-passagem em animal, cultivadas em meio PYG ágar, a 36°C, por 7 dias. A - Pb235CRS; B – Pb281 e C – Pb31MAS.

5.1.2- Micromorfologia pré e pós-passagem em animal

Os isolados de *P. brasiliensis* apresentaram morfologias distintas entre si quando cultivadas em meio PYG ágar, a 36°C, por 7 dias. As figuras 2 e 3 exemplificam os aspectos morfológicos encontrados, antes dos isolados serem inoculados em camundongos, como descrito na metodologia. Não foram observadas alterações no perfil micromorfológico dos isolados pós-passagem em camundongo.

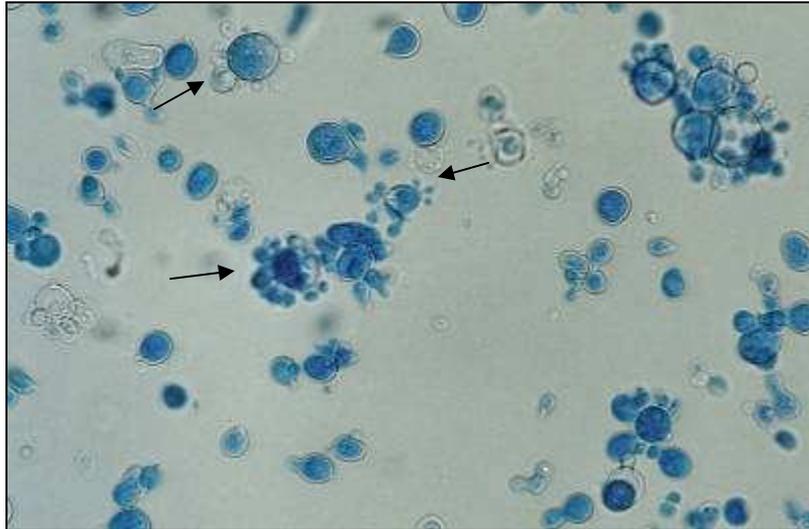


Figura 2. Micromorfologia. *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb639 pós-passagem em camundongo, apresentando grande número de células leveduriformes com brotamentos (—▶), após crescimento em meio PYG ágar, a 36°C (aumento original 400x).

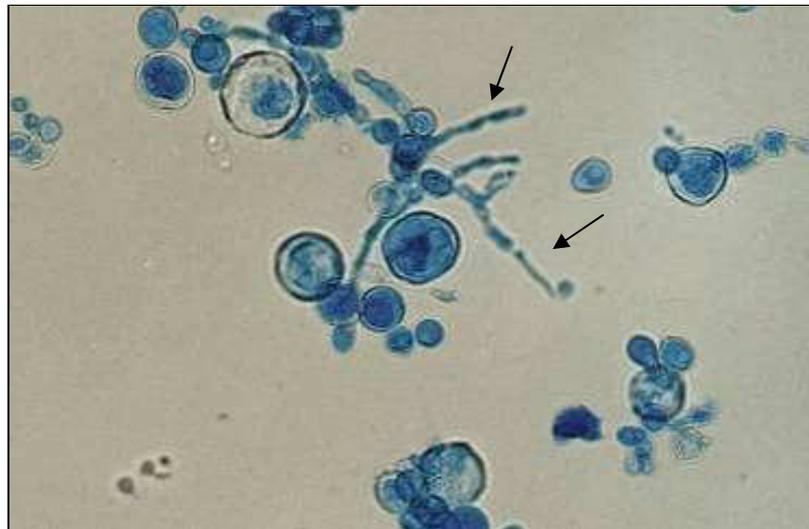


Figura 3. Micromorfologia. *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb235CRS pós-passagem em camundongo, apresentando células leveduriformes, porém filamentos delicados (—▶) também são observados, após crescimento em meio PYG, a 36°C (aumento original 400x).

A tabela 1 sumariza os aspectos morfológicos de todos os isolados de *P. brasiliensis* estudados. Observou-se que três dos isolados, Pb235CRS, Pb246 e Pb261, em meio PYG ágar, à temperatura de 36°C, apresentaram filamentos delicados, dilatações inter-septais e células leveduriformes com pouca gemulação (Pb235CRS e Pb246) e média gemulação (Pb261). Já os isolados Pb31MAS, Pb285 e Pb281 apresentaram morfologia típica, com presença de grande quantidade de células leveduriformes, gemulando numa escala arbitrada como média. Os demais isolados (Pb639 e Pb29EE) apresentaram células leveduriformes com gemulação intensa.

Tabela 1. Aspectos morfológicos dos isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, pré e pós-passagem em camundongo, cultivados em meio PYG ágar, a 36°C.

Isolados	Morfologia
Pb235CRS, Pb246	Presença de filamentos delicados e células leveduriformes com pouca gemulação
Pb261	Presença de filamentos delicados e grande quantidade de células leveduriformes com gemulação média
Pb31MAS, Pb285, Pb281	Ausência de filamentos e grande quantidade de células leveduriformes com gemulação média
Pb639, Pb29EE	Ausência de filamentos e grande quantidade de células leveduriformes com gemulação intensa

5.2- ANÁLISE DA VIRULÊNCIA

5.2.1- Infecção experimental

Após a realização de um experimento piloto (dados não mostrados) foi escolhido para a infecção experimental um inóculo considerado intermediário (10^5 células/ml), dois pontos para a realização da necropsia (100 e 200 dias após a inoculação) e o tempo de 200 dias após a inoculação para o término da observação dos sinais clínicos e avaliação da sobrevivência dos camundongos.

Os isolados Pb235CRS, Pb31MAS e Pb285 causaram nos camundongos emagrecimento e aumento do volume da cavidade abdominal, principalmente pela intensa formação de granulomas, aos 100 dias de inoculação. Os isolados Pb246, Pb261, Pb281, Pb29EE e Pb639 causaram também, aos 100 dias de inoculação, emagrecimento, porém poucos granulomas na cavidade abdominal foram vistos, com exceção dos camundongos inoculados com o isolado Pb639 que não apresentaram granulomas nos tempos avaliados.

Aos 200 dias de inoculação ainda foi observada a formação de granulomas na cavidade abdominal, sendo que para os camundongos inoculados com os isolados Pb235CRS e Pb246 poucos granulomas foram visualizados, enquanto que para os inoculados com os isolados Pb281 e Pb285 muitos granulomas foram vistos.

O emagrecimento, identificado pela perda de massa muscular nos camundongos inoculados com os isolados de *P. brasiliensis*, não refletiram na perda de peso durante o período de observação. Durante as pesagens, os camundongos inoculados com os isolados de *P. brasiliensis* apresentaram aumento de peso, assim como os camundongos controles (Tabela 2). Não houve diferença significativa do

peso entre os camundongos inoculados com os isolados e deles em relação ao controle ($P > 0,05$), nos tempos avaliados.

Tabela 2. Variação de peso (gramas) dos camundongos, inoculados com oito isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, aos 100 e 200 dias de inoculação.

Inóculo	Dias após inoculação	
	100	200
PBS	↑ 2,9 ±0,6	↑ 11 ± 0,8
Pb235CRS	↑ 3,1 ±0,9	↑ 12 ± 0,7
Pb285	↑ 3 ±0,4	↑ 13 ± 0,6
Pb261	↑ 2,6 ±0,8	↑ 10 ± 0,5
Pb246	↑ 2,5 ±1	↑ 12 ± 0,9
Pb31MAS	↑ 2,9 ±1,1	↑ 11 ± 0,4
Pb281	↑ 2,5 ±0,5	↑ 13 ± 0,8
Pb29EE	↑ 2,7 ±0,9	↑ 12 ± 0,6
Pb639	↑ 2,5 ±0,5	↑ 11 ± 0,9

↑ aumento de peso

A figura 4 exemplifica o aspecto macroscópico observado nos camundongos após a abertura da cavidade abdominal, durante a necropsia aos 100 dias após a inoculação.

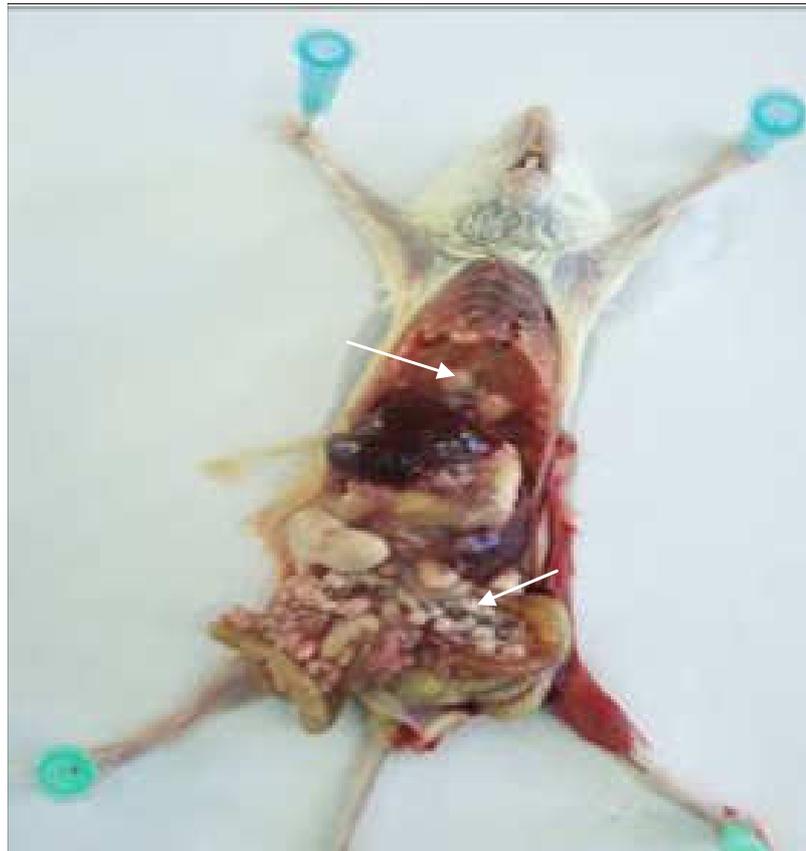


Figura 4. Alterações macroscópicas. Camundongo inoculado com *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb235CRS, apresentando diversas lesões granulomatosas (→) na cavidade torácica e abdominal.

A tabela 3 resume o aspecto macroscópico observado durante as necropsias dos camundongos, nos tempos determinados, com todos os isolados de *P. brasiliensis* utilizados neste estudo.

Tabela 3. Aspecto macroscópico observado durante a necropsia dos camundongos, inoculados com oito isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, aos 100 e 200 dias de inoculação.

Isolados	100 dias pós- inoculação			200 dias pós- inoculação		
	Esplenomegalia	Muitos granulomas	Poucos granulomas	Esplenomegalia	Muitos granulomas	Poucos granulomas
Pb235CRS	+	+	-	+	-	+
Pb285	+	+	-	+	+	-
Pb261	+	-	+	+	-	-
Pb246	+	-	+	+	-	+
Pb31MAS	+	+	-	+	-	-
Pb281	+	-	+	+	+	-
Pb29EE	+	-	+	+	-	-
Pb639	+	-	-	+	-	-

(+) = positivo (-) = negativo

5.2.2- Sobrevivência

Em relação à curva de sobrevivência dos camundongos inoculados, a figura 5 apresenta o percentual de sobrevivência, aos 200 dias de inoculação, dos camundongos com os diferentes isolados. Os camundongos inoculados com o isolado Pb235CRS apresentaram 30% de sobrevivência aos 200 dias de inoculação, enquanto os camundongos inoculados com os isolados Pb285, Pb261 e Pb31MAS apresentaram 70% de sobrevivência para o mesmo período. Os camundongos inoculados com o isolado Pb246 apresentaram, ao final do período observado, 90% de sobrevivência. Os isolados Pb281, Pb29EE e Pb639 não foram capazes de causar a morte dos camundongos aos 200 dias de inoculação.

O tempo de sobrevivência cumulativo dos camundongos inoculados com o isolado Pb235CRS foi significativamente menor ($P = 0,0007$) quando comparados com o tempo dos camundongos inoculados com os demais isolados. O tempo de sobrevivência cumulativo dos camundongos inoculados com os isolados Pb285, Pb261 e Pb31MAS foi significativamente menor quando comparados com o tempo dos camundongos inoculados com os isolados Pb246, Pb281, Pb29EE e Pb639.

Não houve morte dos camundongos do grupo controle durante o experimento.

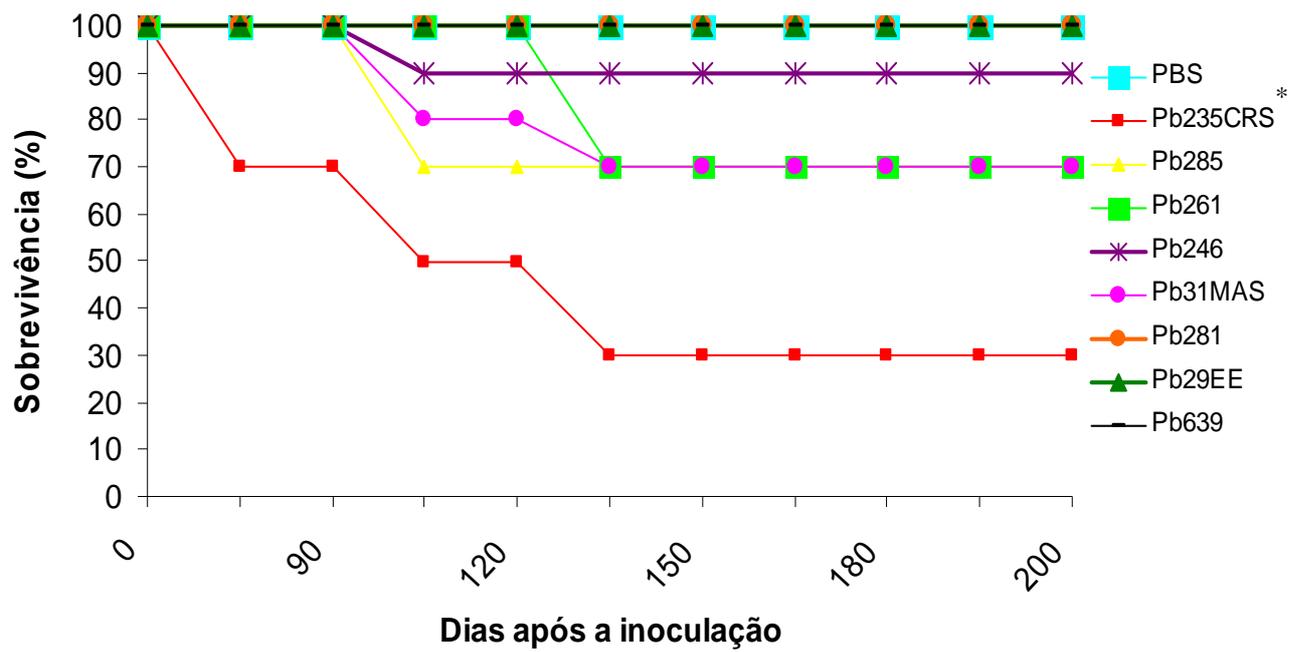


Figura 5. Tempo de sobrevivência dos camundongos inoculados. Percentual cumulativo de sobrevivência dos camundongos inoculados, intravenosamente, com 10^5 células viáveis de *Paracoccidioides brasiliensis* aos 200 dias de observação. * $P = 0,0007$

5.2.3- Análise Histopatológica

Foram observadas alterações microscópicas na maioria dos tecidos dos camundongos inoculados aos 100 dias de inoculação, com exceção dos inoculados com o isolado Pb639. Aos 200 dias de inoculação alterações microscópicas foram vistas em poucos tecidos, apenas dos camundongos inoculados com os isolados Pb235CRS, Pb285, Pb246 e Pb281.

Aos 100 dias de inoculação, os camundongos inoculados com o isolado Pb235CRS foi observado processo inflamatório piogranulomatoso com a presença de estruturas leveduriformes multibrotantes nos tecidos do rim, do diafragma (Figura 6), do peritônio e da serosa intestinal. No tecido pulmonar desses camundongos foi observada pneumonia, porém sem visualização de estruturas fúngicas, e nos demais tecidos avaliados (baço, coração e fígado) nenhuma alteração foi verificada. A presença de processo inflamatório granulomatoso com estruturas leveduriformes foi observada nos tecidos de todos os órgãos dos camundongos inoculados com o isolado Pb285, inclusive no coração (Figura 7). A mesma situação foi observada nos tecidos dos órgãos avaliados, exceto do coração, dos camundongos inoculados com os isolados Pb261 e Pb31MAS. Também foi observada reação inflamatória piogranulomatosa com a presença de estruturas leveduriformes nos tecidos do baço, rim, peritônio e serosa intestinal dos camundongos inoculados com o isolado Pb281 (Figura 8). Nos camundongos inoculados com os isolados Pb29EE e Pb246 foi observada reação inflamatória piogranulomatosa com estruturas leveduriformes apenas nos tecidos do peritônio e diafragma. Nos tecidos dos camundongos inoculados com o isolado Pb639 nenhuma alteração foi detectada (Figura 9).

