

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM
AMOSTRAS DE TECIDO E SANGUE PERIFÉRICO DE
PACIENTES PORTADORES DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE.
CORRELAÇÃO COM PERFIS HISTOPATOLÓGICO,
SOROLÓGICO E PRODUÇÃO DE TNF- α .**

KEILA ZANIBONI SIQUEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

BOTUCATU - SP

2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM
AMOSTRAS DE TECIDO E SANGUE PERIFÉRICO DE
PACIENTES PORTADORES DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE.
CORRELAÇÃO COM PERFIS HISTOPATOLÓGICO,
SOROLÓGICO E PRODUÇÃO DE TNF- α .**

Doutoranda: KEILA ZANIBONI SIQUEIRA

Orientador: Prof. Dr. Silvio Alencar Marques

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Bagagli

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

BOTUCATU - SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Siqueira, Keila Zaniboni.

Detecção molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* em amostras de tecido e sangue periférico de pacientes portadores de Paracoccidioidomicose. Correlação com perfis histopatológico, sorológico e produção de TNF-a / Keila Zaniboni Siqueira. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008

Orientador: Silvio Alencar Marques

Co-orientador: Eduardo Bagagli

Assunto CAPES: 40105008

1. Imunologia 2. Paracoccidioidomicose - Patologia - Estudo de caso
3. *Paracoccidioides brasiliensis*

CDD 616.014

Palavras-chave: Histopatologia; *Paracoccidioides brasiliensis*; PCR; Sorologia; TNF-alfa

“Não desejar o mal ao próximo é ser caridoso apenas pela metade.
A verdadeira caridade consiste em lhes desejarmos o bem,
e em nos sentirmos felizes com o bem que lhes acontece.”

Allan Kardec

Prece de Cáritas

(25 de dezembro de 1873, ditada por Cáritas)

Deus, nosso Pai, que sois todo Poder e Bondade, dai a força
àquele que passa pela provação, dai a luz àquele que
procura a verdade; ponde no coração do homem a
compaixão e a caridade!

Deus, dai ao viajor a estrela guia, ao aflito a consolação, ao
doente o repouso.

Pai, dai ao culpado o arrependimento, ao espírito a
verdade, à criança o guia, e ao órfão o pai!

Senhor, que a Vossa Bondade se estenda sobre tudo o que
criastes. Piedade, Senhor, para aquele que vos não conhece,
esperança para aquele que sofre. Que a Vossa Bondade
permita aos espíritos consoladores derramarem por toda a
parte, a paz, a esperança, a fé.

Deus! Um raio, uma faísca do Vosso Amor pode abrasar a
Terra; deixai-nos beber nas fontes dessa bondade fecunda e
infinita, e todas as lágrimas secarão, todas as dores se
acalmarão.

E um só coração, um só pensamento subirá até Vós, como
um grito de reconhecimento e de amor.

Como Moisés sobre a montanha, nós Vos esperamos com os
braços abertos. Oh Poder! Oh Bondade! Oh Beleza! Oh
Perfeição! E queremos de alguma sorte merecer a Vossa
Divina Misericórdia.

Deus, dai-nos a força para ajudar o progresso, a fim de
subirmos até Vós; dai-nos a caridade pura, dai-nos a fé e a
razão; dai-nos a simplicidade que fará de nossas almas o
espelho onde se refletirá a Vossa Divina e Santa Imagem.

Que Assim Seja.

DEDICATÓRIA

A **Deus**,
por ser tão grandioso e amoroso, me dando a oportunidade de crescer moral e intelectualmente, me perdendo sem restrições e me amando incomparavelmente. Obrigada, meu Pai, por nos revelar a beleza dessa existência eterna.

A meus pais **Cidinha e Wilson**,
que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhasse sem medo e cheios de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante minha ausência, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que me acontece agora, quando procuro uma forma de exprimir esse sentimento.
Amo vocês!

Em especial a minha irmã **Cássia**, por todo apoio e compreensão, por me acolher em sua casa e estar sempre ao meu lado, mesmo que em pensamento.
A meus avós, tios, primos e agregados.

Aos meus sogros **João e Raimunda**, por me tratarem e me acolherem como filha. Aos meus cunhados **Clau e Tole**, **Dany e Marcelo**, por serem tão especiais na minha vida.
Aos meus sobrinhos **Joana, Lucas e Mariana**, pelos momentos de felicidade plena...
(...quero dizer, bagunça plena!).

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao meu noivo-marido Thiago Neves Batista,
que aceitou compartilhar essa caminhada física e espiritual,
por me amar e se deixar ser amado, por me compreender
sempre, por estar ao meu lado em todos os momentos,
pela confiança e cumplicidade e por me fazer intensamente
e imensamente feliz ao teu lado!

“Agradeço a Deus pelo brilho dos seus olhos,
pela vida ao teu lado, pelo recomeço, pela espera recompensada.

Agradeço teus esforços para fazer-me feliz,
fazer-me sorrir e fazer-me sentir.

Agradeço pelo amor, pela amizade
pelo crescimento e pelo aprendizado.

Agradeço teus carinhos, sua ternura
sua paz compartilhada e sua compreensão.
Agradeço as batidas do seu coração descompassado
soando de encontro ao meu.

Pelas palavras de estímulo e pelo encorajamento.

Agradeço pela paciência, pelo respeito
pela confiança e por dedicar seu tempo a mim e aos meus.

Agradeço por dar seu coração
pelo carinho e proteção.

Agradeço, por que o que mais se quer nesta vida
é exatamente tudo o que você me proporciona”

AMA MUITO!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu querido orientador Prof. Silvio Alencar Marques, exemplo de pessoa e profissional com uma forma toda especial de ser e incentivar. Obrigada por me aceitar como orientada e por estar disponível, sempre que possível, para me ajudar. Toda minha admiração e carinho!

Ao co-orientador e amigo Prof. Eduardo Bagagli, que sempre compartilhou entusiasticamente todos meus passos pessoais e profissionais! Obrigada pela confiança e por abrir as portas do seu laboratório para que esse trabalho fosse desenvolvido!

A Profa. Terezinha Peraçoli, com quem iniciei minha pós-graduação e que sempre esteve presente nas minhas conquistas! Obrigada pela ajuda e pelo material cedido para desenvolvimento de parte desse trabalho!

A Profa. Mariângela Esther Alencar Marques. Muito obrigada por ceder um pouquinho do seu tempo em me ajudar com as análises histopatológicas. O aprendizado foi extremamente valioso!

“**E**xistem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes pelo simples fato de terem cruzado o nosso caminho. Algumas percorrem ao nosso lado, vendo muitas luas passarem, mas outras apenas vemos entre um passo e outro. A todas elas chamamos de amigo. Há muitos tipos de amigos. Talvez cada folha de uma árvore caracterize um deles. Os primeiros que nascem do broto é o amigo pai e a amiga mãe. Mostram o que é ter vida. Depois vem o amigo irmão, com quem dividimos o nosso espaço para que ele floresça como nós. Passamos a conhecer toda a família de folhas, a qual respeitamos e desejamos o bem. O destino ainda nos apresenta outros amigos, os quais não sabíamos que iam cruzar o nosso caminho. Muitos desse são designados amigos do peito, do coração. São sinceros, são verdadeiros. Sabem quando não estamos bem, sabem o que nos faz feliz...”

Mas também há aqueles amigos por um tempo, talvez umas férias ou mesmo um dia ou uma hora. Esses costumam colocar muitos sorrisos na face, durante o tempo que estamos por perto.

Falando em perto, não podemos nos esquecer dos amigos distantes, que ficam nas pontas dos galhos, mas que quando o vento sopra, aparecem novamente entre uma folha e outra.

O tempo passa, o verão se vai, o outono se aproxima, e perdemos algumas de nossas folhas. Algumas nascem num outro verão e outras permanecem por muitas estações. O que nos deixa mais felizes é quando as folhas que caíram continuam por perto, continuam alimentando as nossas raízes com alegria. Lembranças de momentos maravilhosos enquanto cruzavam o nosso caminho.

Desejo a vocês, folhas da minha árvore, paz, amor, saúde, sucesso, prosperidade... Hoje e sempre...

Simplesmente porque cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Há os que levaram muito, mas não há os que não deixaram nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso.”

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos queridos pacientes portadores de Paracoccidioidomicose. Vocês são o alvo, mas também o objetivo desse estudo. Espero poder contribuir, pelo menos um pouquinho, para aumentar a qualidade de vida de cada um. O contato que tive com vocês foi fundamental para me encorajar e me fazer entender a importância disso tudo!

Aos meus amados-amigos de laboratório: Prof. Eduardo Bagagli, Profa. Sandra Bosco (Sandrinha), Raquel Theodoro (Quel), Assis, Virgínia e Ariane, além de tantos outros estagiários que por ali passaram. Este trabalho não teria sido tão emocionante sem vocês do meu lado! Muito obrigada! Vocês sabem o quanto contribuíram para essa realização!

Aos estimados docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IB (UNESP): Alexandrina, Ângela, Ary, Prof. Carlos, Fátima, João Candeias, João Pessoa, Josias, Lurdinha, Maurício, Dr. Monteli, Ramon, Sílvio, Teruê, Terezinha e Vera. A convivência com vocês fez parte da minha história. Obrigado por confiarem em mim, serem amigos e estarem sempre dispostos a ajudar!

A TODOS os pós-graduandos e estagiários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IB (UNESP), em especial a Paula Mantovani, Elisandra (Li), Jú Seger (Jujs) e Vanessa. Amigas muito queridas... Irmãs de espírito... A distância nunca irá nos separar! Obrigada por todos os momentos com vocês! Amo muito!

Aos queridos funcionários e secretárias do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IB (UNESP): Dona Lourdes, Antônia (Tó), Luiz Alquati, Lula, Ademival, Pedro, Isaltino (Tino), Sônia e

Nice. Obrigada pela ajuda valiosa e pelos momentos de descontração (festas e confraternizações). Isso tudo foi inestimável!

Aos funcionários e secretários do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB (UNESP): Sarah, Luíza, Seu Levi, Seu Valdir, Rosângela e Eliete. Agradeço imensamente o trabalho e a disposição de vocês! Em especial a Rita, por sua amizade e ajuda valiosa no contato com os pacientes e na análise dos dados do trabalho!

Aos residentes, enfermeiros e funcionários do Ambulatório e da Enfermaria de Dermatologia. Obrigada por me ajudarem nas coletas de amostras e dados dos pacientes.

Aos funcionários da Pós-graduação da Medicina, da Pós-graduação da Patologia, do Departamento de Patologia e da Biblioteca. Vocês contribuíram também com esse trabalho!

A todos os docentes do Departamento de Patologia. Em especial a Profa. Dra. Márcia Guimarães, que me ajudou a ingressar na pós, com suas aulas extremamente didáticas, e a Dra. Denise Fecchio, sempre disponível para me auxiliar e me aconselhar.

Aos queridos amigos João Pessoa e Fabiana, Paulo Ribolla e Débora, Virgínia e Sérgio. Por serem tão especiais e nos acolherem com tanto carinho! Obrigada pelos momentos de descontração e por estarem sempre do nosso lado! Vocês moram no meu coração!

Aos amigos e amigas que, mesmo de longe, me apoiaram sempre: Rodrigo (Smurf) e Amanda, Gyraya (Gyras), Renato (Cabeça), Jú Vela, Monise, Dani Mórís (Zuáda), Ana Márcia, Lizandra e Chrys, Angelma, Raquel Queirós e Fabrício, Flávia e Trovão, Veri Machado e família, Kelli e Fábio, Thaís, Paty Mazzolin,

Dani Fossato, Tatiana Andrade, Dani Curvêllo, Renata Domingues, Denise e família.

Aos amados amigos do Centro Espírita "Irmã Zilda", em Pardinho (SP): Irmã Zilda e outros trabalhadores, Seu Mário e Lurdinha, Geraldo e Rosa, Pedras, Chico e Lurdinha, Vitor e Claudinez, Márcia, Maria Inácia, Dona Dedé, Dona Serafina, e tantos outros. Vocês me ajudaram a enxergar a vida de outro ângulo e continuam me ajudando na minha evolução espiritual. Obrigada por existirem! Em especial a Dra. Dóris, que nos apresentou a uma nova vida!

Aos novos amigos do Centro Espírita Fé, Amor e Caridade, em especial Rose e Victor, pela oportunidade de evoluir e ajudar a quem necessita, "amenizando" nossas provações.

Aos amigos docentes da Universidade Regional de Blumenau (FURB): Hercílio, Juliane, Débora, Eliane, André, Eleine, Sérgio, Sílvio, Maria Helena e Sônia. A secretária do DCN, Meici, por ser tão prestativa e atenciosa. Aos monitores e estagiários, em especial a Luciana Brigati, Thiago Sanches, Larissa Zutter. Vocês são demais! Obrigada pelo apoio!

Aos meus alunos... Obrigada por me ajudarem a crescer como pessoa e como profissional!

E a todos que eu possa ter esquecido de mencionar, mas que, de forma alguma, são menos importantes para mim...Obrigada!

SUMÁRIO

Revisão da Literatura.....	03
Referências Bibliográficas.....	17
Artigo: <i>Nested</i> PCR para diagnóstico de Paracoccidioidomicose: comparação com cultura, histopatologia, sorologia e produção de TNF- α	28
Resumo.....	29
Introdução.....	30
Materiais e Métodos.....	32
Pacientes.....	32
Estudo anatomopatológico.....	32
Cultura fúngica, PCR e seqüenciamento parcial do gene da gp43.....	32
Análise sorológica.....	33
Dosagem de TNF- α	33
Extração de DNA de biópsia e sangue periférico.....	33
<i>Primers</i> para PCR e <i>Nested</i> -PCR.....	33
Amplificação e detecção do DNA.....	33
Resultados.....	33
Discussão.....	39
Agradecimentos.....	45
Referências.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Representação das substituições de nucleotídeos e aminoácidos encontradas no seqüenciamento parcial do gene gp43 de 10 isolados de *P. brasiliensis* obtidos de pacientes com PCM.....34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação entre os níveis de TNF- α produzidos por monócitos de sangue periférico, estimulados ou não com LPS, de pacientes com paracoccidiodomicose, nas formas crônica e aguda-subaguda.....	35
Figura 2: Comparação entre os níveis de TNF- α produzidos por monócitos de sangue periférico, estimulados ou não com LPS, de pacientes com paracoccidiodomicose, nas formas leve, moderada e grave.....	36
Figura 3: Comparação da produção de TNF- α por monócitos de sangue periférico, estimulados ou não com LPS, de indivíduos saudáveis e pacientes com paracoccidiodomicose em atividade, nas formas aguda/subaguda e crônica, nos diferentes períodos de coleta.....	37
Figura 4: Comparação da produção de TNF- α por monócitos de sangue periférico, estimulados ou não com LPS, de indivíduos saudáveis e pacientes com paracoccidiodomicose em atividade, nas formas leve, moderada e grave, nos diferentes períodos de coleta.....	38
Figura 5: Padrão de bandas visualizadas após reações de <i>Nested-PCR</i> das amostras de sangue e tecido dos pacientes avaliados.....	38

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica, causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo imperfeito e termodimórfico (Franco *et al.*, 1987, 1989). Esse agente etiológico apresenta-se sob a forma de levedura em tecidos do hospedeiro ou quando cultivado à temperatura de 35-37° C e, sob a forma de micélio à temperatura ambiente, com variação de 4° a 28° C (Restrepo, 1985; San-Blas & San-Blas, 1985). De acordo com San-Blas e colaboradores (1980), a temperatura parece ser o fator determinante no dimorfismo do fungo, embora fatores nutricionais também possam estar envolvidos na regulação deste fenômeno (Paris *et al.*, 1985).

A micose é endêmica no Brasil e em outros países da América Latina (Restrepo *et al.*, 1973; Restrepo, 1985; Wanke & Londero, 1994). No Brasil, as regiões de maior incidência estão localizadas nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná (Marques *et al.*, 1983; Franco *et al.*, 1989; Wanke & Londero, 1994). Confinada a essas regiões tropicais e subtropicais, a infecção é primeiramente associada às comunidades rurais e agrícolas, incluindo animais silvestres, como o tatu (Bagagli *et al.*, 1998; Vergara & Martinez, 1998-1999; Bagagli *et al.*, 2003; Corredor *et al.*, 2005). A relação entre o *P. brasiliensis* e o meio ambiente ainda não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que o micélio seja a forma saprobiótica do fungo na natureza, que sob certas condições produziria conídios, estruturas de reprodução assexuada e de propagação da espécie. Os conídios, presentes no solo, água e plantas à temperatura ambiente, são considerados atualmente as formas infectantes (Restrepo, 2002).