Aos 200 dias de inoculação, um processo inflamatório piogranulomatoso foi observado nos tecidos do peritônio, serosa intestinal e diafragma nos camundongos

inoculados com o isolado Pb285. Nos camundongos inoculados com os isolados Pb281 e Pb246 foi observada uma reação inflamatória piogranulomatosa leve nos tecidos do peritônio e da serosa intestinal. Reação inflamatória piogranulomatosa com infiltrado misto no tecido do peritônio e na serosa intestinal com a visualização de poucas estruturas leveduriformes dos camundongos inoculados com o isolado Pb235CRS foi observada. Nos tecidos dos camundongos inoculados com os isolados Pb639, Pb261, Pb31MAS e Pb29EE, nenhuma alteração microscópica foi detectada.

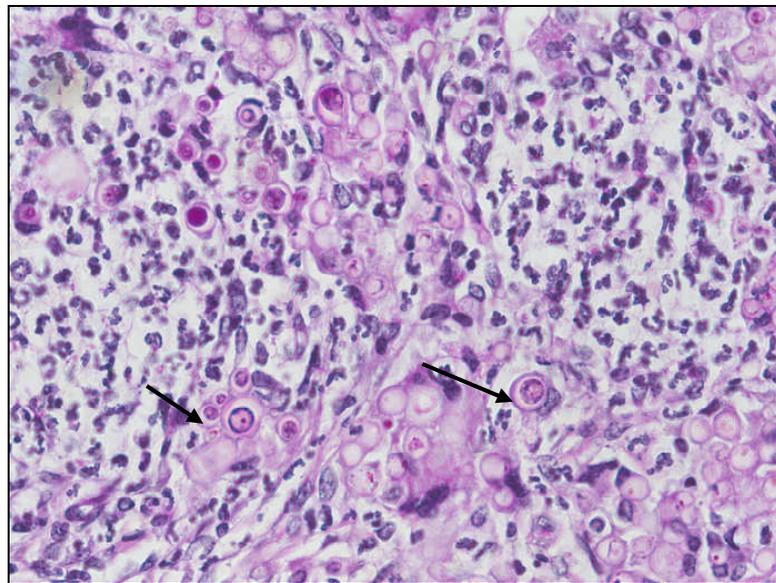


Figura 6. Corte histológico de diafragma de camundongo, aos 100 dias de inoculação com *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb235CRS. Tecido apresentando processo inflamatório piogranulomatoso com riqueza de células leveduriformes (—>). PAS (aumento original 630X).

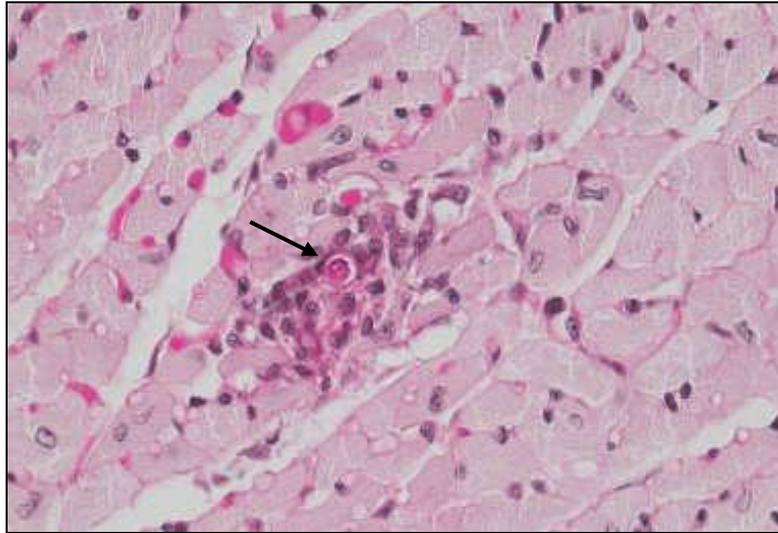


Figura 7. Corte histológico de coração de camundongo, aos 100 dias de inoculação com *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb285. Tecido cardíaco apresentando processo inflamatório granulomatoso com estruturas fúngicas leveduriformes (→). PAS (aumento original 630X).

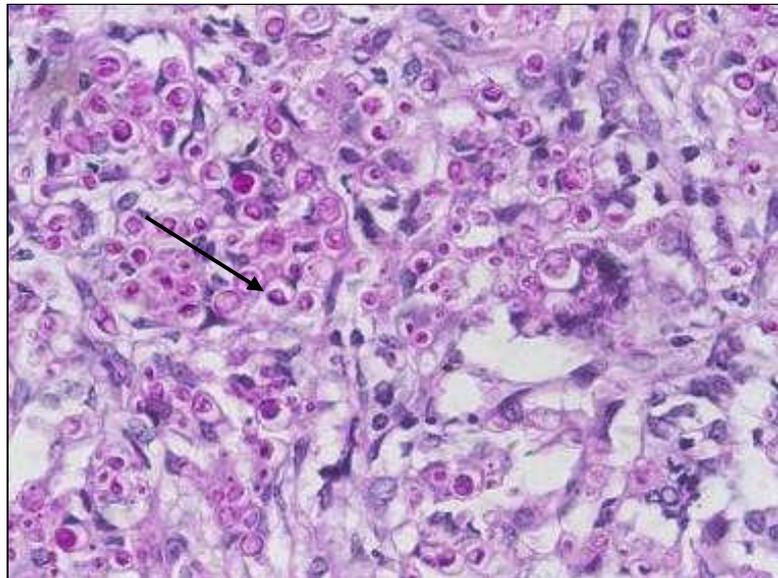


Figura 8. Corte histológico de diafragma de camundongo, aos 100 dias de inoculação com *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb281. Tecido apresentando processo inflamatório piogranulomatoso com riqueza de células leveduriformes (→). PAS (aumento original 630X).

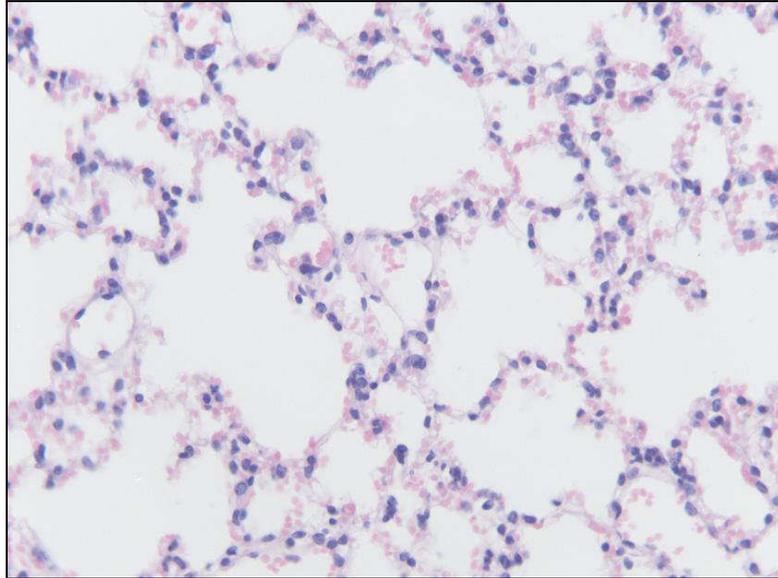


Figura 9. Corte histológico de pulmão de camundongo, aos 100 dias de inoculação com *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb639. Tecido pulmonar sem alterações. HE (aumento original 400X).

5.2.4- Índice esplênico

Os valores dos índices esplênicos estão demonstrados na tabela 4. A maioria dos camundongos inoculados apresentou valores de índice esplênico decrescentes durante o período avaliado, com exceção daqueles inoculados com os isolados Pb285 e Pb639. Foi verificado que os camundongos inoculados com os isolados Pb235CRS e Pb281 apresentaram índice esplênico significativamente maiores ($P > 0,05$), aos 100 dias pós-inoculação, em relação aos demais camundongos.

Aos 200 dias pós-inoculação, os camundongos inoculados com o isolado Pb285 apresentaram valores de índice esplênico alto no fim do período observado, enquanto que os inoculados com os isolados Pb281 e Pb639 apresentaram índices esplênicos considerados médios e para os três isolados os índices foram significativamente maiores ($*P < 0,05$) quando comparados com os índices dos

demais isolados. Já os camundongos inoculados com os isolados Pb235CRS, Pb261, Pb246, Pb31MAS e Pb29EE, os índices esplênicos chegaram a valores considerados normais ou perto da normalidade.

Os camundongos do grupo controle, inoculados com PBS, não apresentaram esplenomegalia (índice esplênico = 1) durante o período observado.

Tabela 4. Índice esplênico dos camundongos inoculados com isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* e PBS.

Isolados	Dias após inoculação		Média	Desvio padrão
	100 dias	200 dias		
Controle (PBS)	1	1	1	±0
Pb235CRS	2,3	1,3	1,8	±0,5
Pb285	1,2	5,2 *	3,2	±2
Pb261	1,8	1,1	1,45	±0,35
Pb246	1,2 *	1	1,15	±0,05
Pb31MAS	1,5	1,2	1,35	±0,15
Pb281	5*	2,8 *	3,9	±1,1
Pb29EE	1,5	1,2	1,35	±0,15
Pb639	1,6	2,9	2,25	±0,65

* $P < 0,05$

5.2.5- Reisolamento de células fúngicas

O reisolamento de células fúngicas do baço, fígado, pulmão e rim, na maioria dos camundongos inoculados com os isolados de *P. brasiliensis* só foi possível no 100º dia pós-inoculação. Exceção para os isolados Pb29EE e Pb639, cujo reisolamento ocorreu com 60 dias, e o isolado Pb235CRS cujo reisolamento de células fúngicas também foi possível, para o fígado e baço, aos 200 dias de inoculação. O número de células recuperado variou, entre os isolados, de acordo com o órgão estudado.

Aos 100 dias de inoculação, o reisolamento de células fúngicas dos fragmentos de baço foi possível para os isolados Pb281, Pb31MAS, Pb235CRS e para o isolado Pb639 aos 60 dias após inoculação. A quantidade de células recuperadas do baço foi significativamente maior ($*P < 0,05$) para os isolados Pb281 e Pb235CRS em relação aos isolados Pb639 e Pb31MAS (Figura 10). O reisolamento de células fúngicas do baço não foi possível para os isolados Pb29EE, Pb246, Pb261 e Pb285. Aos 200 dias de inoculação, o reisolamento de células fúngicas do baço só foi possível para o isolado Pb235CRS, cujo valor médio foi de 1,2 UFC (Log_{10}).

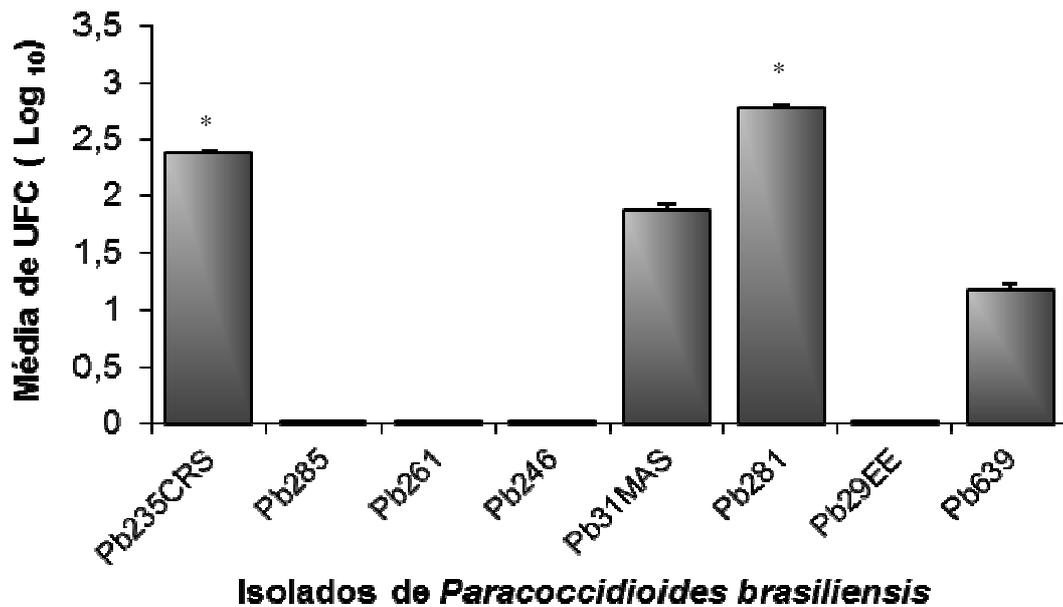


Figura 10. Número de células de *Paracoccidioides brasiliensis* recuperadas de fragmentos do baço de camundongos inoculados com os isolados estudados. Cada coluna representa a média de UFC recuperada de fragmentos do baço de três camundongos eutanasiados aos 100 dias de inoculação, com exceção dos isolados Pb29EE e Pb639 (aos 60 dias de inoculação). * $P < 0,05$.

O reisolamento de células fúngicas do pulmão só não foi possível para os isolados Pb281, Pb261 e Pb285. A quantidade de células recuperadas do pulmão foi significativamente maior ($*P < 0,05$) para os isolados Pb639, Pb31MAS, Pb246 e Pb235CRS em relação ao isolado Pb29EE (Figura 11).

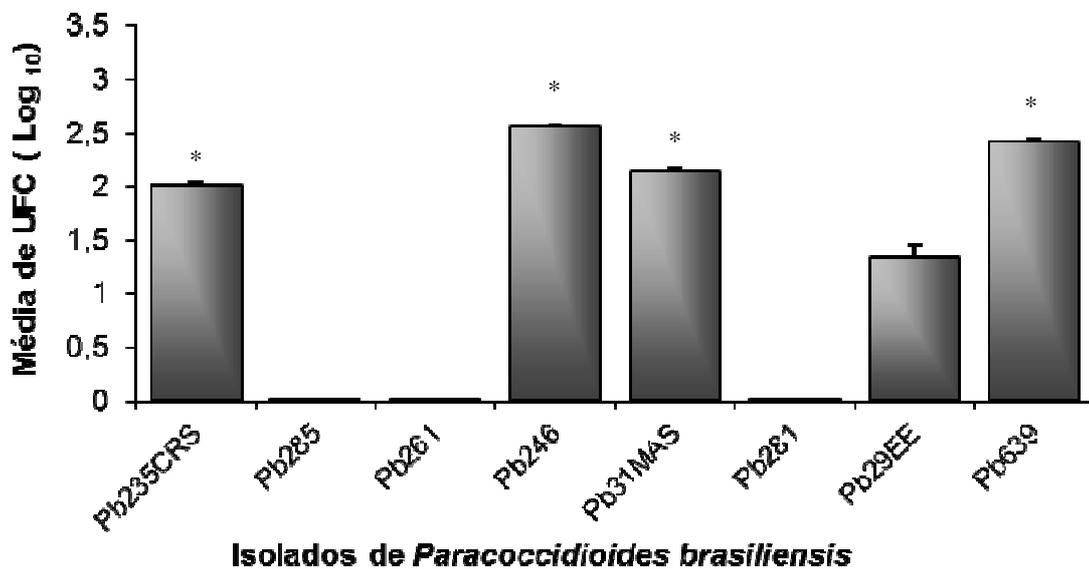


Figura 11. Número de células de *Paracoccidioides brasiliensis* recuperadas de um lobo do pulmão de camundongos inoculados com os isolados estudados. Cada coluna representa a média de UFC recuperada de um lobo do pulmão de três camundongos eutanasiados aos 100 dias de inoculação, com exceção dos isolados Pb29EE e Pb639 (aos 60 dias de inoculação). $*P < 0,05$.

O reisolamento de células fúngicas de fragmentos do fígado foi possível para a maioria dos isolados (Pb29EE, Pb639, Pb31MAS, Pb246, Pb261 e Pb235CRS) com exceção dos isolados Pb281 e Pb285. A quantidade de células recuperadas do fígado foi significativamente maior ($*P < 0,05$) para o isolado Pb29EE em relação aos demais isolados e, também, foi significativamente maior ($**P < 0,05$) para os isolados Pb639, Pb31MAS e Pb235CRS em relação aos isolados Pb246 e Pb261 (Figura 12). Aos 200 dias de inoculação, o reisolamento de células fúngicas do fígado só foi possível para o isolado Pb235CRS, cujo valor médio foi de 1,4 UFC (Log_{10}).