No Brasil, é estimado que 10% da população esteja infectada, mas a incidência da doença é de 1 a 3 para cada 100000 habitantes (Marques *et al.*, 1983). A taxa de exposição é equivalente em homens e mulheres; entretanto, a infecção ativa é predominante no sexo masculino. A menor frequência de doença no sexo feminino pode decorrer do fato de que o *P. brasiliensis* contém um receptor citoplasmático para estrógeno que, na presença de estradiol, inibe a conversão de micélio para a levedura patogênica (Restrepo *et al.*, 1984; Salazar *et al.*, 1988), aliada a possível menor exposição à reinfecções e menor incidência de co-morbidades.

Trabalhadores rurais, geralmente estão inseridos em estratos sociais de baixos níveis sócio-econômicos, apresentam alto grau de desnutrição e tabagismo. Além disso, o alcoolismo é um hábito muito comum nessa população (Martinez & Moya, 1992). Esses fatores supracitados são considerados condições de risco pré-existentes e representam fatores de grande importância para a transformação de infecção para doença, e para a progressão da doença, uma vez que interferem na formação do granuloma e nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Camargo & Franco, 2000).

A infecção humana ocorre, com maior frequência, pela inalação de conidiósporos, que, na fase miceliana, atingem os bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares, onde se transformam em leveduras, que são as formas patogênicas. Assim, as lesões primárias da PCM ocorrem com mais frequência nos pulmões, dando origem a uma infecção subclínica, que pode evoluir para cura ou tornar-se latente na presença de resposta imune eficiente, ou ainda, disseminar para outros órgãos, por via hematogênica ou linfática, causando doença grave (Giraldo *et al.*, 1976; Londero & Severo, 1981; Restrepo, 1988; Montenegro & Franco, 1994; Bethlem *et al.*, 1999).

Embora o contágio ocorra, notadamente, pela via aérea, as vias transcutânea e mucosa não devem ser desconsideradas (Montenegro & Franco, 1994), devido à possibilidade de invasão através de pele ou mucosas (Franco & Montenegro, 1982), ocasionando lesões secundárias em membranas mucosas, pele, linfonodos e glândulas adrenais (Brummer *et al.*, 1993).

A infecção subclínica com *P. brasiliensis*, é caracterizada pelo contágio do indivíduo com o fungo, detectado no teste intradérmico com paracoccidioidina positivo, em indivíduos sem nenhuma manifestação clínica da doença ou achado histopatológico positivo, ou na presença de seqüela pulmonar cicatricial, que ocorrem em até 60% da população nas áreas endêmicas (Bagatin, 1986; Franco *et al.*, 1993). Em contraste, a paracoccidioidomicose define uma doença caracterizada por manifestações clínicas em um ou mais órgãos e que pode evoluir para lesões fúngicas ativas ou seqüela tardia (Mendes, 1994).

A classificação das formas clínicas da PCM utilizada atualmente foi descrita por Franco *et al.* (1987), e aprimorada por Mendes (1994), e considera fatores tais como topografia das lesões (Motta & Pupo, 1936), história natural da doença (Giraldo *et al.*, 1976; Londero, 1986) e apresentação clínica dos pacientes (Negroni & Negroni, 1965; Barbosa, 1968; Franco *et al.*, 1987).

A PCM tem como principais apresentações clínicas as formas aguda e crônica (Franco *et al.*, 1987). A forma aguda ou subaguda, também chamada juvenil, ocorre predominantemente em crianças, adolescentes e adultos jovens. Geralmente se desenvolve a partir de lesão primária não detectada, a qual se dissemina rapidamente pelas vias linfática e hematogênica para órgãos linfóides e hematopoiéticos, isto é, baço, fígado, linfonodos e medula óssea, constituindo quadro infeccioso grave (Mendes *et al.*, 1988).

A forma crônica da doença, que se desenvolve a partir do complexo primário ou do foco quiescente (reinfeção endógena), geralmente afeta adultos do sexo masculino, com idade superior a 30 anos. Apresenta quadro clínico de duração prolongada, normalmente acima de seis meses, onde se pode dizer que o comprometimento pulmonar é constantemente observado e o comprometimento tegumentar (cutâneo e/ou mucoso) é freqüente. As lesões podem permanecer localizadas (unifocal) ou disseminarem-se para vários órgãos (multifocal), e a gravidade é variável (Franco *et al.*, 1987; Franco *et al.*, 1993; Mendes, 1994; 1997).

Classificação clínica da Paracoccidioidomicose.

1. Paracoccidioidomicose infecção
2. Paracoccidioidomicose doença
 - 2.1. Forma Aguda
 - 2.1.1. Moderada
 - 2.1.2. Grave
 - 2.2. Forma Crônica
 - 2.2.1. Unifocal

Leve
Moderada
Grave
 - 2.2.2. Multifocal

Leve
Moderada
Grave
3. Forma residual (seqüela)

Adaptado de Franco *et al.* (1987).

Segundo Marques (1994), o significado clínico das lesões cutâneas depende do seu número, padrão e localização. Lesões múltiplas, inicialmente do tipo pápulo-acneiforme, sugerem disseminação hematogênica do *P. brasiliensis* e refletem a gravidade da doença, enquanto que lesões de localização peri-oral e peri-ganglionar são conseqüentes à progressão de lesões inicialmente localizadas na cavidade oral ou à invasão cutânea a partir de gânglios abscedados. Inoculação direta na pele é possibilidade rara com único caso comprovado descrito na literatura (Castro *et al.*, 1982). Basicamente, a frequência, o número e a característica das lesões cutâneas são conseqüências da interação parasita-hospedeiro, incluindo a imunopatogênese das lesões, o sítio envolvido e a duração do curso da doença.

A caracterização dos padrões morfológicos das lesões cutâneas na PCM não é facilmente estabelecida devido ao polimorfismo clínico da doença, à dinâmica de evolução da lesão, e também ao critério dermatológico utilizado. Entretanto, lesões ulceradas são consideradas as mais prevalentes de todas, podendo apresentar um padrão semiológico característico que é a aparência de úlceras limpas, não infectadas secundariamente e com a presença de pontilhado hemorrágico que imita a assim denominada “estomatite moriforme”, auxiliando o diagnóstico clínico (Sampaio *et al.*, 1998; Dillon & Marques, 1990; Marques *et al.* 2007). As lesões cutâneas são mais freqüentes no segmento cefálico e presentes ao redor do nariz e da boca (Londero & Ramos, 1972; Sarosi & Davies, 1979; Marques *et al.*, 2007).

Muitas pessoas são expostas ao fungo, mas apenas um pequeno número desenvolve sintomas clínicos, sugerindo que tanto os mecanismos de imunidade inata quanto adquirida parecem ser importantes na eliminação do fungo (Musatti *et al.*, 1994).

Histologicamente sabe-se que o *P. brasiliensis* causa inflamação granulomatosa, com predomínio de resposta imune tipo Th1, caracterizada pelo aumento de interferon-gama (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e que resulta em eficiente ativação de macrófagos (Travassos *et al.*, 1995).

Uribe *et al.* (1987), estudando 40 biópsias realizadas em pacientes com PCM, descreveram a patogênese das lesões cutâneas e mucosas. A presença do fungo no tecido induz o influxo de polimorfonucleares (PMN), que circundam o microrganismo, formando um microabcesso bem delimitado, com zona de

supuração central. A incapacidade dos PMN em deter a multiplicação do fungo determina a chegada de células mononucleares, na tentativa de controlar a infecção. A ativação destas células resulta na formação das células epitelióides e células gigantes que, não tendo conseguido destruir os fungos, morrem. Neste momento, observa-se a formação de um tecido de granulação rico em vasos sangüíneos, caracterizado por um infiltrado denso de linfócitos, histiócitos e plasmócitos. Os fungos liberados atraem novos PMN, reiniciando um novo ciclo. Explica-se, assim, o granuloma micótico misto, assinalado por reações granulomatosas e supurativas. A reparação do tecido lesado por fibrose é bastante comum na PCM (Uribe *et al.*, 1987), o que representa um prejuízo importante para a função do órgão acometido, especialmente os pulmões (Mendes, 1994).

É provável que a fibrose, neste caso, esteja relacionada à ação das citocinas produzidas localmente pelas células do granuloma, em especial os linfócitos T e macrófagos (Shikama *et al.*, 1989; Brito & Franco, 1994). Além disso, o dano tecidual nas lesões de pele e mucosa oral dos pacientes com PCM pode ser causado pela grande produção de TNF- α a partir de células fagocíticas durante a interação com o *P. brasiliensis* e outros microrganismos (Chensue *et al.*, 1995; Sugita *et al.*, 1997; Parise-Fortes *et al.*, 2006), assim como a presença de IL-10 (Pagliari *et al.*, 2006) e fator transformador do crescimento-beta (TGF- β) (Parise-Fortes *et al.*, 2006) detectados no infiltrado celular ao redor das lesões granulomatosas, contribui para a evolução ou controle da PCM infecção (Nishikaku & Burger, 2003).

Conforme o padrão de distribuição e organização dessas células conseqüentes à resposta inflamatória frente ao *P. brasiliensis*, o granuloma na PCM pode ser classificado em compacto ou frouxo. O granuloma compacto apresenta área central, com células fúngicas englobadas por células gigantes multinucleadas, rodeadas, eventualmente, por infiltrado neutrofílico, evidenciadas com dificuldade e podendo apresentar sinais de inviabilidade. Na região periférica, há densos agregados de células epitelióides circundados por linfócitos (Brito & Franco, 1994). No padrão de resposta granulomatosa dito frouxo, observam-se menor número de células epitelióides e numerosas células polimorfonucleares distribuídas ao redor da região central, que está ocupada por edema, exsudato sero-fibrinoso e grande quantidade de fungos em ativa multiplicação (Montenegro & Franco, 1994).

O *P. brasiliensis* apresenta uma complexa estrutura antigênica, com alguns epítomos que se relacionam com patogenicidade e podem ser detectados tanto em condições de cultivo, como de parasitismo. Puccia e colaboradores (1986) identificaram uma glicoproteína de superfície do fungo com 43 kDa (gp43), caracterizada bioquimicamente como uma glicoproteína rica em manose que se liga a concanavalina A. Pode ser detectada também na forma secretada e este pode ser um mecanismo de virulência e/ou escape pelo qual o fungo se utiliza para evadir dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Puccia *et al.*, 1986). A gp43 tem sido considerada como o principal componente imunogênico do *P. brasiliensis* (Camargo *et al.*, 1989), capaz de induzir tanto a produção de anticorpos (Ac) específicos (Souza *et al.*, 1998), quanto uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) (Travassos *et al.*, 1995). Em 1994, Vicentini e colaboradores demonstraram que a gp43 age como receptor, ligando-se especificamente e em proporções equimolares à laminina, uma proteína da matriz extracelular. O revestimento do fungo com laminina aumentava a virulência do *P. brasiliensis*, resultando em uma doença mais grave e de progressão mais rápida em modelo experimental utilizado. Os autores também aventam a possibilidade de que esta ligação possa causar alterações intracelulares no fungo, aumentando sua capacidade de invasão e disseminação no organismo hospedeiro, explicando o aumento da sua patogenicidade (Vicentini *et al.*, 1994).

A expressão da gp43 varia na dependência da amostra e na forma do fungo analisada (Mattar-Filho *et al.*, 1997). Taborda e colaboradores (1998) demonstraram que camundongos BALB/c inoculados com gp43 em adjuvante completo de Freund apresentam uma resposta imune celular do tipo Th1, produtora de IFN- γ e IL-12. O mapeamento do epítipo da gp43 identificou um peptídeo contendo 15 aminoácidos (P10) como sendo o imunodominante na resposta de hipersensibilidade tardia. A imunização com a gp43 e P10 leva a proteção eficiente contra o desafio intratraqueal utilizando-se uma cepa virulenta de *P. brasiliensis*, documentada pela diminuição no número e tamanho dos granulomas, encontrados de forma bem organizada e compacta, contendo fungos mortos em seu interior (Taborda *et al.*, 1998).

Recentemente foi caracterizado outro antígeno secretado, uma proteína de 75kDa, com atividade de fosfatase, relacionada com o crescimento do fungo e estabelecimento da PCM experimental (Xander *et al.*, 2007). Além disso, o reconhecimento dessa proteína por anticorpos monoclonais específicos foi

devido, provavelmente, à maior imunogenicidade desse antígeno, levando à inibição do crescimento fúngico por mecanismos fungistáticos ou por aumento na produção de intermediários reativos do oxigênio por macrófagos ativados, o que contribui para um efeito citotóxico.

O estabelecimento da infecção ou doença com maior ou menor gravidade depende principalmente de fatores relacionados com a virulência do agente infeccioso e com a resposta imune do hospedeiro, na qual podem participar uma ampla variedade de células e moléculas, que atuam de forma sinérgica ou mesmo independente, estimulando ou reprimindo os mecanismos envolvidos no controle da disseminação do parasito (Peraçoli & Soares, 1992). Além disso, diferenças entre indivíduos quanto ao padrão de resposta imune ao *P. brasiliensis* são importantes na determinação da progressão da doença e prognóstico clínico (Oliveira *et al.*, 2002).

Macrófagos são considerados importantes células do mecanismo inato de resistência ao fungo por secretarem citocinas, principalmente TNF- α , que tem efeitos benéficos contra infecções fúngicas (Smith *et al.*, 1990; Louie *et al.*, 1994). Essa citocina apresenta um amplo espectro imunorregulatório, metabólico e inflamatório. Promove inflamação, possivelmente através da indução de moléculas de adesão, fatores quimiotáticos para macrófagos e neutrófilos, proteínas de fase aguda e geração de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e IL-6 (Vilcek & Lee, 1991).

O TNF- α é considerado a citocina produzida mais precocemente em resposta a vários estímulos, sendo detectado no soro de indivíduos saudáveis, dentro de 2h após estímulo com LPS (Michie *et al.*, 1988). Além disso, está associado aos efeitos deletérios do LPS, indicando sua capacidade de influenciar numerosas vias biológicas, que podem ser importantes na resistência a doenças infecciosas (Desiderio *et al.*, 1989). Essa citocina é capaz de induzir aumento na atividade microbicida de monócitos/macrófagos e, devido a essa propriedade, tem sido amplamente estudada em micoses sistêmicas causadas por *Blastomyces dermatitidis* (Brummer *et al.*, 1988), *Candida albicans* (Kullberg *et al.*, 1993; Redmond *et al.*, 1993), *Cryptococcus neoformans* (Flesch *et al.*, 1989), *Histoplasma capsulatum* (Bullock, 1993) e *P. brasiliensis* (Peraçoli *et al.*, 2003).

Quando produzidas em quantidades adequadas, as citocinas pró-inflamatórias exercem um papel benéfico como mediadores da resistência do hospedeiro a agentes infecciosos. Entretanto, sua superprodução pode levar à

toxicidade local e sistêmica (Levitz *et al.*, 1994). A produção sérica elevada de TNF- α pode estar relacionada com efeitos sistêmicos não-protetores ou até mesmo deletérios, como indução da febre, anorexia, diarreia e estado de caquexia (Tracey & Cerami, 1994), já descritos na coccidioidomicose (Dooley *et al.*, 1994) e na tuberculose (Rook *et al.*, 1987; Pereira *et al.*, 2004).

Em estudo sobre a produção de TNF- α por monócitos de sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose, Macedo (1999) demonstrou que os níveis endógenos dessa citocina, detectados nos sobrenadantes de monócitos de pacientes foram significativamente mais elevados do que os obtidos em indivíduos saudáveis. A síntese dessa citocina foi maior nos pacientes com forma aguda em comparação com os pacientes da forma crônica da micose, demonstrando o estado de ativação dessas células, provavelmente devido ao estímulo da carga antigênica do fungo, durante a doença ativa.