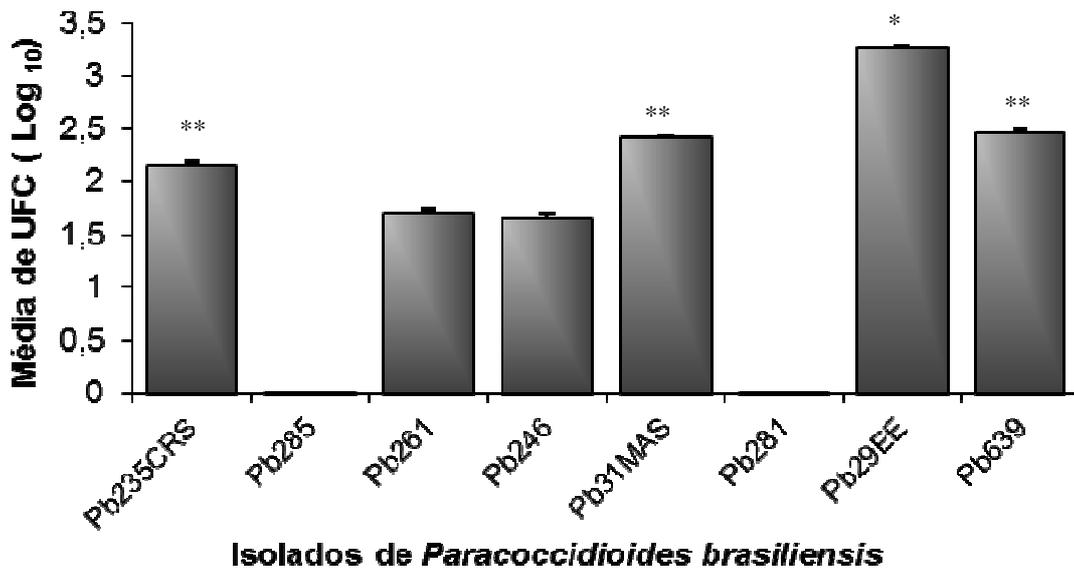


Figura 12. Número de células de *Paracoccidioides brasiliensis* recuperadas de fragmentos do fígado de camundongos inoculados com os isolados estudados. Cada coluna representa a média de UFC recuperada de fragmentos do fígado de três camundongos eutanasiados aos 100 dias de inoculação, com exceção dos isolados Pb29EE e Pb639 (aos 60 dias de inoculação). $*P < 0,05$ e $**P < 0,05$.

Já o reisolamento de células fúngicas do rim foi possível apenas para três dos isolados (Pb31MAS, Pb285 e Pb235CRS). O reisolamento de células fúngicas não foi possível para os isolados Pb29EE, Pb281, Pb639, Pb246 e Pb261. A quantidade de células recuperadas do rim foi significativamente maior ($*P < 0,05$) para o isolado Pb285 em relação aos isolados Pb31MAS e Pb235CRS (Figura 13).

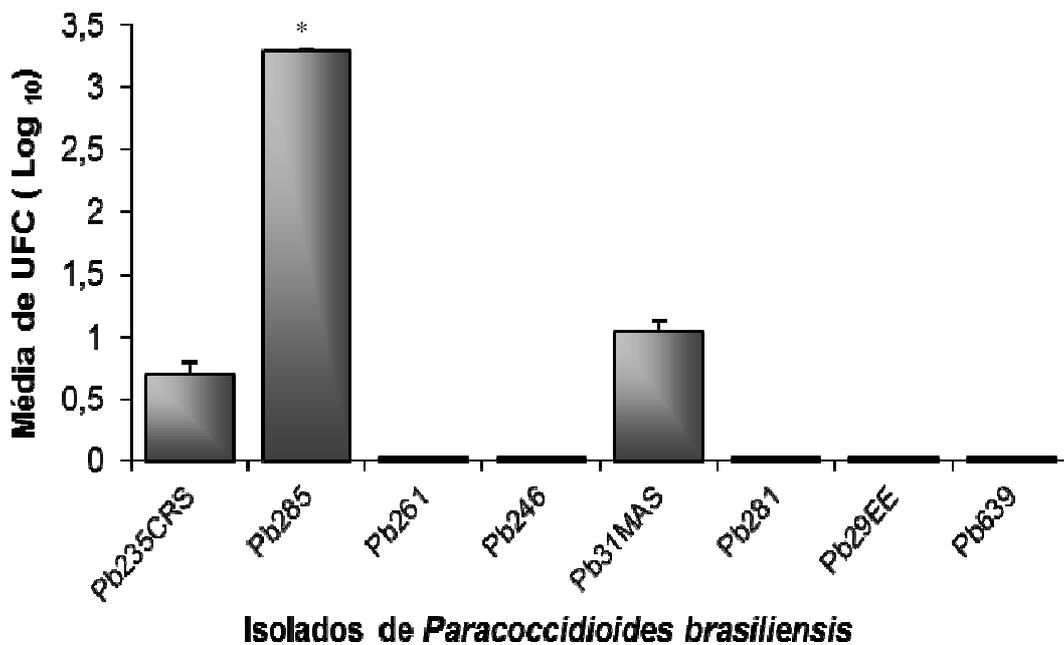


Figura 13. Número de células de *Paracoccidioides brasiliensis* recuperadas do rim de camundongos inoculados com os isolados estudados. Cada coluna representa a média de UFC recuperada do rim de três camundongos eutanasiados aos 100 dias de inoculação, com exceção dos isolados Pb29EE e Pb639 (aos 60 dias de inoculação). $*P < 0,05$.

5.3- ANÁLISE MOLECULAR

5.3.1- Polimorfismo de DNA

O DNA de todos os isolados de *P. brasiliensis* foi isolado com sucesso e qualidade.

A reprodutibilidade da reação de RAPD-PCR foi determinada por cinco repetições em diferentes ocasiões, obtendo-se os mesmos resultados para todos os *primers* utilizados.

Dos seis *primers* utilizados nas reações de amplificação, três foram capazes de amplificar todas as amostras (pré e pós-passagem em animal), permitindo a análise de similaridade entre elas: *primer 2* (5'-d[GTTTCGCTCC]-3'); *primer 4* (5'-d[AAGAGCCCGT]-3') e *primer 6* (5'-d[CCCGTCAGCA]-3') (Figuras 14, 15 e 16).

Foram observadas mudanças no perfil genético apresentados em todos os géis corridos com o produto da amplificação do DNA de todos os isolados após passagem em animal, com os três *primers*.

No perfil de bandas apresentado pelo amplificado do DNA com o *primer 2*, observamos o aparecimento de bandas nos seguintes isolados, pós-passagem em animal: Pb261(1200bp, 1100bp e 380bp), Pb235CRS (900bp), Pb281(900bp), Pb246 (850bp) e Pb639 (380bp). No perfil de bandas após amplificação com o *primer 4*, foi observado o aparecimento de bandas nos isolados pós-passagem em animal: Pb261 (1500bp), Pb281 (400bp), Pb246 (700bp), Pb639 (400bp), Pb31MAS (380bp) e Pb29EE (800bp e 380bp). No perfil de bandas apresentado pelo amplificado do DNA com o *primer 6* observamos o aparecimento de bandas nos isolados pós-passagem em animal: Pb261(100bp), Pb285 (1500bp), Pb281 (100bp), Pb246 (100bp), Pb639 (1500, 600bp, 300bp e 200bp), Pb31MAS (100bp) e Pb29EE (100bp) (Figuras 14-A, 15-A e 16-A).

No perfil de bandas apresentado pelo amplificado do DNA com o *primer 2*, observamos o desaparecimento de bandas nos seguintes isolados, pós-passagem em animal: Pb261(1500bp, 600bp e 400bp), Pb285 (1500bp, 1000bp, 900bp e 700bp), Pb246 (2072bp, 1500bp, 1200bp, 900bp e 480bp), Pb639 (1500bp, 1200bp, 900bp, 850bp e 700bp), Pb31MAS (2072bp) e Pb29EE (400bp). No perfil de bandas após amplificação com o *primer 4*, foi observado o desaparecimento de bandas nos isolados, pós-passagem em animal: Pb261 (700bp), Pb285 (2072bp, 1500bp, 1000bp e 900bp), Pb235CRS (2072bp, 1500bp, 1000bp e 900bp), Pb281 (2072bp, 1500bp, 1000bp e 900bp), Pb246 (1000bp, 900bp e 550bp), Pb639 (2072bp, 1500bp, 900bp, 800bp e 550bp), Pb31MAS (1200bp e 1000bp) e Pb29EE (700bp). Já no perfil de bandas apresentado pelo amplificado do DNA com o *primer 6* observamos o desaparecimento de bandas nos isolados pós-passagem em animal: Pb261(900bp, 800bp e 600bp), Pb285 (800bp,700bp e 600bp), Pb246 (2072bp), Pb281 (550bp e 400bp), Pb246 (2072bp, 1500bp, 800bp e 400bp), Pb639 (550bp e 400bp), Pb31MAS (550bp) e Pb29EE (900bp, 600bp e 400bp) (Figuras 14-B, 15-B e 16-B).

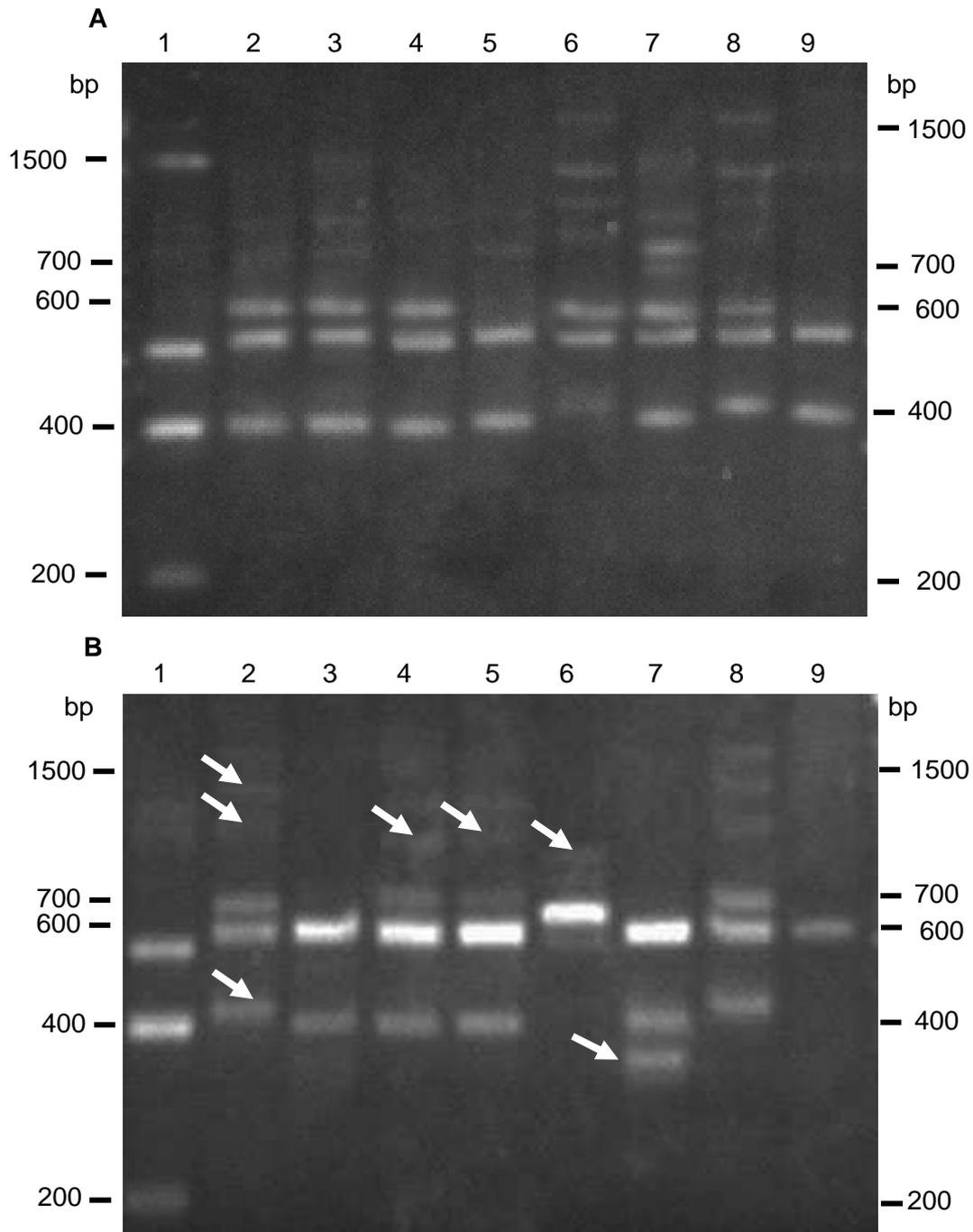


Figura 14. Comparação em gel de agarose 2,5%, dos perfis de fragmentos de DNA amplificados por RAPD-PCR dos isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* pré (A) e pós-passagem (B) em animal utilizando o *primer 2*. Linha 1: BL21- controle (*E. coli*); Linha 2: Pb261; Linha 3: Pb285; Linha 4: Pb235CRS; Linha 5: Pb281; Linha 6: Pb246; Linha 7: Pb639; Linha 8: Pb31MAS; linha 9: Pb29EE. Os números à direita e à esquerda indicam o marcador de peso molecular (PM): 100bp DNA Ladder. Setas (gel B) destacando bandas que apareceram após passagem em animal.

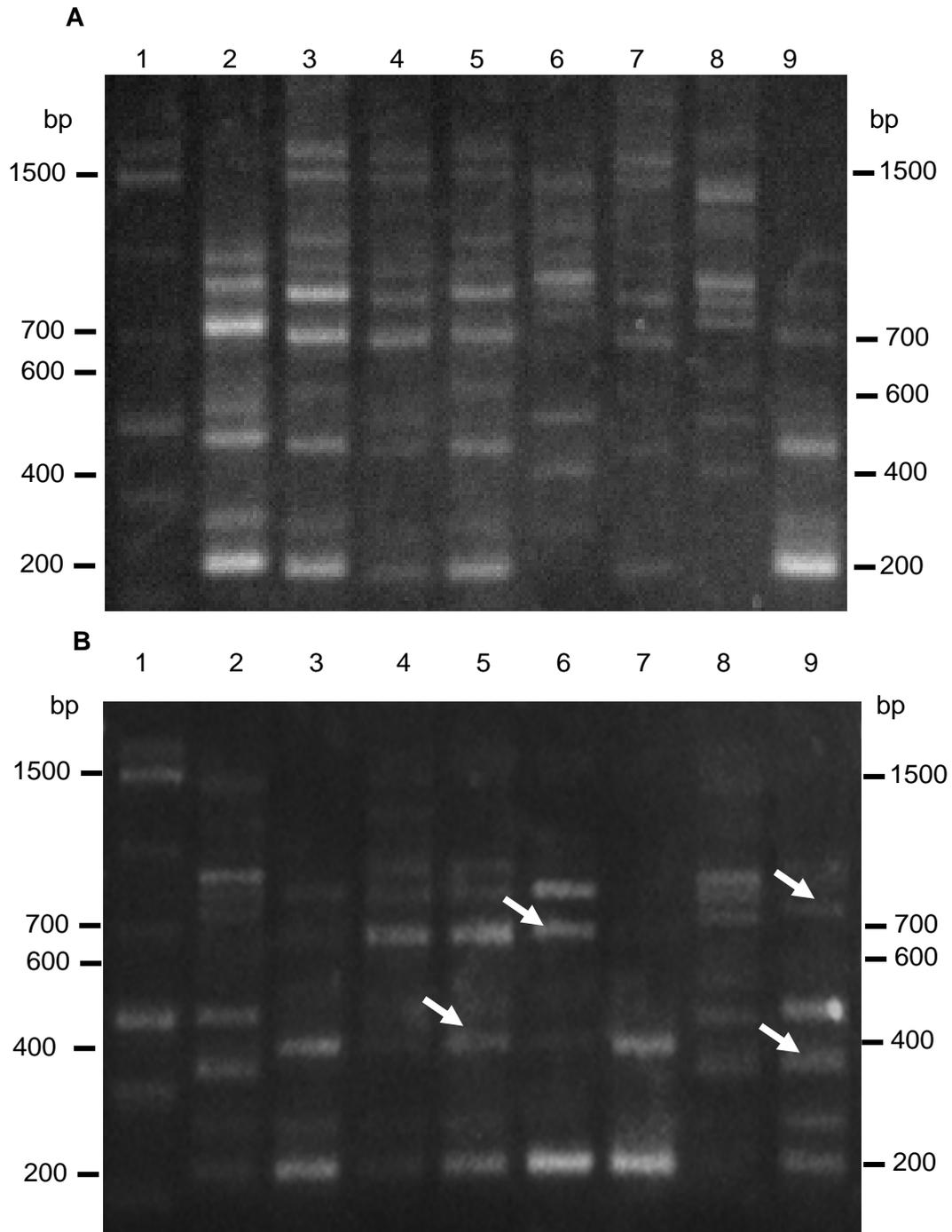


Figura 15. Comparação em gel de agarose 2,5%, dos perfis de fragmentos de DNA amplificados por RAPD-PCR dos isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* pré (A) e pós-passage (B) em animal utilizando o *primer* 4. Linha 1: BL21- controle (*E. coli*); Linha 2: Pb261; Linha 3: Pb285; Linha 4: Pb235CRS; Linha 5: Pb281; Linha 6: Pb246; Linha 7: Pb639; Linha 8: Pb31MAS; linha 9: Pb29EE. Os números à direita e à esquerda indicam o marcador de peso molecular (PM): 100bp DNA Ladder. Setas (gel B) destacando bandas que apareceram após passagem em animal.