Benard e colaboradores (1996), avaliando pacientes de PCM na forma ativa, demonstraram uma imunossupressão celular transitória em resposta a antígenos de *P. brasiliensis*, que é reversível com tratamento e possivelmente relaciona-se ao padrão de resposta Th2 no curso da doença.

Os níveis séricos de TNF- α já descritos em doentes com PCM (Silva & Figueiredo, 1991; Mendes *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1995), bem como a elevada produção endógena dessa citocina por monócitos de pacientes com doença ativa, sugerem o papel do TNF- α na patogênese dessa micose. Parise-Fortes e colaboradores (2000), estudando a produção de citocinas inflamatórias na PCM experimental do hamster, verificaram que o TNF- α , produzido em altos níveis durante a infecção pelo *P. brasiliensis*, poderia ser responsável não só pelo mecanismo de defesa contra o fungo nas primeiras semanas de infecção, como também poderia contribuir para a patogênese da doença. Nas fases mais tardias da infecção, os níveis elevados de TNF- α pareceram desempenhar um papel lesivo, sendo provavelmente responsáveis pelas alterações observadas no estado geral apresentado pelos animais, culminando com a morte dos mesmos.

Tipos distintos de citocinas estão claramente associados com gravidade de diversas infecções (DiPiro, 1997) e o TNF- α , entre outras, parece exercer um papel central nessas doenças (Aguillon *et al.*, 2002). Na literatura existem dados que demonstram uma forte relação entre a concentração de receptores solúveis para TNF (p55 e p75) com o estágio e progressão de doenças infecciosas

(Kulseng *et al.*, 1999). Entretanto, a correlação de tal citocina com a gravidade da doença na paracoccidiodomicose ainda não foi estabelecida.

No acompanhamento de pacientes com suspeita de PCM doença, nenhum teste diagnóstico é superior ao isolamento do agente infeccioso de espécimes clínicos (Camargo & Franco, 2000). Entretanto, essa situação ideal nem sempre é alcançada.

Com relação ao diagnóstico da PCM, este pode ser obtido mediante testes complementares ao exame clínico, como micológico direto, sorológico e anatomopatológico. Cada uma dessas técnicas encerra vantagens e desvantagens (Ricci *et al.*, 2007).

Na tentativa de cultivo do fungo, as dificuldades residem no risco de contaminação, na baixa sensibilidade e no longo tempo de incubação, que varia de uma a três semanas (Sano *et al.*, 2001). No método direto, a visualização do fungo em material retirado da lesão tem baixa sensibilidade, principalmente se a lesão é infiltrada ou secundariamente infectada (Salina *et al.*, 1998).

Quanto à sorologia, várias técnicas e diferentes tipos de antígenos de *P. brasiliensis* vêm sendo empregados no diagnóstico e no seguimento da terapêutica dos pacientes (Martins *et al.*, 1997; Ortiz *et al.*, 1998; Del Negro *et al.*, 2000; Mamoni *et al.*, 2002). No entanto, na década de 70, Fava Netto (1976) e Negroni e colaboradores (1976) haviam documentado possíveis problemas sobre os antígenos usados no diagnóstico sorológico; o que foi confirmado por Albuquerque e colaboradores (2005), em trabalho sobre diferentes frações de antígenos e sua relação com a especificidade e sensibilidade da técnica de ELISA.

A confirmação da diversidade e complexidade da resposta imune humoral em pacientes com paracoccidiodomicose e, a importância do emprego de diferentes testes sorológicos para identificar as imunoglobulinas das classes IgG, IgA e IgM específicas anti-*P. brasiliensis* foram enfatizadas por Martins e colaboradores (1997). Segundo Del Negro e colaboradores (2000), pacientes com diferentes formas clínicas apresentam variação na intensidade da resposta humoral contra o fungo, sendo os níveis mais baixos e os mais altos observados na forma crônica unifocal e na forma aguda, respectivamente. Estudando o perfil sorológico de pacientes com as formas aguda e crônica de PCM, no período de dois anos, os autores verificaram que o declínio nos níveis de anticorpos ocorria paralelamente à melhora clínica. Apenas os pacientes com a forma crônica

unifocal apresentavam negatividade sorológica após um ano de tratamento, em comparação com as formas aguda e crônica multifocal. Concluíram que técnicas como a contraimuno eletroforese e ELISA apresentam boa correlação com a clínica e refletem a carga fúngica presente nos pacientes em casos de recidiva da doença (Del Negro *et al.*, 2000). Além disso, os níveis de anticorpos dos pacientes também podem refletir uma associação entre a disseminação da doença e a severidade de suas manifestações clínicas (Singer-Vermes *et al.*, 1993).

A identificação do fungo por meio de exame histopatológico tem sido considerada “padrão-ouro” para o diagnóstico da doença, onde o achado da célula mãe, circundada por inúmeras células filhas formando a imagem da “roda de leme” é característico da exoesporulação múltipla do *P. brasiliensis*. O fungo apresenta morfologia variada, com brotamento simples ou múltiplo, bem como tamanho variado: em geral, mede de 6 a 20 μm . As formas consideradas volumosas medem, geralmente, de 12 a 30 μm ; e as diminutas, de 1 a 5 μm (Lacaz *et al.*, 1991). Com relação à viabilidade do fungo, com base na histopatologia e na coloração pela hematoxilina-eosina e impregnação pela prata, as formas viáveis são as leveduras intactas com parede celular preservada, possuindo forma bem arredondada e citoplasma basofílico, uniformemente corado. As formas inviáveis são aquelas que exibem parede celular irregular, por vezes rota, possuindo formas aberrantes e citoplasma eosinofílico (Restrepo, 2000). Nos granulomas pauci-parasitários, o agente etiológico é dificilmente observado e, nas formas diminutas, pode ser confundido com outros fungos dimórficos, como *Histoplasma ssp* e *C. neoformans* (Bialek *et al.*, 2000; 2002a; 2002b).

Assim, o diagnóstico da PCM geralmente se baseia no exame anatomopatológico, no exame microscópico direto, na habilidade de crescimento do fungo em laboratório e nos testes sorológicos (Restrepo, 1984; Lacaz *et al.*, 1991). Entretanto, os recentes avanços na Biologia Molecular proporcionaram o surgimento de várias técnicas de identificação e tipagem de patógenos. Por se tratarem de métodos não-invasivos, seguros e de rápido diagnóstico, tais técnicas vêm sendo cada vez mais aprimoradas e empregadas, ainda que em nível de pesquisa, no diagnóstico de doenças fúngicas.

Uma grande aplicação da biologia molecular é a possibilidade de identificação de certeza de um determinado patógeno, sem a necessidade de

cultivo, com o uso da reação em cadeia pela polimerase, a PCR (Saiki *et al.*, 1985; Persing *et al.*, 1993; Persing, 1996). Assim, essa reação tem sido descrita como um método rápido, sensível e específico para a determinação de um grande número de microrganismos (White *et al.*, 1990; 1992) e, dessa forma, pode ser útil no diagnóstico da PCM (Goldani & Sugar, 1998).

Richardson & Kokki (1999) analisaram a técnica de PCR utilizada em infecções sistêmicas causadas por *Candida* sp e demonstraram que, tanto a cultura quanto a histopatologia, embora consideradas “padrão-ouro” para o diagnóstico, não possuem sensibilidade suficiente em comparação com os métodos moleculares.

A sensibilidade destas técnicas é considerada elevada, podendo, em certos casos, apresentar reação positiva se a amostra clínica contiver pelo menos uma única célula do patógeno. Enquanto os métodos microbiológicos tradicionais empregam meios e condições normalmente seletivas para o cultivo e proliferação celular do agente patogênico; no método molecular, um fragmento específico de DNA presente somente no patógeno, denominado seqüência-alvo, é amplificado por processos químicos. A detecção dessa seqüência-alvo é feita por um conjunto de dois *primers* específicos, deduzidos a partir do conhecimento da seqüência de nucleotídeos de genes particulares do patógeno.

Protocolos específicos de identificação molecular para diversos grupos de microrganismos são constantemente desenvolvidos, com especial ênfase aos organismos não-cultiváveis ou de cultivo difícil ou demorado (Relman, 1993; Persing *et al.*, 1993; Goldani *et al.*, 1995; Persing, 1996; Bialek *et al.*, 2000; Sano *et al.*, 2001).

Uma variação da PCR, a técnica de *Nested-PCR*, consiste em um primeiro ciclo de amplificação da seqüência alvo do DNA a partir de *outer primers*, gerando um *amplicon* de seqüência longa, e a seguir uma nova amplificação de uma seqüência interna à primeira utilizando-se *inner primers*, gerando um *amplicon* de seqüência curta. Esta técnica torna a reação de PCR ainda mais sensível, pois permite a detecção de quantidades muito pequenas de DNA presentes na amostra.

Yamakami e colaboradores (1996) utilizaram a *Nested-PCR* para detectar o DNA de *Aspergillus fumigatus* em soro de camundongos experimentalmente infectados e em soro de pacientes com aspergilose invasiva e obtiveram a detecção de fragmentos de DNA do fungo em 71% e 70%, respectivamente. Tais

pesquisadores concluíram que a técnica utilizada apresenta alta sensibilidade e especificidade, indicando a possibilidade de um diagnóstico seguro e precoce da infecção por *A. fumigatus*.

Algumas regiões gênicas em particular, como as de DNA ribossomal (rDNA), demonstram ser de grande utilidade para os protocolos de identificação rápida pela PCR, devido ao fato de apresentarem, concomitantemente, regiões constantes ou não-variáveis presentes em todos os fungos e regiões variáveis (única para cada espécie), o que possibilita o *design* de *primers* universais, isto é, que amplificam uma determinada região gênica em praticamente todas as espécies fúngicas; e também *primers* e *probes* específicos, isto é, que amplificam e hibridizam, respectivamente, DNA apenas da espécie alvo de interesse (White *et al.*, 1990)

Empregando esta estratégia, Bowman (1993) desenvolveu um sistema de identificação molecular nas espécies patogênicas *Coccidioides immitis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *Tricophyton rubrum*, fazendo uso de *primers* derivados das regiões não-variáveis (universais) de rDNA, o qual amplifica fragmentos de cerca de 600 pares de base (pb) em praticamente todas espécies fúngicas. A discriminação entre as várias espécies pode, então, ser realizada através de hibridização *dot-blot* com *probes* específicos derivados das regiões variáveis. Estratégia semelhante foi também desenvolvida para *C. neoformans* (Mitchell *et al.*, 1994) e diversas espécies fúngicas patogênicas e oportunistas, incluindo as pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Filobasidiella*, *Histoplasma*, *Pseudallescheria* e *Sporothrix* (Mitchell *et al.*, 2002; Haynes *et al.*, 1995; Sandhu *et al.*, 1995) e muitos outros microrganismos nos anos recentes.

Em relação ao *P. brasiliensis*, várias metodologias de biologia molecular já foram empregadas, como a análise do padrão de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) para caracterização de isolados (Soares *et al.*, 1995; Calcagno *et al.*, 1998; Kurokawa *et al.*, 2005), a clonagem e expressão de genes codificadores de epítomos antigênicos da gp43 (Cisalpino *et al.*, 1996) e o sequenciamento do gene da gp43 na busca de polimorfismos informativos (Moraes *et al.*, 2000). Várias regiões gênicas do *P. brasiliensis* foram sequenciadas, como as do gene da actina, gp43, p27 e de rDNA (Goldani *et al.*, 1995; Cisalpino *et al.*, 1996; McEwen *et al.*, 1996; Sandhu *et al.*, 1997; Hebel-Barbosa *et al.*, 2003),

abrindo possibilidades para a dedução de pares de *primers* específicos a serem utilizados na PCR, tanto para materiais clínicos como para amostras fúngicas.

Goldani & Sugar (1998) salientaram que a PCR tem sido o método mais sensível, específico e rápido na detecção de uma variedade de microrganismos e que poderia ser ferramenta útil no diagnóstico precoce da PCM. Inicialmente, foram clonados e seqüenciados fragmentos de DNA específicos para o *P. brasiliensis* (Goldani *et al.*, 1995), representados por dois genes: um que codifica a glicoproteína exo-celular gp43 (Puccia *et al.*, 1986) e outro que codifica a glicoproteína p27 (McEwen *et al.*, 1996). Além dos *primers* empregados para a amplificação do gene da gp43 e p27, são utilizados também *primers* específicos do DNA ribossomal (rDNA), baseados nas regiões ITS (*internal transcribed spacer*), como as regiões 5.8S e 28S. Nesse sentido, Motoyama e colaboradores (2000) propuseram a utilização de *primers* que amplificaram a região 5.8S do DNA e sugeriram o emprego de duplo PCR, utilizando esses *primers*, para o diagnóstico da PCM.

A utilidade da PCR como método diagnóstico da PCM foi demonstrada por meio de *primers* sensíveis e específicos, capazes de detectar a partir de 10 células fúngicas/ml de amostra clínica de escarro em pacientes com a forma pulmonar da doença. A capacidade de detecção do DNA do *P. brasiliensis* em todas as amostras de escarro avaliadas se correlacionou com o exame microscópico positivo (Gomes *et al.*, 2000). Bialek e colaboradores (2000) desenvolveram uma técnica de *Nested-PCR*, usando *primers* derivados da gp43, cujo produto amplificado continha 196 pares de bases. Concluiu-se, com esse trabalho, que a técnica apresenta alta sensibilidade, sendo sua aplicação muito útil para o diagnóstico da PCM em tecido humano, e também alta especificidade, uma vez que não amplificou o DNA de *H. capsulatum* em órgãos de camundongos infectados por este patógeno.

O melhor conhecimento acerca da biologia molecular do *P. brasiliensis* tem aberto amplos caminhos para o uso de técnicas modernas na identificação do fungo em amostras constituídas de material biológico, tais como as análises moleculares de fungos provenientes de isolados humanos e de amostras de solo (Camargo & Franco, 2000; Theodoro *et al.*, 2005; Terçarioli *et al.*, 2007).

O sistema desenvolvido por Theodoro e colaboradores (2005) para detecção molecular de fungo no solo foi realizado através de *Nested-PCR* da região 5.8S-ITS rDNA, cujos *primers* internos específicos foram desenhados com

base na diversidade de uma coleção de diferentes isolados de *P. brasiliensis* (clínicos e de tatu) da região de Botucatu. Este sistema também se mostrou eficiente na detecção da infecção em animais silvestres atropelados (Richini-Pereira *et al.*, 2007). Dessa forma, seu emprego parece ser interessante na análise de materiais clínicos para diagnóstico em grupo de pacientes com formas ativas da PCM.

No intuito de contribuir para um melhor conhecimento dos padrões de lesão e evolução clínica deste grupo, lado a lado com o diagnóstico clínico, histopatológico e molecular, a quantificação de citocinas circulantes de relevância clínica, o isolamento fúngico nos materiais de biópsias desses pacientes e a análise do isolado obtido com relação ao seu perfil molecular da gp43 parecem ser de extrema importância e necessidade para estudos clínicos, epidemiológicos e imunológicos.

Em vista dos resultados obtidos na literatura até o momento, torna-se importante a análise de tais dados com o objetivo de aprimorar e consolidar a técnica de detecção molecular do *P. brasiliensis*, de aumentar a sensibilidade e especificidade no diagnóstico e de auxiliar a melhor caracterização da gravidade da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguillon JC, Cruzat A, Cuenca J, Cuchacovich M. Tumor necrosis factor alpha genetic polymorphism as a risk factor in disease. *Rev Med Chil.* 2002; 130: 1043-50.

Albuquerque CF, Marques da Silva SH, Camargo ZP. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2005, 43: 1944-6

Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, Camargo ZP, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58: 505-12.

Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, Hebeler-Barbosa F, Trinca L, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol.* 2003, 41: 217-23.

Bagatin E. Inquérito epidemiológico com a paracoccidioidina na região de Sorocaba, Estado de São Paulo. *An Bras Dermatol.* 1986; 61: 5-8.

Barbosa W. Blastomicose sul-americana. Contribuição ao seu estudo no Estado de Goiás. [tese]. Goiânia: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás; 1968.

Benard G, Hong MA, Del Negro GMB, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJS. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996, 54: 7-12.

Bethlem EP, Capone D, Maranhão B, Carvalho CR, Wanke B. Paracoccidioidomycosis. *Curr Opin Pulm Med.* 1999, 5: 319-25.

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. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2940-2.

Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertson VJ, Knobloch J, et al. Evaluation of two Nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol.* 2002a; 40: v1644-47.

Bialek R, Weiss M, Bekure-Nemariam K, Najvar LK, Alberdi MB, Graybill JR, et al. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by Nested and real-time PCR assays. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002b; 9: 461-6.

Bowman BH. A model PCR/Probe system for the identification of fungal pathogens. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic Molecular Microbiology – Principles and Applications*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1993. p. 423-30.

Brito T, Franco MF. Granulomatous inflammation. Rev Inst Med Trop São Paulo 1994; 36: 185-92.

Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. J Immunol. 1988; 140: 2786-9.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol Rev. 1993; 6: 89-117.

Bullock WE. Interactions between human phagocytic cells and *Histoplasma capsulatum*. Arch Med Res. 1993; 24: 219-23.

Calcagno AM, Nino-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: 1733-6.

Camargo ZP, Unterkircher C, Travassos LR. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. J Med Vet Mycol. 1989; 27: 407-12.

Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Rev Iberoam Micol. 2000, 17: 41-8.

Castro AAM, Rivitti EA, Castro RM. Lesões cutâneas. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM, editors. Paracoccidioidomicose. São Paulo: Sarvier-EDUSP, 1982. cap. 14.

Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Lincoln P, Kunkel SL. Cytokine function during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Local and regional participation of IFN-gamma, IL-10 and TNF-alpha. J Immunol. 1995, 154: 5969-76.

Cisalpino PS, Puccia R, Yamauchi LM, Cano MI, Silveira JF, Travassos LR. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Biol Chem. 1996; 271: 4553-60.

Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, et al. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. Med Mycol. 2005, 43: 275-80.

Del Negro GM, Pereira CN, Andrade HF, Palacios SA, Vidal MM, Charbel CE, et al. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. J Med Microbiol. 2000; 49: 37-46.

Desiderio JV, Kiener PA, Lin PF, Warr GA. Protection of mice against *Listeria monocytogenes* by recombinant human tumor necrosis factor alpha. Infect Immun. 1989; 57: 1615-7.

Dillon NL, Marques SA. Micoses Profundas. In: Cucé LC, Festa Neto C. (Org.). Manual de Dermatologia. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu Editora; 1990. p. 203-218.

DiPiro JT. Cytokine networks with infection: mycobacterial infections, leishmaniasis, human immunodeficiency virus infection, and sepsis. *Pharmacotherapy* 1997; 17: 205-23.

Dooley DP, Cox RA, Hestilow KL, Dolan MJ, Magee DM. Cytokine induction in human coccidioidomycosis. *Infect Immun*. 1994; 62: 3980-3.

Fava Netto C. Paracoccidioidomycosis immunology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1976; 18: 42-53.

Flesch IE, Schwamberg G, Kaufmann SH. Fungicidal activity of IFN-gamma-activated macrophages. Extracellular killing of *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*. 1989; 142: 3219-24.

Franco MF, Montenegro MR. Anatomia patológica. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorello AM. Paracoccidioidomicose. São Paulo: Sarvier; 1982. p. 97-117.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Med Trop*. 1987; 20: 129-32.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. Paracoccidioidomycosis. *Baill's Clin Trop Med Commun Dis*. 1989; 4: 185-200.

Franco M, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Montenegro MR, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol*. 1993; 5: 115-49.

Giraldo R, Restrepo A, Gutiérrez F, Robledo M, Londono F, Hernandez H, et al. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. *Mycopathologia* 1976; 58: 63-70.

Godfrey K. Statistics in practice. Comparing the means of several groups. *N Engl J Med*. 1985; 313: 1450-6.

Goldani LZ, Maia AL, Sugar AM. Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fragment from *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 1652-4.

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: 152-3.

Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 3478-80.

Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW, Moens W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. J Med Vet Mycol. 1995; 33: 319-25.

Hebeler-Barbosa F, Morais FV, Montenegro MR, Kuramae EE, Montes B, McEwen JG, et al. Comparison of the sequences of the internal transcribed spacer regions and PbGP43 genes of *Paracoccidioides brasiliensis* from patients and armadillos (*Dasypus novemcinctus*). J Clin Microbiol. 2003; 41: 5735-7.

Kullberg BJ, Van't Wout JW, Hoogstraten C, Van Furth R. Recombinant interferon-gamma enhances resistance to acute disseminated *Candida albicans* infection in mice. J Infect Dis. 1993; 168: 436-43.

Kulseng B, Vatten L, Espevik T. Soluble tumor necrosis factor receptors in sera from patients with insulin-dependent diabetes mellitus: relations to duration and complications of disease. Acta Diabetol. 1999; 36: 99-105.

Kurokawa CS, Lopes CR, Sugizaki MF, Kuramae EE, Franco MF, Peraçoli MTS. Virulence profile of ten *P. brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. Rev Inst Med Trop São Paulo 2005; 47: 257-62.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Paracoccidioidomycose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, editors. Micologia Médica. São Paulo: Ed. Sarvier, 1991. p. 248-92.

Levitz SM. Interactions of Toll-like receptors with fungi. Microbes Infect. 2004; 6: 1351-5.

Levitz SM, Tabuni A, Kornfeld H, Reardon CC, Golenbock DT. Production of tumor necrosis factor alpha in human leukocytes stimulated by *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. 1994; 62: 1975-81.

Londero AT. Paracoccidioidomycose. I- Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. J Pneumol. 1986; 12: 41.

Londero AT, Ramos CD. Paracoccidioidomycosis. A clinical and mycologic study of forty-one cases observed in Santa Maria, RS, Brazil. Am J Med. 1972; 52: 771-5.

Londero AT, Severo LC. The gamut of progressive pulmonary paracoccidioidomycosis. Mycopathologia 1981, 75: 65-74.

Louie A, Baltch AL, Smith RP, Franke MA, Ritz WJ, Singh JK, et al. Tumor necrosis factor alpha has a protective role in murine model of systemic candidiasis. Infect Immun. 1994; 62: 2761-72.

Macedo AMRB. Produção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e de fator transformador do crescimento-beta (TGF- β) em pacientes com paracoccidioidomycose em atividade. [dissertação]. Botucatu, FMB, UNESP; 1999.

Mamoni RL, Nouér SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2002; 40: 153-9.

Martinez R, Moya MJ. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. *Rev Saude Publica* 1992; 26: 12-6.

Martins R, Marques SA, Alves M, Fecchio D, Franco MF. Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with itraconazole using Dot-blot, ELISA and Western-blot. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1997; 39: 261-9.

Marques SA, Franco MF, Mendes RP, Silva NC, Baccili C, Curcelli ED, et al. Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic area of Botucatu (São Paulo-Brazil). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1983; 25: 87-92.

Marques SA. Cutaneous lesions. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994. p. 259-266.

Marques SA, Cortez DB, Lastória JC, Camargo RMP, Marques MEA. Paracoccidioidomicose: frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. *An Bras Dermatol.* 2007; 82: 411-7.

Mattar-Filho R, Azevedo MO, Pereira M, Jesuino RS, Salem-Izacc SM, Brito WA, et al. Expression of glycoprotein gp43 in stage-specific forms and during dimorphic differentiation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1997; 35: 341-5.

McEwen JG, Ortiz BL, García AM, Florez AM, Botero S, Restrepo A. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* 1996; 20: 125-31.

Mendes RP, Pereira PCM, Meira DA, Marcondes-Machado J, Barraviera B, Rezkallah-Iwasso MT, et al. Paracoccidioidomicose juvenil. Estudo retrospectivo de 30 casos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1988; 21: 47.

Mendes RP, Scheinberg MA, Rezkallah-Iwasso MT, Scheinberg DA, Meira DA, Marcondes-Machado J, et al. Evaluation of tumor necrosis factor (TNF) in sera of patients with paracoccidioidomycosis (PCM). *Proceedings of the Congress of International Society for Human and Animal Mycology*. Montreal: Canada; 1991. p. 11.

Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994. p. 233-58.

Mendes RP. Quadro clínico. In: Veronesi R, Foccacia R, editors. *Tratado de Infectologia*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1997. p. 1803.

Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med.* 1988; 318: 1481-6.