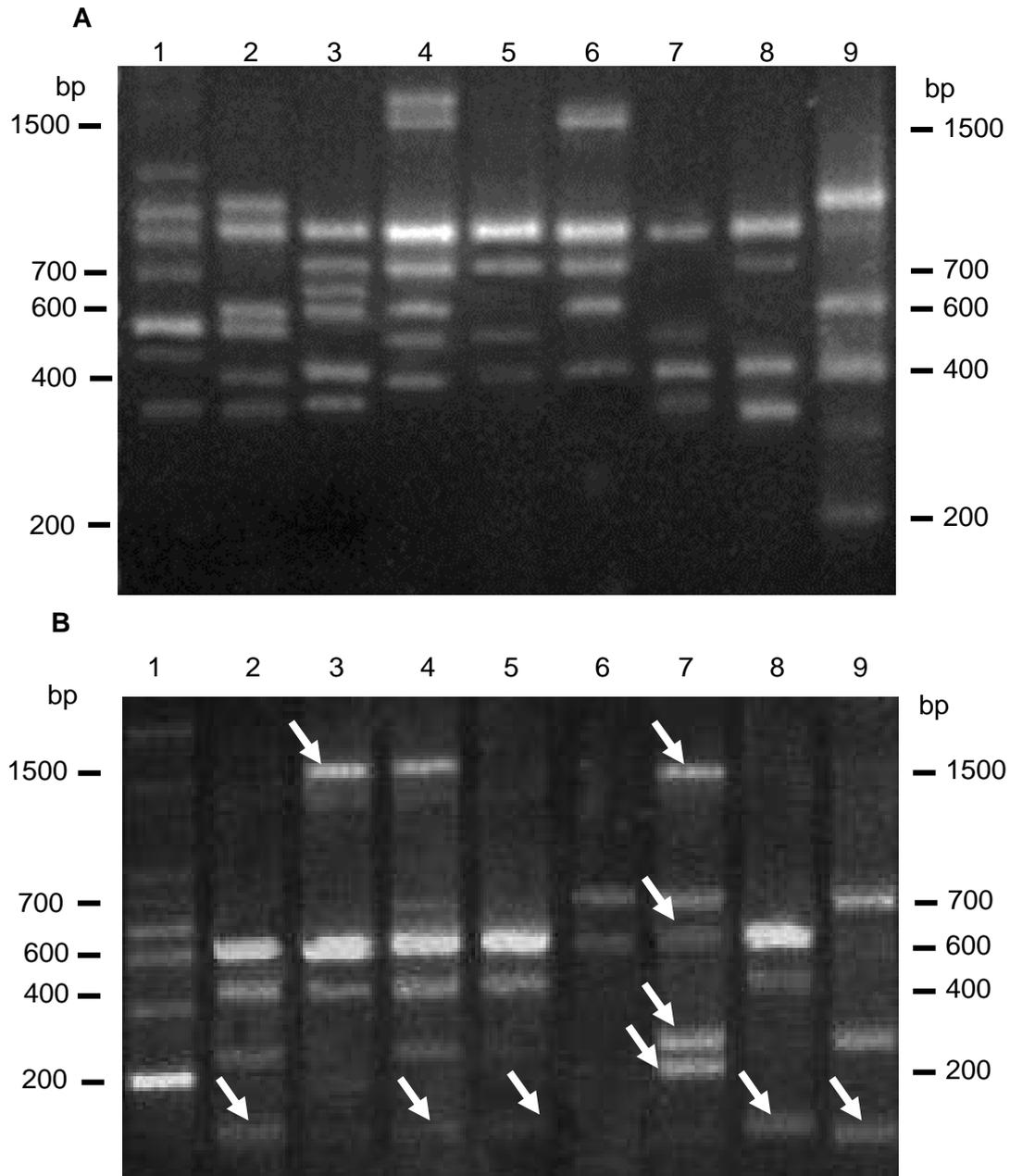


Figura 16. Comparação em gel de agarose 2,5%, dos perfis de fragmentos de DNA amplificados por RAPD-PCR dos isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* pré (A) e pós-passagem (B) em animal utilizando o *primer* 6. Linha 1: BL21- controle (*E. coli*); Linha 2: Pb261; Linha 3: Pb285; Linha 4: Pb235CRS; Linha 5: Pb281; Linha 6: Pb246; Linha 7: Pb639; Linha 8: Pb31MAS; linha 9: Pb29EE. Os números à direita e à esquerda indicam o marcador de peso molecular (PM): 100bp DNA Ladder. Setas (gel B) destacando bandas que apareceram após passagem em animal.

O coeficiente de similaridade de Jaccard dos perfis de amplificação dos oito isolados pré e pós-passagem em animal foi calculado, e os agrupamentos produzidos foram utilizados para gerar os dendrogramas. Para essa análise cada banda revelada nos géis foi contada como única e sua intensidade não foi levada em consideração, sendo os perfis somente analisados quanto à presença ou ausência das bandas.

Os isolados puderam ser divididos em grupos de acordo com um coeficiente de similaridade de 76%, variando esse agrupamento de acordo com o *primer* e as condições experimentais utilizadas. Na amplificação utilizando o *primer* 2, os oito isolados pré-passagem em animal puderam ser divididos em quatro grupos (**a**: Pb261, Pb281 e Pb235CRS; **b**: Pb285 e Pb639; **c**: Pb246 e Pb31MAS; **d**: Pb29EE) (Figura 17). Já pós-passagem em animal foram obtidos cinco grupos (**a**: Pb261 e Pb31MAS; **b**: Pb235CRS e Pb281; **c**: Pb285 e Pb639; **d**: Pb246; **e**: Pb29EE) (Figura 18).

O dendrograma gerado a partir da análise dos fragmentos gerados na amplificação com o *primer* 4, demonstrou que os oito isolados pré-passagem em animal puderam ser divididos em seis grupos (**a**: Pb261; **b**: Pb235CRS; **c**: Pb31MAS; **d**: Pb285, Pb281 e Pb639; **e**: Pb29EE; **f**: Pb246) (Figura 19). O mesmo número de grupos foi obtido com os isolados pós-passagem em animal, porém os isolados por grupo foram diferentes (**a**: Pb261 e Pb31MAS; **b**: Pb29EE; **c**: Pb285; **d**: Pb639; **e**: Pb235CRS e Pb281; **f**: Pb246) (Figura 20).

O dendrograma gerado a partir da análise dos fragmentos gerados na amplificação com o *primer* 6, demonstrou que os oito isolados pré-passagem em animal puderam ser divididos em cinco grupos (**a**: Pb261, Pb235CRS e Pb281; **b**: Pb285 e Pb31MAS; **c**: Pb639; **d**: Pb246; **e**: Pb29EE) (Figura 21). Enquanto os oito

isolados pós-passagem em animal puderam ser divididos em sete grupos (**a**: Pb261; **b**: Pb285 e Pb281; **c**: Pb235CRS; **d**: Pb31MAS; **e**: Pb29EE; **f**: Pb639; **g**: Pb246) (Figura 22).

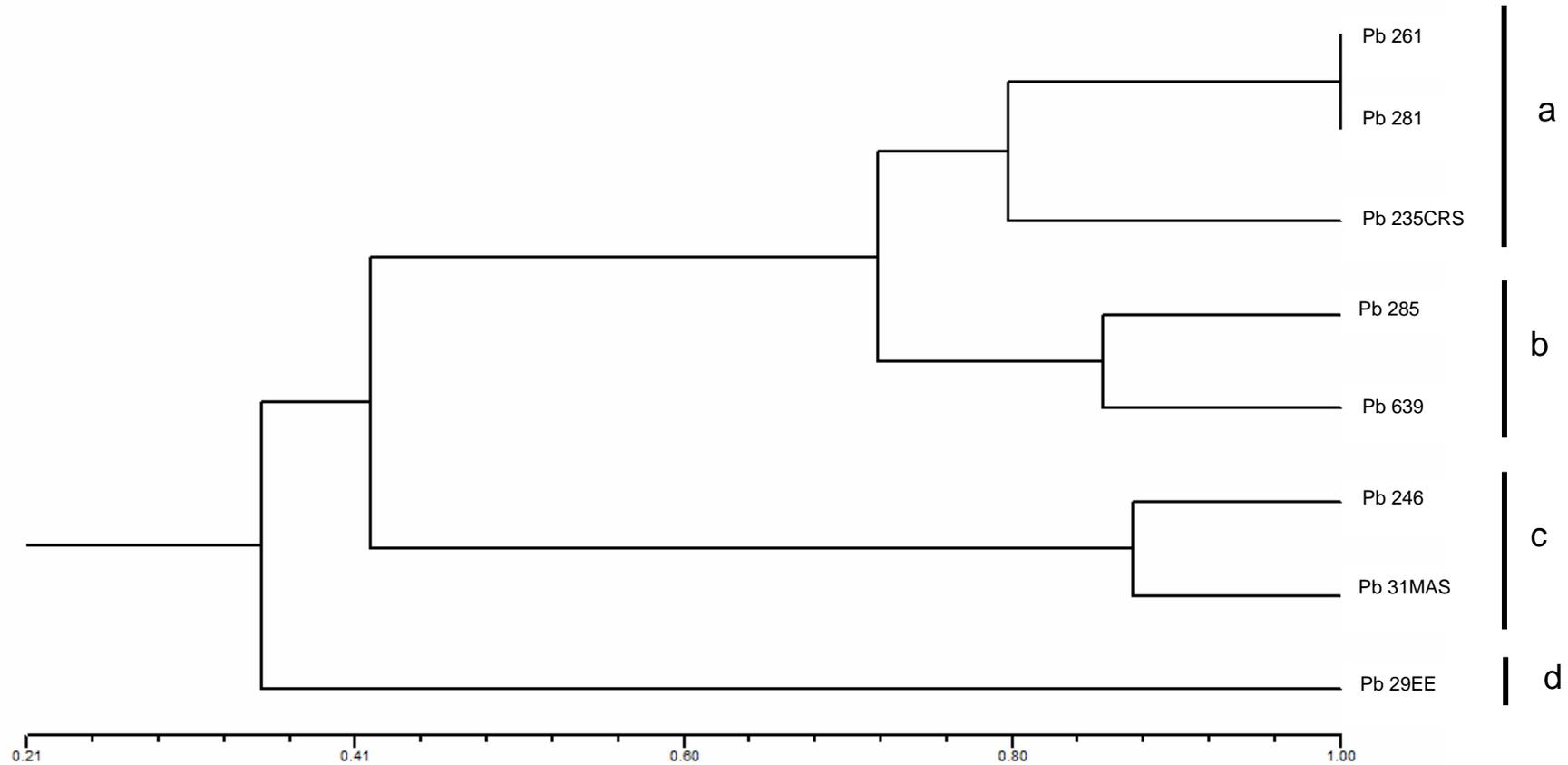


Figura 17. Dendrograma baseado em perfis de amplificação de DNA dos oito isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, pré-passagem em animal, por RAPD-PCR com o *primer* 2. Quatro grupos (a, b, c, d) foram destacados considerando 76% de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA.

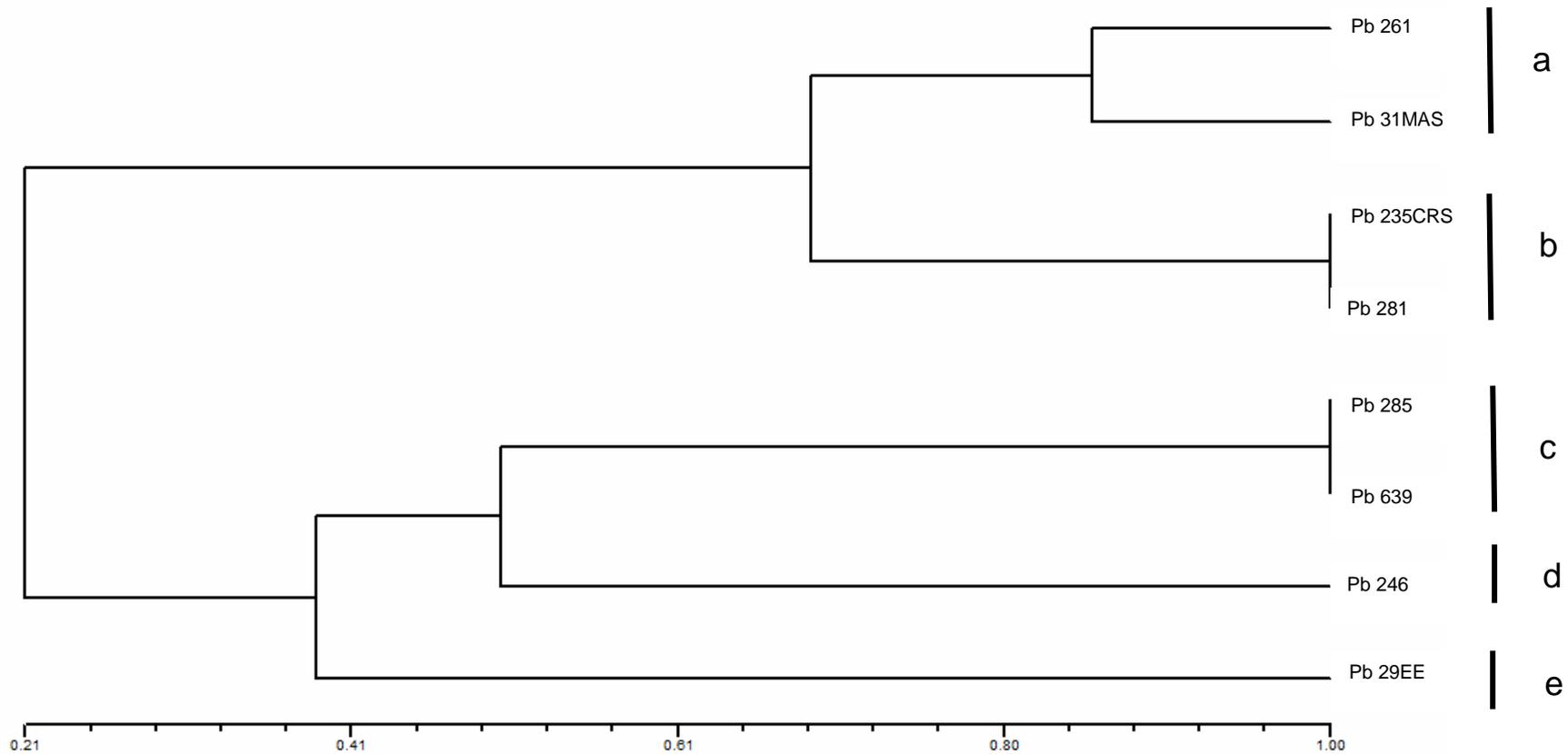


Figura 18. Dendrograma baseado em perfis de amplificação de DNA dos oito isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, pós-passage em animal, por RAPD-PCR com o *primer* 2. Cinco grupos (a, b, c, d, e) foram destacados considerando 76% de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA.

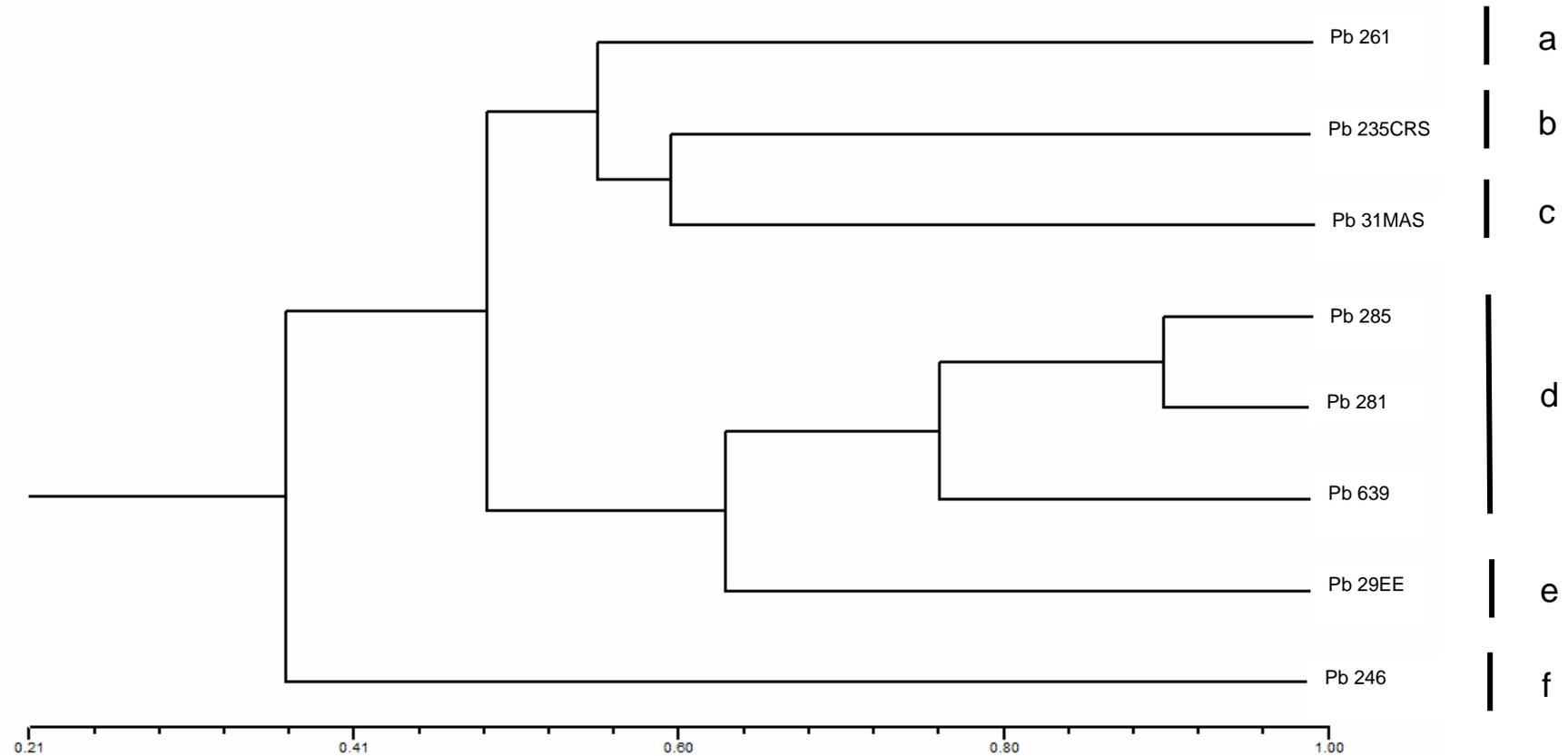


Figura 19. Dendrograma baseado em perfis de amplificação de DNA dos oito isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, pré-passagem em animal, por RAPD-PCR com o *primer* 4. Seis grupos (a, b, c, d, e, f) foram destacados considerando 76% de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA.

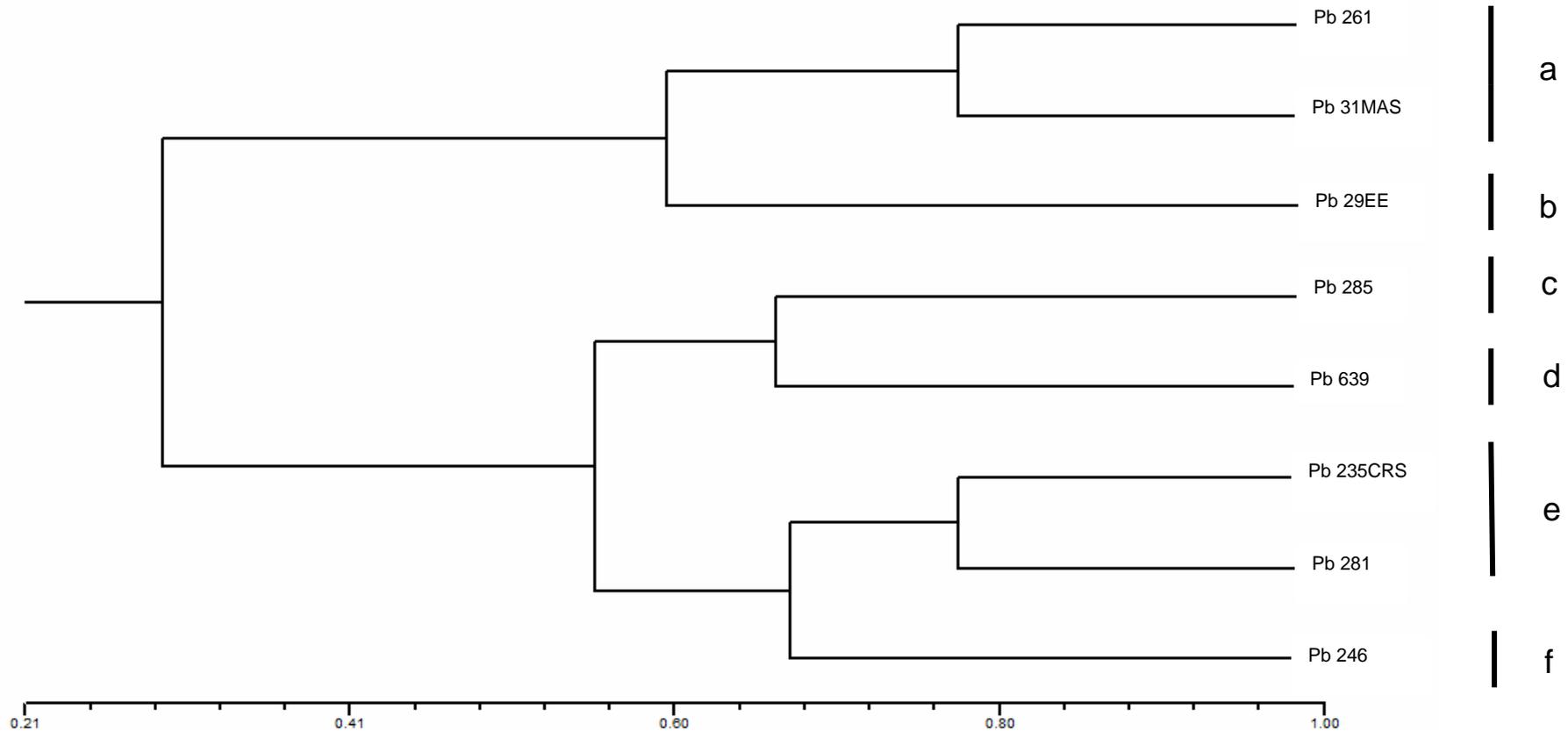


Figura 20. Dendrograma baseado em perfis de amplificação de DNA dos oito isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, pós-passage em animal, por RAPD-PCR com o *primer* 4. Seis grupos (a, b, c, d, e, f) foram destacados considerando 76% de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA.

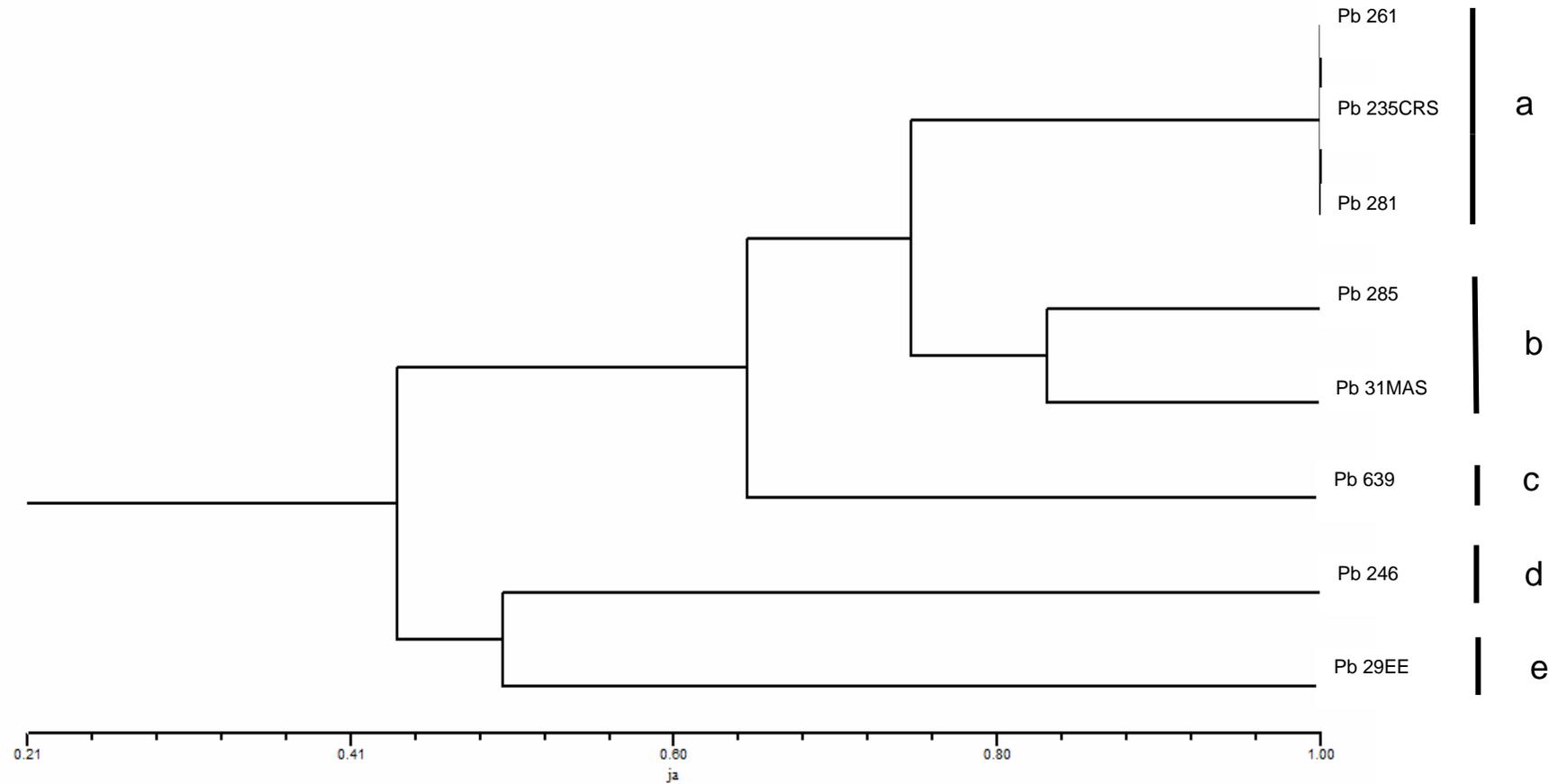


Figura 21. Dendrograma baseado em perfis de amplificação de DNA dos oito isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, pré-passagem em animal, por RAPD-PCR com o *primer 6*. Cinco grupos (a, b, c, d, e) foram destacados considerando 76% de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA.

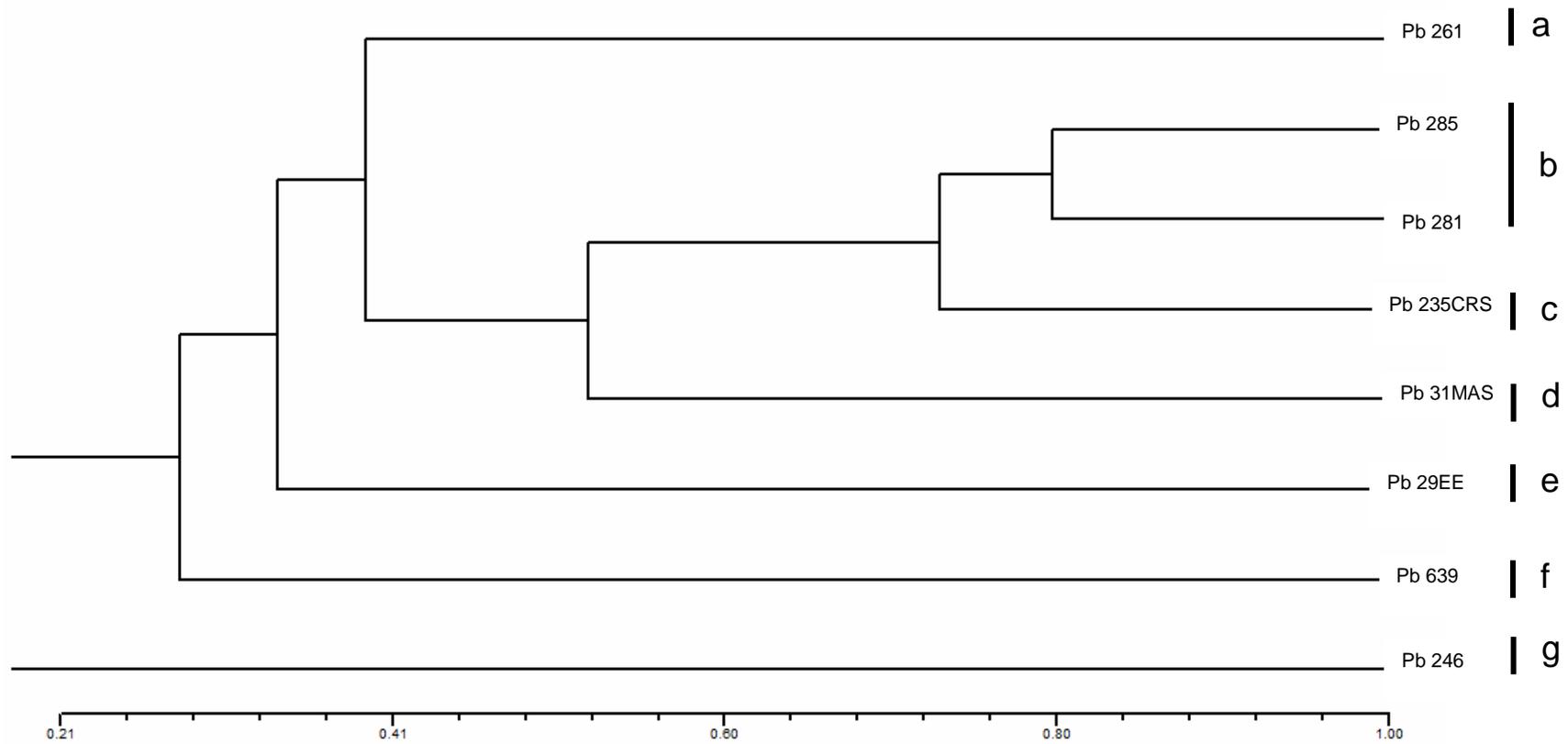


Figura 22. Dendrograma baseado em perfis de amplificação dos oito isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, pós-passagem em animal, por RAPD-PCR com o *primer* 6. Sete grupos (a, b, c, d, e, f, g) foram destacados considerando 76% de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento UPGMA.

6. DISCUSSÃO

Os mecanismos responsáveis por alterações fenotípicas em fungos, reversíveis em alguns casos, não são bem compreendidos e podem resultar de diversos processos, tais como diferentes métodos de preservação, passagens consecutivas *in vitro*, passagens *in vivo*, mudanças espontâneas, exposição à luz ultravioleta, entre outros. Essas mudanças têm sido descritas em vários fungos como *Candida albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae* (Slutsky *et al.*, 1985; Clemons *et al.*, 1996; Fries *et al.*, 2002; Borba *et al.*, 2005).

Neste trabalho, observamos a morfologia macro e microscópica de oito isolados de *P. brasiliensis*, provenientes de pacientes do estado do Mato Grosso, apresentando forma clínica crônica da doença, na fase leveduriforme, pré e pós-passagem em modelo murino experimental. Durante as avaliações verificamos que os isolados pré-passagem em animal apresentaram diferenças micromorfológicas entre eles e que não houve diferenças significativas na macro e micromorfologia dos isolados após a passagem em animal. Diferentemente do que observamos, em relação às mudanças fenotípicas em *P. brasiliensis* após passagem animal, um estudo realizado por Svidzinski *et al.* (1999) mostrou que as células leveduriformes desse fungo exibiram um número limitado de leveduras comparado ao número observado antes da passagem em camundongo. Eles afirmaram que a adversidade do ambiente causada pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, modificação do pH do tecido infectado, bem como a alta concentração de fungos encontrados no tecido do animal pode ter levado ao decréscimo na reprodução do fungo. Nesse estudo os autores apontam para a necessidade de outras investigações a fim de elucidar o papel

que parâmetros morfológicos do fungo possam assumir na história natural da doença. Ademais, Casadevall (2005) afirmou que a passagem de fungos por um hospedeiro pode levar ao surgimento de variantes morfológicas com diferentes estruturas de superfície por seleção antigênica.

Durante a observação das características micromorfológicas dos isolados pré e pós-passagem em animal, destacamos que os isolados Pb235CRS, Pb246 e Pb261 apresentaram filamentos, dilatações inter-septais e células leveduriformes com pouca ou média gemulação quando comparados aos demais isolados, o que nos leva a sugerir que estes isolados não completam o seu dimorfismo quando mantidos *in vitro* nas condições descritas na metodologia (em meio PYG ágar incubados à temperatura de 36° C), porém, é provável, que nos camundongos inoculados esse processo tenha se completado, uma vez que, a presença de filamentos nos tecidos avaliados não foi verificada. De acordo com Svidzinski *et al.* (1999), a ocorrência de formas filamentosas de *P. brasiliensis* em amostras clínicas tem sido raramente observada.

Mudanças fenotípicas, *in vitro*, já foram relatadas em isolados de *P. brasiliensis*. San-Blas & San-Blas (1985) obtiveram um isolado, sensível ao calor, incapaz de crescer a 37°C e que crescia a 22°C em fase leveduriforme. Eles observaram que as células não eram esféricas como as células leveduriformes do tipo selvagem, e as colônias consistiam de células ovais isoladas com capacidade de formar pseudo-hifas pequenas e espessas. A obtenção de formas atípicas de *P. brasiliensis*, devido à estocagem em ágar *slant* também já foi descrita ressaltando a presença de colônias cerebriformes, com profundos sulcos, à temperatura ambiente, além de células leveduriformes

com ou sem brotamentos, clamidosporos e ramificações filamentosas (Hamdan & Ferrari, 1995; Tanaka *et al.*, 2001).

Lacaz (1982) descreveu que diferentes isolados de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme *in vitro* podem apresentar morfologias diversas, que variam desde a forma típica (“roda de leme”), a formas alongadas semelhantes a filamentos. E ainda Theodoro *et al.* (2008) ao avaliarem aspectos morfológicos na transição de micélio para a fase de levedura de diferentes isolados de *P. brasiliensis*, observaram uma variedade de padrões fenotípicos como células de leveduras com aspecto circular a alongado, semelhante à pseudo-hifas e ainda morfologia frequentemente considerada como “atípica”, destacando a necessidade de mais estudos que tentem elucidar a conexão entre morfologia, virulência, fisiologia e perfil genético.

Segundo San-Blas & San-Blas (1985) as formas de transição de *P. brasiliensis* são dilatações intercalares e terminais na hifa que se apresentam nas primeiras horas da transição da fase micelial à fase leveduriforme ou vice-versa ou quando o fungo cresce em temperaturas intermediárias. A descrição destes autores poderia explicar as formas encontradas por nós (formas de transição), sendo uma característica peculiar dos isolados Pb235CRS, Pb246 e Pb261. Conclui-se então que esse fungo é bastante exigente às condições de cultura e à temperatura de incubação, necessitando de fatores adicionais ao meio de cultura para realizar o completo dimorfismo *in vitro*. San-Blas & Vernet (1977) descreveram que a síntese de α -1,3 glucana, o principal polissacarídeo da parede celular da fase leveduriforme, sintetizado durante a transformação de $M \Rightarrow L$, é induzida por fatores externos, entre eles o soro fetal bovino. Estudos de uma variante morfológica de *P. brasiliensis*, caracterizada como colônias

leveduriformes crescendo à temperatura ambiente, obtida quando conídios foram incubados em meio infusão de cérebro e coração (BHI) enriquecido com soro fetal bovino, sugeriram que o soro fetal facilitaria o processo de gemulação e o acúmulo de α -glucanas, característico das células leveduriformes desse fungo (Villar *et al.*, 1988; Villar & Restrepo, 1989).

Os demais isolados, estudados aqui, apresentaram *in vitro*, pré e pós-passagem em animal, grande quantidade de leveduras gemulando, como também ao exame histopatológico dos órgãos dos camundongos, com exceção dos órgãos de camundongos inoculados com o isolado Pb639, um processo inflamatório piogranulomatoso ou granulomatoso com presença de estruturas fúngicas leveduriformes características. As características morfológicas observadas nos isolados estudados sugeriram que os mesmos foram capazes de manter o processo dimórfico, principalmente *in vivo*, e consequente estabelecimento da infecção.

Através do processo dimórfico o fungo é capaz de produzir uma fase morfológica mais adequada para a invasão e progressão da doença. O dimorfismo e a tolerância térmica são considerados fatores de virulência importantes para a adaptação do patógeno às condições do hospedeiro, como a alta temperatura, a influência hormonal e ao conjunto de eventos durante a resposta imune (Kurokama *et al.*, 1998). Ensaio sobre paracoccidiodomicose experimental induzida por inalação de conídios, concluíram que os propágulos transformam-se rapidamente em células leveduriformes para se adequarem às condições do tecido do hospedeiro, e que uma vez realizado o processo dimórfico, são capazes de multiplicar-se livremente dentro do parênquima pulmonar (McEwen *et al.*, 1987).

Estudos sobre a virulência de várias espécies fúngicas utilizando modelo murino experimental, no sentido de avaliar a capacidade invasiva e a multiplicação do fungo em órgãos internos através de observações de sinais clínicos da doença e reisolamento de células fúngicas de diferentes órgãos, do perfil imunológico do hospedeiro e análises histopatológicas durante a infecção, têm sido realizados, com sucesso (Fries & Casadeval, 1998; Fernandes *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2004; Durkin *et al.*, 2004; Brito *et al.*, 2011).

A virulência dos isolados de *P. brasiliensis*, estudados aqui, foi avaliada através da utilização de modelo murino experimental. Os resultados nos permitiram determinar perfis diferentes de virulência dos isolados. Vários autores já descreveram diferentes graus de virulência entre isolados de *P. brasiliensis* e também a lenta progressão e maior resistência de camundongos BALB/c à PCM murina (Castaneda *et al.*, 1987; McEwen *et al.*, 1987). Segundo os critérios utilizados em nosso estudo (sinais clínicos dos camundongos, índice esplênico, reisolamento de células fúngicas, lesões em diferentes órgãos e taxa de sobrevivência) o isolado Pb235CRS apresentou grau de virulência significativamente maior, em relação aos demais isolados. O reisolamento de células viáveis foi possível, em quantidades significativas, de todos os órgãos avaliados, aos 100 dias de inoculação, e somente para esse isolado o reisolamento foi possível aos 200 dias de inoculação. Além de ter sido o isolado que causou um menor índice cumulativo de sobrevivência nos camundongos, confirmando o sucesso na instalação de uma infecção letal. De acordo com Singer-Vermes *et al.* (1993), a estimativa do número de fungos viáveis em órgãos de camundongos infectados por unidades formadoras de colônias (UFC) é um dos mais diretos e confiáveis métodos para avaliar a gravidade da doença.

É importante destacar, que nos órgãos em que foi possível o reisolamento de células fúngicas do isolado Pb235CRS, alterações como processo inflamatório com a formação de granuloma, que tem a função de conter a disseminação das células fúngicas (Da Silva *et al.*, 2009), não foram observadas. No tecido renal foi visualizada a presença de leveduras sendo contidas por processo inflamatório piogranulomatoso, reforçando a função descrita acima, uma vez que o reisolamento de células deste órgão foi menor.

Com relação aos isolados Pb285, Pb261 e Pb31MAS, os mesmos apresentaram grau de virulência menor que o isolado Pb235CRS, porém maior que os isolados Pb281, Pb246, Pb639 e Pb29EE. Nos camundongos inoculados com os isolados Pb285 e Pb261 a presença do fungo nos tecidos avaliados foi comprovada, principalmente, pela análise histopatológica, onde também foi possível observar a intensa reação inflamatória com formação de granulomas na maioria dos tecidos, demonstrando a contenção da infecção pelo hospedeiro e possível morte do microrganismo, fato este corroborado pelo não reisolamento de células fúngicas na maioria dos órgãos, com exceção do fígado (Pb261) e rim (Pb285) onde a reação inflamatória não foi tão intensa no tempo avaliado (100 dias). Para o isolado Pb31MAS a presença do fungo nos tecidos avaliados foi comprovada pelo reisolamento e/ou pela análise histopatológica, onde foi possível verificar a intensa reação inflamatória com formação de granulomas, porém não comprometeu, no tempo de 100 dias após inoculação, o reisolamento de células fúngicas dos órgãos avaliados. Estes resultados sugerem uma maior capacidade do isolado Pb31MAS em resistir às pressões do hospedeiro em relação aos isolados Pb285 e Pb261, no entanto, mesmo apresentando essa possível capacidade o isolado Pb31MAS provocou baixa mortalidade nos

camundongos, assim como os isolados Pb285 e Pb261 para o mesmo período de observação.

Comparando os isolados Pb285, Pb261 e Pb31MAS, entre si, observamos que um foi tão invasivo quanto o outro, apesar de pequenas diferenças encontradas no reisolamento de células fúngicas, presença em tecidos verificada por histopatologia e índice esplênico. Nos camundongos inoculados com o isolado Pb31MAS foi possível o reisolamento de células fúngicas de todos os órgãos avaliados, diferente do que foi encontrado para os isolados Pb285 e Pb261. No entanto, a presença dos isolados Pb285 e Pb261 foi comprovada pelos estudos histopatológicos em todos os tecidos avaliados. E ainda, os camundongos inoculados com os isolados Pb31MAS e Pb261 apresentaram índices esplênicos próximos aos valores do grupo controle ao final dos 200 dias de observação, enquanto os camundongos inoculados com o isolado Pb285 não, pois apresentaram valor bastante alto de índice esplênico (5,2). Porém, se levarmos em consideração a taxa de sobrevivência dos camundongos, os isolados, sem distinção, ao final do experimento, foram capazes de matar somente 30% dos camundongos.

Para os isolados Pb246, Pb281, Pb639 e Pb29EE o grau de virulência foi menor em relação aos demais. Nos camundongos inoculados com os isolados Pb246 e Pb281 a presença do fungo não foi observada na maioria dos órgãos avaliados, aos 100 dias de inoculação. Já nos camundongos inoculados com os isolados Pb639 e Pb29EE o mesmo foi observado, porém células viáveis só foram reisoladas no tempo de 60 dias após inoculação (nova inoculação realizada na tentativa de reisolar células, como descrito no item 2.5 de resultados), provavelmente devido a eliminação de células fúngicas dos órgãos

avaliados, nos tempos de 100 e 200 dias pós-inoculação, hipótese reforçada pela não visualização de células fúngicas nos tecidos dos órgãos utilizados para o reisolamento e a não visualização de granulomas durante as avaliações histopatológicas. E ainda para os quatro isolados a taxa de mortalidade variou de 10 a 0%, reforçando a hipótese de menor capacidade de estabelecimento de uma infecção nas condições impostas.

Singer-Vermes *et. al.* (1993), ao avaliarem a eficiência do número de células recuperadas de órgãos de camundongos infectados como parâmetro para determinar camundongos susceptíveis ou resistentes ao *P. brasiliensis*, determinou como o melhor parâmetro a quantidade de células recuperadas dos pulmões. No entanto, o mesmo grupo no ano seguinte (Singer-Vermes *et al.*, 1994), em estudo de avaliação da patogenicidade e imunogenicidade com seis amostras clínicas de *P. brasiliensis*, observou que o tropismo de células de um dos isolados para os pulmões dos camundongos não tinha paralelo ao apresentado pelo paciente com manifestação pulmonar da doença, de onde esse isolado foi obtido. Ou seja, a associação entre letalidade e maior quantidade de UFCs proveniente de pulmão não foi encontrada para um dos isolados. Fazendo um paralelo do parâmetro para a determinação da patogenicidade, descrito pelos autores acima, ao que foi observado nesse estudo ressaltamos que apesar do isolado Pb235CRS não ter sido recuperado em grandes quantidades do pulmão ele, mesmo assim, foi o isolado mais letal para o modelo utilizado em nossos estudos, quando comparado aos demais. Por outro lado, Singer-Vermes *et. al.* (1993), observaram resultados crescentes de contagens de UFCs, quando utilizaram camundongos com susceptibilidade intermediária (BALB/c), de acordo com o tempo de infecção, a partir do baço,

fígado e pulmões. Os mesmos autores concluíram que as correlações positivas quanto à contagem de UFCs nos órgãos afetados refletem a alta disseminação da infecção e da capacidade de células fúngicas para invadir vários órgãos e tecidos. Essa hipótese de disseminação é reforçada por outros estudos que mostram a habilidade de isolados de *P. brasiliensis* em colonizar diferentes órgãos e tecidos (Singer-Vermes *et al.*, 1989; 1994; Nishikaku *et al.*, 2008).

Existem evidências de que um hospedeiro animal esteja associado com o surgimento de rápidas mudanças genéticas e fenotípicas em microrganismos. Essas mudanças são resultados da interação com o hospedeiro e podem tornar o isolado mais virulento. Fries *et al.* (2001), associaram a recuperação de variantes genéticas de *Cryptococcus neoformans* com a infecção experimental de camundongos, sugerindo que esses variantes tenham sido selecionados pelo sistema imune do hospedeiro. Em nosso estudo, mudanças fenotípicas significativas não foram observadas, ao contrário das alterações genotípicas identificadas, pela primeira vez, em isolados de *P. brasiliensis* após passagem em animal, por meio da análise do polimorfismo de DNA do fungo.

Os isolados de *P. brasiliensis*, estudados aqui, apresentaram diferentes padrões de bandas, considerando 76% de similaridade, após amplificação de seus DNAs com os *primers* 2, 4 e 6 antes e depois da passagem em modelo experimental murino. Com esses três *primers* verificamos, claramente, a modificação dos perfis de agrupamentos dos isolados pós-passagem em animal, ressaltando os isolados Pb246 e Pb31MAS (amplificação com o *primer* 2) e os isolados Pb261, Pb235CRS e Pb281 (amplificação com o *primer* 4) que antes da passagem em animal estavam no mesmo grupo e pós-passagem se agruparam a outros isolados com perfis distintos. Ou ainda os isolados Pb261,

Pb235CRS e Pb281 (amplificação com o *primer* 6), que antes da passagem faziam parte do mesmo grupo e pós-passagem se distanciaram passando a ocupar grupos diferentes. Os demais isolados, em números variáveis por *primer* testado, se agruparam a outros isolados pós-passagem em animal, diferentemente dos agrupamentos vistos com a amplificação dos seus DNAs pré-passagem em animal.

Soares *et al.* 1995, em estudo para caracterização de isolados de *P. brasiliensis*, indicaram o uso do RAPD como boa ferramenta para diferenciar essa espécie, uma vez que os isolados testados foram sempre divididos em dois grupos, com todos os *primers* utilizados, mas não tiveram sucesso ao correlacionar os isolados de acordo com a área geográfica de isolamento. Ao contrário de Hahn *et al.* (2003), que demonstraram o uso dessa técnica como uma boa ferramenta para fazer a distinção entre isolados de regiões geográficas diferentes. Neste trabalho demonstramos a utilização da reação de RAPD como útil na detecção de alterações genotípicas em isolados de *P. brasiliensis* após passagem em animal.

Alterações fenotípicas e genotípicas em fungos têm sido descritas, mais especificamente, para *C. neoformans*, tais como, inativação genética de proteínas regulatórias, que fazem parte de vias de sinalização importantes acarretando a virulência dessa espécie (Alspaugh *et al.*, 1997; D'Souza *et al.*, 2001); prolongadas passagens *in vitro* e *in vivo* causando mudanças fenotípicas associadas com diferenças na virulência (Cherniak *et al.*, 1995; Currie *et al.*, 1995; Franzot *et al.*, 1998; Chen & Casadevall, 1999), entre outras.

Goldman *et al.* (1998) e Fries *et al.* (1999) demonstraram mudanças fenotípicas, *in vitro*, em três diferentes isolados clínicos de *C. neoformans* que

resultaram em aumento da virulência. Entretanto, mudanças fenotípicas, *in vivo*, associadas com a virulência, primeiramente, foi demonstrada com patógenos que possuíam ciclos de vida complexos e que requeriam esse tipo de mudança para a sobrevivência no hospedeiro (Schwan & Hinnebush, 1998). Posteriormente, para *C. neoformans*, Fries *et al.* (2001) demonstraram mudanças fenotípicas nesse fungo durante infecção experimental. Eles concluíram que os resultados obtidos são uma forte evidência de que as mudanças ocorridas *in vivo* aumentam a virulência do patógeno por elicitar uma resposta inflamatória mais vigorosa promovendo uma maior destruição no tecido pulmonar dos camundongos. Em relação a *P. brasiliensis* modificações fenotípicas já foram demonstradas por Svidzinski *et al.* (1999), ao observarem modificação na morfologia de isolados de *P. brasiliensis* após passagem em animal.

Segundo Levine (1977) a informação genética dos caracteres inerentes de um organismo se manifestam através dos fenótipos e genótipos. Assim sendo, o fenótipo é a expressão do genótipo. Levando em consideração essa afirmação, as mudanças fenotípicas nos isolados fúngicos estudados pelos autores anteriormente citados, representam mudanças, muito provavelmente, em nível de genes nas espécies.

Blasi *et al.* (2001), examinaram três isolados de *C. neoformans*, de um único paciente, provenientes de sangue e líquido cefalorraquidiano. Os isolados foram obtidos durante o primeiro episódio de criptococose e 3 anos mais tarde na recidiva da doença. Dois isolados eram geneticamente iguais. Os autores observaram que o isolado obtido durante a recidiva da doença apresentou mudanças fenotípicas, em relação ao seu comportamento quando do primeiro

isolamento, como aumento da resistência à fagocitose e a morte por monócitos e polimorfonucleares, e da produção de proteases e fosfolipase. Entretanto, eles não detectaram mudanças genotípicas e concluíram que essas alterações fenotípicas, provavelmente, estão relacionadas a processos de microevolução atuando como um mecanismo de patogenicidade para a persistência/reativação de células fúngicas. Segundo Fries *et al.* (2001) mudanças fenotípicas reversíveis podem resultar em microevolução que pode ser causada por diversos mecanismos, alguns deles envolvendo mudanças de genes. Por outro lado, Sullivan *et al.* (1996) isolaram *C. neoformans* de seis pacientes positivos para o vírus da imunodeficiência humana com meningite criptocócica e verificaram que os isolados eram geneticamente idênticos. Dois pacientes apresentaram recidiva da doença e novos isolados foram obtidos. Esses isolados foram diferentes geneticamente dos isolados obtidos na primeira coleta. Os mesmos foram submetidos a sucessivos subcultivos e a longos períodos de estocagem não alterando seu perfil genético. Os autores concluíram que as mudanças genotípicas não foram geradas por instabilidade genética *in vitro*, mas, provavelmente, por uma resposta às condições desfavoráveis *in vivo*. Assim é plausível supor que as pressões exercidas pelo hospedeiro (modelo murino experimental) sobre os isolados de *P. brasiliensis* aqui estudados, provavelmente, induziram no fungo mecanismos de evasão das defesas do hospedeiro acarretando mudanças genéticas, demonstradas pelo reagrupamento dos isolados após passagem em animal com os *primers* aqui utilizados.

Comparando os padrões de amplificação dos DNAs dos isolados aqui estudados, pré e pós-passagem em animal, verificamos modificações nesse

perfil, com o aparecimento e o desaparecimento de bandas nos géis dos isolados pós-passagem em animal. Podemos sugerir que o aparecimento e o desaparecimento dessas bandas tenha sido em decorrência da interação com o hospedeiro, principalmente o aparecimento, tendo em vista que a capacidade de um microrganismo sobreviver em um hospedeiro animal é decorrente de características adquiridas, sejam elas fenotípicas e/ou genotípicas, frente a pressões ambientais fazendo com que o microrganismo aumente a sua sobrevivência (Casadevall, 2005).

As bandas visualizadas nos géis, aqui realizados, dos isolados pós-passagem em animal são um alvo de estudo, especialmente, interessante, pois refletem características adquiridas que, provavelmente, são importantes para a sobrevivência e multiplicação do fungo no hospedeiro. Destacamos como possíveis bandas de interesse as bandas que apareceram com maior frequência, após passagem em animal, como as bandas de 900bp (*primer 2*) e 380bp (*primer 2 e 4*), as bandas de 400bp (*primer 4*) e 1500bp (*primer 4 e 6*) e a banda de 100bp (*primer 6*), que apesar de não encontrarmos correlação positiva com características morfológicas e com o grau de virulência no modelo de infecção experimental utilizado não tem menos valor investigativo, uma vez que a mudança no perfil genotípico dos isolados ocorreu e é provável que tenha alguma função para a célula fúngica.

Em síntese, nossos resultados, da análise do perfil genético dos isolados de *P. brasiliensis* provenientes de pacientes com a forma crônica da PCM do estado do Mato Grosso, demonstraram que a técnica de RAPD é capaz de diferenciar isolados pré e pós-passagem em animal, uma vez que ao analisar os perfis genéticos utilizando um coeficiente de similaridade de 76%, obtivemos a

separação dos oito isolados, pré ou pós-passagem em animal, em mais de um grupo como demonstrado pelos dendrogramas gerados. Esses dados corroboram os estudos de Soares *et al.* (1995), no qual afirmam que a técnica de RAPD é uma boa ferramenta para analisar e comparar genoma de isolados de *P. brasiliensis*.

Em relação à correlação entre os aspectos avaliados neste estudo não foram encontradas analogias entre a morfologia, perfil genético e virulência dos isolados de *P. brasiliensis*. Kurokawa *et al.* (2005), correlacionaram isolados que apresentavam graus de virulência distintos com o perfil morfológico: isolados com colônia glabra/cerebriforme apresentavam baixa virulência ou não eram virulentos, enquanto os isolados virulentos tinham colônias cotonosas. No entanto, os isolados estudados aqui não apresentaram diferenças no tipo de colônia, todas apresentaram um aspecto cerebriforme, de consistência cremosa e na cor creme, apesar de possuírem graus de virulência distintos. Diferenças morfológicas, no que diz respeito ao tamanho das células, mas não na intensidade de gemulações, também já foram observadas entre isolados de *P. brasiliensis* pós-passagem em animal (Svidzinski *et al.* 1999). Esses dados corroboram em parte com os nossos resultados, uma vez que não foram visualizadas alterações micromorfológica em nossos isolados, em relação ao tamanho, no entanto não foram observadas modificações na intensidade de gemulação, após a passagem em animal assim como no estudo citado. A respeito da não alteração no padrão micromorfológico, destacam-se em especial, os isolados Pb235CRS, Pb246 e Pb261 que continuaram apresentando filamentos *in vitro*, mas não *in vivo*, mesmo após a passagem em animal, sendo a eficiência da realização do dimorfismo, atribuída a fatores do ambiente do

hospedeiro.

Também não foram observadas correlações entre o perfil genético e a morfologia, assim como, o perfil genético e a virulência dos isolados pré e pós-passagem em animal estudados aqui. Assim como Motta *et al.* (2002) que ao analisarem 35 isolados de *P. brasiliensis* utilizando a técnica de RAPD para avaliar a correlação entre perfil genético, grau de virulência e tipo de manifestação clínica, não encontraram qualquer tipo de correlação, não sendo os perfis de RAPD capazes de diferenciar os isolados de acordo com os parâmetros propostos. Resultados semelhantes foram relatados por Calcagno *et al.* (1998) ao estudarem os perfis de RAPD de 33 isolados de *P. brasiliensis* e não encontraram correlação entre eles e o tipo de patologia, mas encontraram correlação entre os padrões genéticos e a região de isolamento. Apesar de Soares *et al.* (1995) afirmarem que a análise de RAPD possibilita a distinção de isolados de *P. brasiliensis* os autores não conseguiram relacionar os resultados do perfil genético de 7 isolados com diferentes padrões de curva de crescimento e diferenciação ou mesmo com a origem do isolado. Por outro lado, alguns autores obtiveram sucesso ao correlacionar padrões genéticos com regiões geográficas diferentes, como também, com padrões morfológicos (Hahn *et al.*, 2003; Borba *et al.*, 2008).

Abordagens moleculares e modelos murinos experimentais são estratégias úteis na análise da virulência de isolados de *P. brasiliensis* e importantes para o entendimento dos fatores associados com a invasão e com o processo de infecção desse fungo. As diferenças encontradas entre os isolados em nosso estudo, utilizando distintas abordagens, não são suficientes para a total compreensão da patogênese do fungo, mas servem para ressaltar que as

diferenças existem e podem interferir na evolução da doença. Ademais, a demonstração de mudanças no perfil genético de isolados, estudados aqui, após passagem em animal abre novas perspectivas de utilizar *P. brasiliensis* como modelo para estudar as mudanças genotípicas em relação a sua virulência.

7. CONCLUSÕES

Os resultados da análise morfológica, perfil genético e virulência de isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* provenientes de pacientes portadores da forma clínica crônica da paracoccidioidomicose, pré e pós-passagem em animal, nos permitem concluir que:

- ✓ Não houve diferenças macromorfológicas entre os isolados pré-passagem em animal, nem modificação destas pós-passagem;
- ✓ Os isolados de *P. brasiliensis* apresentaram micromorfologias, *in vitro*, na fase leveduriforme, distintas entre si variando de morfologia típica a filamentos delicados, dilatações inter-septais e células leveduriformes com gemulação;
- ✓ O isolado Pb235CRS foi o mais virulento, os isolados Pb285, Pb261 e Pb31MAS tiveram virulência intermediária e os isolados Pb246, Pb281, Pb639 e Pb29EE apresentaram grau de virulência menor;
- ✓ A taxa de sobrevivência dos camundongos ao longo de 200 dias de observação variou de 30 a 100%;
- ✓ Alterações histopatológicas foram visualizadas, na maioria dos tecidos avaliados dos camundongos inoculados, com exceção dos camundongos inoculados com o isolado Pb639;

- ✓ A maioria dos camundongos inoculados com os isolados apresentou índice esplênico decrescente durante o período avaliado;
- ✓ O reisolamento de células fúngicas, de diferentes órgãos, foi possível para a maioria dos isolados aos 100 dias de inoculação;
- ✓ A análise da genotipagem por RAPD-PCR e estudo da similaridade pelo coeficiente de Jaccard e algoritmo UPGMA demonstraram mudanças no perfil genético dos isolados de *P. brasiliensis* após passagem em animal e permitiu dividi-los em grupos, segundo um coeficiente de similaridade de 76%, variando esse agrupamento de acordo com os *primers* e as condições experimentais utilizadas;
- ✓ Foi observado o aparecimento de bandas nos perfis genéticos dos isolados Pb639, Pb261, Pb31MAS e Pb29EE pós-passagem em animal;
- ✓ Não foram observadas correlações entre os dados da morfologia, do perfil genético e da virulência dos isolados pré e pós-passagem em animal, porém as modificações observadas na genotipagem dos isolados pós-passagem podem ter sido ocasionadas devido à pressão exercida pelo modelo experimental, induzindo no fungo mecanismos de evasão das defesas do hospedeiro, o que pode ter levado a mudanças em nível genético dos isolados aqui estudados.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida F. Estudos comparativos do granuloma coccidoidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. An Fac Med. São Paulo 1930; 5: 125-141.
- Alspaugh JA, Perfect JR, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G- protein alpha subunit GPA1 and cAMP. Genes Dev. 1997; 11: 3206–3217.
- Anderotti PF, Monteiro da Silva JL, Bailão AM, Soares CM, Benard G, Soares CP, *et al.* Isolation and partial characterization of 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbes Infect. 2005; 7: 875-881.
- Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos FL, *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction of cells. Infect Immun. 2006; 74: 382-389.
- Bedout C, Cano LE, Tabares AM, Van de Ven M, Restrepo A. Water as a substrate for the development of *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. Mycopathologia 1986; 96: 123-130.
- Behmer AO, Tolosa EMC, Freitas-Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: EDART; 1976. p. 256

- Bethlem EP, Capone D, Maranhão B, Carvalho CR, Wanke B. Paracoccidioidomycosis. *Curr Opin Pulm Med.* 1999; 5: 319-325.
- Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, Najvar LK, Fothergill AW, Knobloch J, *et al.* Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *Clin Microbiol.* 2000; 38: 2940-2942.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Meier R, Winker K, Ingram KK, *et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation: Review. *Trends Ecol Evol.* 2007; 22: 148-155.
- Blasi E, Brozzetti A, Francisci D, Neglia R, Cardinali G, Bistoni F, *et al.* Evidence of microevolution in a clinical case of recurrent *Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001; 20: 535-543.
- Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér SA, Papaiordanou PM, Goveia A, *et al.* Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61: 390-394.
- Borba CM, Schäffer GMV. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. *Mycoses.* 2002; 45: 174-179.

- Borba CM, Vinhas EAL, Lopes-Bezerra LM, Lucena-Silva N. Morphological, biochemical and molecular approaches for comparing typical and atypical *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2005; 88: 257-266.
- Borba CM, Correia J, Vinhas E, Martins A, Alves BCA, Unkles A, *et al*. Genetic characterization of morphologically variant strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103: 306-309.
- Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol*. 2002; 10: 80-87.
- Borgia G, Reynaud L, Cerini R, Ciampi R, Schioppa O, Russo MD, Gentile I, Piazza M. A case of paracoccidioidomycosis: experience with long-term therapy. *Infection* 2000; 28: 119-120.
- Brito MM, Lima M da S, Morgado FN, Raibolt P, Menezes R, Conceição-Silva F, *et al*. Characteristics of *Paecilomyces lilacinus* infection comparing immunocompetent with immunosuppressed murine model. *Mycoses*. 2011; 54: e513-521.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev*. 1993; 6: 89-117.

- Buitrago MJ, Merino P, Puente S, Gomez-Lopez A, Arribia A, Zancopé-Oliveira RM, *et al.* Utility of Real-Time PCR for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA in the diagnosis of imported paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2009; 47:879-882.
- Buitrago MJ, Bernal-Martínez L, Castelli MV, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-estrella M. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: A Review of Cases and Diagnosis. *J Travel Med.* 2011; 18 (1): 26-33
- Bustamante-Simon B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M, Restrepo-Moreno A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 1985; 23: 407-414.
- Calcagno AM, Niño-Vega G, San-Blas F, San-Blas G. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 1733-1736.
- Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol.* 1988; 26: 2147-2151.
- Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 41-4.

- Cano MIN, Vidal de Aguiar MSM. Utilização de aminoácidos no estudo do crescimento do *Paracoccidioides brasiliensis*. Influência sobre o dimorfismo. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1991; 33: 319-324.
- Capilla J, Maffei CM, Clemons KV, Sobel RA, Stevens DA. Experimental systemic infection with *Cryptococcus neoformans var. grubii* and *Cryptococcus gattii* in normal and immunodeficient mice. Med Mycol. 2006; 44: 601-610.
- Carmona AK, Puccia R, Oliveira MCF, Rodrigues EG, Juliano L, Travassos LR. Characterization of an exocellular serine-thiol proteinase activity in *Paracoccidioides brasiliensis*. Biochem J. 1995; 309: 209-214.
- Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJA, Soares CMA, Pereira M, et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. Fung Genet Biol. 2008; 45: 605-612
- Carvalho KC, Ganiko L, Batista W L, Morais FV, Marques ER, Goldman GH, et al. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. Microbes Infect. 2005; 7: 55-65.
- Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. J Infect Dis. 2001; 1: 337- 44.
- Casadevall A. Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? Fungal Genet Biol. 2005; 42: 98-106.

- Castaneda E, Brummer E, Pappagianis D, Stevens DA. Chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice: quantitation of progression and chronicity. *Med Mycol.* 1987; 25: 377-387.
- Chen LC, Casadevall A. Variants of a *Cryptococcus neoformans* strain elicit different inflammatory responses in mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6: 266–268.
- Cherniak R, Morris L, Belay T, Spitzer E, Casadevall A. Variation in the structure of glucuronoxylomannan in isolates from patients with recurrent Cryptococcal meningitis. *Infect Immun.* 1995; 63:1899–1905.
- Clemons KV, Hanson LC, Stevens DA. Colony phenotype switching in clinical and non-clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Med Mycol.* 1996; 34: 259–264.
- Coelho KIR, Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS. Experimental paracoccidioidomycosis. In MF Franco, CS Lacaz, A Restrepo-Moreno, G del Negro, *Paracoccidioidomycosis*, CRC Press, Boca Raton 1994: 87-107.
- Coutinho ZF, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980- 1995). *Cad Saúde Pública.* 2002; 18: 1441-1454.

Currie B, Sanati H, Ibrahim AS, Edwards Jr. JE, Casadevall A, Ghannoum MA. Sterol compositions and susceptibilities to amphotericin B of environmental *Cryptococcus neoformans* isolates are changed by murine passage. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 1934-1937.

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*. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80: 798-804.

Da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Taborda CP. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect.* 2006; 8: 197–205.

De Brito T, Franco MF 1994. Granulomatous inflammation. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1994; 36: 185-192

D'Souza CA, Alspaugh JA, Yue C, Harashima T, Cox GM, Perfect JR, *et al.* 2001. Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol.* 2001; 21:3179–3191.

Díez S, Garcia EA, Pino PA, Botero S, Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, *et al.* PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1999; 41: 351-357.

- Durkin M, Witt J, LeMonte A, Wheat B, Connolly P. Antigen assay with the potential to aid in diagnosis of Blastomycosis. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 4873-4875.
- Fagundes-Pereyra WJ, Carvalho GTC, Góes AM, Lima e Silva FC, Sousa AA. Paracoccidioidomicose do sistema nervoso central. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006; 64: 269-276.
- Franco MF, Montenegro MRG. Anatomia patológica. In G del Negro, CS Lacaz, AM Fiorillo, Paracoccidioidomicose – Blastomicose sul-americana. Sarvier: São Paulo 1982: 97-117.
- Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia* 1987; 25: 5-18.
- Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Lacaz CS. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol.* 2000; 38: 185-191.
- Franzot SP, Mukherjee J, Cherniak R, Chen LC, Hamdam JS, Casadevall A. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. *Infect Immun.* 1998; 66: 89–97.
- Fernandes KSS, Mathews HL, Bezerra LML. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. *J Med Microbiol.* 1999; 48: 195-203.

Fernandes KSS, Coelho AL, Lopes-Bezerra LM, Barja-Fidalgo C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology* 2000; 101(4): 563-69.

Fonseca-Filho O. Sobre o agente etiológico da granulomatose blastomicóide néotropical. *An Bras Derm Sif.* 1939; 14: 85-111.

Fries BC, Casadevall A. Serial isolates of *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS differ in virulence for mice. *J Infect Dis.* 1998; 178: 1761-1766.

Fries BC, Goldman DL, Cherniak R, Ju R, Casadevall A. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. *Infect Immun.* 1999; 67: 6076–6083.

Fries BC, Taborda CP, Serfass E, Casadevall A. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* occurs *in vivo* and influences the outcome of infection. *J Clin Invest.* 2001; 108: 1639-1648.

Fries BC, Goldman DL, Casadevall A. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect.* 2002; 4: 1345-1352.

Goihman-Yahr M, Pine L, Albornoz MC, Yarzabal L, De Gomez MH, San Martin B, *et al.* Studies on plating efficiency and stimulation of viability of suspensions of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Mycopathologia* 1980; 71: 73-83.

Goldani LZ, Sugar AM. Short report: Use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58: 152-153.

Goldman DL, Fries B C, Franzot SP, Montella L, Casadevall A. Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:14967–14972

Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, Camargo Z. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3478-3480.

Gómez BL, Nosanchuk JD, Diez S, Youngchim S, Aisen P, Cano LE, *et al.* Detection of melanin-like particles in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis in vitro* and during infection. *Infect Immun.* 2001; 69: 5760–7.

Hahn RC, Fontes CJF, Batista RD, Hamdan JS. *In vitro* comparison of activities of terbinafine and itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 2828-2831.

Hahn R C, Morato C, Yvelise T, Santos N L, Ferreira J F, Hamdan J S. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses* 2003; 46: 324-329.

Hamdan JS, Ferrari TCA. An atypical isolate of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycoses*. 1995; 38: 481-484.

Hebeler-Barbosa F, Montenegro MR, Bagagli E. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Med Mycol*. 2003; 41: 89-96.

Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev*. 1996; 9: 469-488.

Imai T, Sano A, Mikami Y, Watanabe K, Aoki FH, Branchini MLM, *et al*. A new PCR primer for the identification of *Paracoccidioides brasiliensis* based on rRNA sequences coding the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8S regions. *Med Mycol*. 2000; 38: 323-326.

Kerr IB, Mendes da Silva AM, Drouhet E, Oliveira P, Costa SCG. Paracoccidioidomycosis in nude mice: Presence of filamentous forms of the fungus. *Mycopathologia* 1988; 101: 3-11.

Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. Ainsworth & Bisby's - Dictionary of the fungi, 10th edition, CAB International, Wallingford, UK; 2008.

Koishi AC, Vituri DF, Dionízio Filho PSR, Sasaki AA, Felipe MSS, Venâncio EJ. A semi-nested PCR assay for molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43: 728-730.

Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peraçoli MTS. Virulence factors in fungi of sistemic mycoses. Rev Inst Med Trop São Paulo 1998; 40: 125-135.

Kurokawa CS, Lopes CR, Sugizaki MF, Kuramae EE, Franco MF, Peraçoli MTS. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates association with morphologic and genetic patterns. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2005; 47: 257-262.

Lacaz CS. Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidioidomicose. Um pouco de sua história. In G del Negro, CS Lacaz, AM Fiorillo, editores. Paracoccidioidomicose – Blastomicose sul-americana, Sarvier, São Paulo: Sarvier; 1982. p.1-9.

Lacaz CS, Zamith VA, Negro G del, Siqueira AM 1982. Aspectos clínicos gerais. Formas polares da paracoccidioidomicose. Particularidades clínicas, infanto juvenis. In G del Negro, CS Lacaz, AM Fiorillo, editores. Paracoccidioidomicose – Blastomicose sul-americana. São Paulo: Sarvier; 1982. p.141-147.

Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Guia para identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier; 1998. 445 pp.

Levine RP. Genética. 2^a. ed. São Paulo: Livraria Pioneira Editora; 1977.

- Lima RF, Brito MMS, Schäffer GMV, Lima OC, Borba CM. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* dimorphism of *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Paracoccidioides brasiliensis* isolates after preservation in mineral oil. *Can J Microbiol.* 2004; 50: 445–449.
- Londero AT. Epidemiologia. In G del Negro, CS Lacaz, AM Fiorillo, editores. *Paracoccidioidomicose – Blastomicose sul-americana.* São Paulo: Sarvier; 1982. p. 85-90.
- 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*. *Proc Natl Acad Sci.* 1983; 80: 7659-7663.
- Lopes JD, Moura-Campos MCR, Vicentini AP, Gesztesi JL, de-Souza, W, Camargo ZP. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz J Med Biol Res.* 1994; 27: 2309-2313.
- Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Brazil-Med.* 1908; 22: 121-124/141-144.
- Marques AS, Cortez DB, Lastória JC, De Camargo RMP, Marques MEA. Paracoccidioidomicose: frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. *An Bras Dermatol.* 2007; 82: 411-7.

Marques da Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Camargo ZP. Detection of circulating gp43 Antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with Paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 2003; 41: 3657-3680.

Matute DR, Sepúlveda VE, Quesada LM, Goldman GH, Taylor JW, Restrepo A, *et al.* Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol. 2006; 44: 2153-2157.

McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar, ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. J Med Vet Mycol. 1987; 25: 165-178.

McKenna P. Hidden species may be surprisingly common. NewScientist.com; 2007: [Acesso em 04/12/2011]. Disponível em: <http://www.newscientist.com/article/dn1293-hiddenspecies-may-besurprisingly-common.html>

Medina H, Bodziak Jr C. Contribuição ao conhecimento do ciclo extra-parasitário do *P. brasiliensis* (Almeida, 1930) II- Cultura do *P. brasiliensis* na terra e a influência exercida pelo pH. Arq Biol Tecnol. 1949; 4: 3-9.

Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Shikanaiyasuda MA, Stolf AM, Masuda A, Amato Neto V, *et al.* Immunoglobulin G antibody response to 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as marker for the evaluation of patients under treatment. Rev Iber Micol. 1988; 5: 72.

Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Shikanaiyasuda MA, Ferreira AW, Masuda A. Detection of the 43.000 molecular weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 2842-2845.

Mendes da Silva AM, Borba CM, Oliveira PC. Inoculation experimental animals with *Paracoccidioides brasiliensis* strains: an attempt to reestablish the dimorphic process and variation in pathogenicity as a function of time of preservation under mineral oil. *Mycopathologia.* 1996; 133: 135-138.

Molinari-Madlum EEWI, Felipe MSS, Soares, CMA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol.* 1999; 37: 269-276.

Monteiro JP, Clemons KV, Mirels LF, Coller Jr JA, Wu TD, Shankar J, *et al.* Genomic DNA microarray comparison of gene expression patterns in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelia and yeasts *in vitro*. *Microbiol.* 2009; 155: 2795–2808.

Montenegro J. Acerca da inoculabilidade da blastomicose no Brasil. *Brazil-Med.* 1927; 41: 808-812.

Motta TR, Moreira-Filho CA, Mendes RP, Souza LR, Sugizak MF, Baueb S, *et al.* Evaluation of DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers (RAPD) as genetically associated elements to differentiate virulent and non-virulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002; 33: 151-157.

Motoyama AB, Venancio EJ, Brandão GO, Petrofeza-Silva S, Pereira IS, Soares CMA, *et al.* Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. J Clin Microbiol. 2000; 38: 3106-3109.

Mussati CC. Imunidade celular. In G del Negro, CS Lacaz, AM Fiorillo, editores. Paracoccidioidomicose – Blastomicose sul-americana. São Paulo: Sarvier; 1982. p. 119-126.

Negro G del. Tratamento. Controle de cura. Profilaxia. In G del Negro, CS Lacaz, AM Fiorillo, editores. Paracoccidioidomicose – Blastomicose sul-americana. São Paulo: Sarvier; 1982. p. 135-140.

Negróni P. Factores determinantes de la fase leuciforme del *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycopath Mycol Appl. 1968; 34: 280-284.

Negróni P 1982. Patogenia. In G del Negro, CS Lacaz, AM Fiorillo, editores. Paracoccidioidomicose – Blastomicose sul-americana. São Paulo: Sarvier; 1982. p.135-140.

Nickerson WJ. Enzymatic control of cell division in micro-organisms. Nature 1948; 162: 241-245.

Niño-Vega GA, Calcagno AM, San-Blas G, San-Blas F, Gooday GW, Gow NAR. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 2000; 38: 437-441.

- Nishikaku AS, Peraçoli MTS, Bagagli E, Sugizki MF, Sartori A. Experimental infections with *Paracoccidioides brasiliensis* obtained from Armadillos: Comparison to clinical isolates. *Braz J Infect Dis.* 2008; 12: 57-62.
- Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 3519–28.
- Palmeiro M, Cherubini K, Yurgel LS. Paracoccidioidomicose- revisão da literatura. *Scientia Medica.* 2005; 15: 274-278.
- Popi AF, Lopes JD, Mariano M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol.* 2002; 218: 87-94.
- Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun.* 1986; 53: 199-206.
- Puccia R, Carmona AK, Gesztes JL, Juliano L, Travassos LR. Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. *Med Mycol.* 1998; 36: 345-348.

Rahman D, Mistry M, Thavaraj S, Challacombe SJ, Naglik JR. Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonization to study epithelial host-pathogen interactions. *Microbes Infect.* 2007; 9:615-22.

Restrepo A. Imunidade humoral. In G del Negro, CS Lacaz, AM Fiorillo, editores. *Paracoccidioidomicose – Blastomicose sul-americana.* São Paulo: Sarvier; 1982. p. 127-133.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 1984; 46: 346-353.

Restrepo A, Salazar ME, Clemons KV, Feldman D, Stevens DA. Hormonal influences in the host interplay with *Paracoccidioides brasiliensis*. In Vanden Bossche H, Stevens DA, Odds FC, editors. *Fungal Interactions.* Bethesda: National Foundation for Infectious Diseases. 1997. p. 125-133.

Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Griese J, Theodoro RC, Macoris SAG, Silva RJ, *et al.* Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol.* 2008; 46: 35-40.

Romani L. The Tcell response against fungal infections. *Curr Opin Immunology.* 1997; 9: 484-490.

- Salazar ME, Restrepo A. Morphogenesis of the mycelium to yeast transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*. 1985; 23: 7-11.
- Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium- to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun*.1988; 56: 711-713.
- Salgado-Salazar C, Jones LR, Restrepo A, McEwen JG. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. *Cladistics*. 2010; 26:1-12.
- San-Blas F, Centeno S. Isolation and preliminary characterization of auxotrophic and morphological mutants of the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*. 1977; 129: 138-144.
- San-Blas G, Vernet D. Induction of the synthesis of cell wall α -1,3-glucan in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. *Infect Immun*. 1977; 15: 897-902.
- San-Blas G, San-Blas F, Serrano LE. Host-parasite relationships in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. *Infect Immun*. 1977a; 15: 343-346.
- San-Blas F, San-Blas G. *Paracoccidioides brasiliensis*. In P Szaniszlo, editor. *Fungal dimorphism*. New York: Plenum Press; 1985. p. 93-120.

- San-Blas G, Travassos LR, Fries BC, Goldman DL, Casadevall A, Carmona AK, *et al.* Fungal morphogenesis and virulence. *Med Mycol.* 2000; 38: 79-86.
- San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 2002; 40: 225-242.
- San-Blas G, Niño-Vega G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia.* 2008; 165: 183-195.
- Sandhu GS, Aleff RA, Kline BC, Lacaz CS. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1894-1896.
- Sano A, Tanaka R, Yokoyama K, Franco M, Bagagli E, Montenegro MR, *et al.* Comparison between human and armadillo *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *Mycopathologia* 1998; 143: 165-169.
- Santo AH. Tendência da mortalidade relacionada à paracoccidioidomicose, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de morte. *Rev Panam Salud Publica.* 2008; 23: 313-24.

- Schwan TG, Hinnebush BJ. Bloodstream-versus tick-associated variants of a relapsing fever bacterium. *Science*. 1998; 280:1938–1940.
- Severo LC, Geyer GR, Londero AT, Porto NS, Rizzon CFC. The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1979; 67: 115-118.
- Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39: 297.
- Singer-Vermes LM, Burger E, Franco MF, Di-Bacchi, Mendes-Giannini, Calich VLG. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *Med Mycol*. 1989; 27: 71-82.
- Singer-Vermes LM, Caldeira CB, Burger E, Calich VLG. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol*. 1993; 94:75-79.
- Singer-Vermes LM, Burger E, Calich VLG, Modesto-Xavier LH, Sakamoto TN, Sugizaki MF *et al*. Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in an experimental murine mode. *Clin Exp Immunol*. 1994; 97: 113-119.
- Slutsky B, Buffo J, Soll DR. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science*. 1985; 230:666–669.

- Soares CMA, Mollinari-Madlun EEWI, Silva SP, Pereira M, Felipe MSS. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol. 1995; 33: 505-507.
- Sullivan D, Haynes K, Moran G, Shanley D, Coleman D. Persistence, replacement and microevolution of *Cryptococcus neoformans* strains in recurrent meningitis in AIDS patients. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1739-1744.
- Stover EP, Schär G, Clemons KV, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. Infect Immun. 1986; 51: 199-203.
- Svidzinski TIE, Miranda-Neto H, Santana RG, Fischman O, Colombo AL. *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1999; 41: 279-283.
- Taborda CP, Da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. Mycopathologia 2008; 165: 301-339.
- Tanaka R, Sano A, Franco M, Bagagli E, Rubens Montenegro M, Nishimura K, *et al.* Cerebriform colonies of *Paracoccidioides brasiliensis* isolated from nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) at room temperature. Mycoses. 2001; 44: 9-12.

Tatibana BT, Sano A, Uno J, Kamei K, Igarashi T, Mikami Y, *et al.* Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 gene in sputa by loop-mediated isothermal amplification method. J Clin Lab Anal. 2009; 23: 139-143.

Teixeira MM. Tipagem molecular e evolução do gênero *Paracoccidioides*. Dissertação [Mestrado em Patologia Molecular] - Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília; 2008.

Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco SMG, Macoris SAG, *et al.* Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. BMC Microbiol. 2007; 22: 92-99.

Theodoro RC, Bosco SMG, Araújo JP, Candeias JMG, Macoris SAG, Trinca LA, *et al.* Dimorphism, thermal tolerance, virulence and heat shock protein 70 transcription in different isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycopathologia. 2008; 165: 355–365.

Valle ACF, Skacel M, Costa RLB, Ribeiro CT, Montagna NAA, Cruz LCH. A case report of intraspinal paracoccidioidomycosis. Rev Inst Med Trop S Paulo 1998; 40: 203-209.

Viana GO. Moléstia de *Posadas-Wernicke*. Lesões apendiculares. Rio de Janeiro. Tese - Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro; 1913.

- Vicentini AP, Gesztesí JL, Franco MF, Souza V, Moraes JZ, Travassos LR, *et al.* Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.*1994; 62: 1465-1469.
- Villar LA, Salazar ME, Restrepo A. Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. *J Med Vet Mycol.*1988; 26: 269-276.
- Villar LA, Restrepo A. Virulence of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. *J Med Vet Mycol.*1989; 27: 141-148.
- Wanke B, Londero AT. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: L Collier, A Balows, M Sussman, editors. *Microbiology and microbial infections*. 9th ed. London: Arnold; 1998. p. 395-407.

ANEXO

Procedência das principais drogas e meios de cultura utilizados

- Ácido acético - Proquímicos, BR
- Agar -Difco Becton Dickinson, Microbiology Systems, USA
- Agarose - Sigma Chemical Co, USA
- Cloranfenicol - Sigma Chemical Co, USA
- DNA *Hind* III - Gibco, USA
- EDTA - Sigma Chemical Co, USA
- Extrato de levedura - Difco Becton Dickinson, Microbiology Systems, USA
- Glicose - Difco Becton Dickinson, Microbiology Systems, USA
- Isopropanol - Sigma Chemical Co, USA
- Kit Comercial Extração de DNA - Promega®, USA
- Kit Ready- To-Go® RAPD - Amershan, UK
- Lactofenol de Amann com azul de algodão - Merck, E. Merck, Germany
- Peptona - Difco Becton Dickinson, Microbiology Systems, USA
- Timerosal – Dyne, BR
- Tiopental sódico - Abbott laboratories, Abbott Park, USA.
- Tris base – Invitrogen, USA
- 100 pb DNA Ladder – Invitrogen, USA