Mitchell TG, White TJ, Taylor JW. Comparison of 5.8S ribosomal DNA sequences among the basidiomycetous yeast genera *Cystofilobasidium*, *Filobasidium* and *Filobasidiella*. J Med Vet Mycol. 1992; 30: 207-18.

Mitchell TG, Freedman EZ, White TJ, Taylor JW. Unique oligonucleotide primers in PCR for identification of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol. 1994; 32: 253-5.

Montenegro MR, Franco M. Pathology. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 131-50.

Morais FV, Barros TF, Fukada MK, Cisalpino PS, Puccia R. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol. 2000, 38: 3960-6.

Motoyama AB, Venancio EJ, Brandão GO, Petrofeza-Silva S, Pereira IS, Soares CM, et al. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. J Clin Microbiol. 2000; 38: 3106-9.

Motta LC, Pupo JA. Granulomatose paracoccidioidica (blastomycose brasileira). An Fac Med São Paulo 1936; 12: 407.

Musatti CC, Peraçoli MTS, Campos-Soares AMV, Rezkallah-Iwasso MT. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994: 175-186.

Negroni P, Negroni R. Our experiences with South American blastomycosis in Argentina. Mycopathol Mycol Appl. 1965, 26: 264-72.

Negroni R, de Flores CI, Robles AM. Study of serologic cross reactions between the antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Histoplasma capsulatum*. Rev Asoc Argent Microbiol. 1976; 8: 68-73.

Nishikaku AS, Burger E. Immunohistochemical demonstration of TGF-beta and decorin in paracoccidioid granulomas. Brazilian J Med Biol Res. 2003, 36: 1073-8.

Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. Microbes Infect. 2002; 4: 139-44.

Ortiz BL, Diez S, Uran ME, Rivas JM, Romero M, Caicedo V, et al. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Clin Diag Lab Immunol. 1998; 5: 826-30.

Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Alves C, Sotto MN. Role of mast cells as IL-10 producing cells in paracoccidioidomycosis skin lesions. *Mycopathologia* 2006, 162: 331-5.

Paris S, Duran-Gonzalez S, Mariat F. Nutritional studies on *Paracoccidioides brasiliensis*. The role of organic sulfur in dimorphism. *J Med Vet Mycol*. 1985, 23: 85-92.

Parise-Fortes MR, da Silva MF, Sugizaki MF, Defaveri J, Montenegro MR, Soares AMVC, et al. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. *Med Mycol*. 2000, 38: 51-60.

Parise-Fortes MR, Marques SA, Soares AMVC, Kurokawa CS, Marques MEA, Peraçoli MTS. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. *Brit J Dermatol*. 2006, 154: 643-50.

Peraçoli MTS, Soares AMVC. Imunologia da paracoccidioidomicose. In: Tosta CE, editors. *Imunologia das infecções*. Uberaba: FUNEPU, 1992. p. 15-36.

Peraçoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques SA, et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*. 2003; 5: 413-8.

Pereira CB, Palaci M, Leite OHM, Duarte AJS, Benard G. Monocyte cytokine secretion in patients with pulmonary tuberculosis differs from that of healthy infected subjects and correlates with clinical manifestations. *Microbes Infect*. 2004, 6: 25-33.

Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. Fungal pathogens. In: *Diagnostic Molecular Microbiology – Principles and Applications*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993. p. 423-37.

Persing DH. Selected PCR protocols for emerging infections. In: *PCR Protocols for emerging infections diseases*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1996. p. 91-177.

Puccia R, Schenkman S, Gorin PA, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun*. 1986; 53: 199-206.

Redmond HP, Shou J, Gallagher HJ, Kelly CJ, Daly JM. Macrophage-dependent candidacidal mechanisms in the murine system. Comparison of murine Kupffer cell and peritoneal macrophage candidacidal mechanisms. *J Immunol*. 1993; 150: 3427-33.

Relman DA. The identification of uncultured microbial pathogens. *J Infect Dis*. 1993; 168: 1-8.

Restrepo A, Greer DL, Vasconcellos M. Paracoccidioidomycosis: a review. Rev Med Vet Mycol. 1973; 8: 97-123.

Restrepo A. Procedimientos serologicos en la paracoccidioidomicosis. Adel Microbiol Enf Infecc. 1984; 3: 182-211.

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: 346-53.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. J Med Vet Mycol. 1985; 23: 323-34.

Restrepo A. Immune response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Curr Top Med Mycol. 1988; 2: 239-77.

Restrepo A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? Med Mycol. 2000; 38: 317-22.

Restrepo A. The power of the small: *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. Annu Rev Biomed Sci. 2002, p.12, Special Issue.

Ricci G, da Silva ID, Sano A, Borra RC, Franco M. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR in biopsies from patients with paracoccidioidomycosis: correlation with the histopathological pattern. Pathologica 2007; 99: 41-5.

Richardson MD, Kokki MH. New perspectives in the diagnosis of systemic fungal infections. Ann Med. 1999; 31: 327-35.

Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Griesse J, Theodoro RC, Macoris SA, da Silva RJ, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. Med Mycol. 2007, 18: 1-6.

Rook GA, Taverne J, Leveton C, Steele J. The role of gamma-interferon, vitamin D₃ metabolites and tumor necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. Immunology 1987; 62: 229-34.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230: 1350-4.

Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Infect Immun. 1988, 56: 711-3.

Salina MA, Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Barraviera B, Mendes-Giannini MJ. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. J Clin Microbiol. 1998; 36: 1723-8.

Sampaio SAP, Rivitti EA. Dermatologia – Sampaio e Rivitti. São Paulo: Artes Médicas, 1998.

San-Blas F, San-Blas G, Inlow D. Dimorphism in *Paracoccidioides brasiliensis*. Zentralbl Bakteriol. 1980; 8: 23-8.

San-Blas F, San-Blas G. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Szaniszlo PJ, editors. Fungal dimorphism. New York: Plenum, 1985. p. 93-120.

Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2913-9.

Sandhu GS, Aleff RA, Kline BC, Lacaz CS. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol. 1997; 35: 1894-6

Sano A, Yokoyama K, Tamura M, Mikami Y, Takahashi I, Fukushima K, et al. Detection of gp43 and ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal RNA genes of *Paracoccidioides brasiliensis* in paraffin-embedded tissue. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2001; 42: 23-7.

Sarosi GA, Davies SF. Blastomycosis. Am Rev Respir Dis. 1979; 120: 911-37.

Shikama Y, Kobayashi K, Kasahara K, Kaga S, Hashimoto M, Yoneya I, et al. Granuloma formation by artificial microparticles *in vitro*. Macrophages and monokines play a critical role in granulomas formation. Am J Pathol. 1989; 134: 1189-99.

Silva CL, Figueiredo F. Tumor necrosis factor in paracoccidioidomycosis patients. J Infect Dis. 1991; 164: 1033-4.

Silva CL, Silva MF, Faccioli LH, Pietro RC, Cortez SA, Foss NT. Differential correlation between interleukin patterns in disseminated and chronic human paracoccidioidomycosis. Clin Exp Immunol. 1995; 101: 314-20.

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: 75-9.

Smith JG, Magee DM, Williams DM, Graybill JR. Tumor necrosis factor- α plays a role in host defense against *Histoplasma capsulatum*. J Infect Dis. 1990; 162: 1349-53.

Soares CM, Madlun EE, Silva SP, Pereira M, Felipe MS. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol. 1995; 33: 505-7.

Souza AR, Gesztesi JL, Moraes JZ, Cruz CR, Sato J, Mariano M, et al. Evidence of idiotypic modulation in the immune response to gp43, the major antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in both mice and humans. Clin Exp Immunol. 1998; 114: 40-8.

Sugita Y, Miyamoto M, Koseki M, Ishii N, Nakajima H. Suppression of tumor necrosis factor- α expression in leprosy skin lesions during treatment for leprosy. *Br J Dermatol*. 1997; 136: 393-7.

Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, Franco M, Travassos LR. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun*. 1998; 66: 786-93.

Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco SMG, Macoris SA, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol*. 2007, 7: 92-99.

Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo JR JP, Bosco SMG, Macoris SAG, Padula Jr LO, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol*. 2005; 43: 725-9.

Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med*. 1994; 45: 491-503.

Travassos LR, Puccia R, Cisalpino P, Taborda C, Rodrigues EG, Rodrigues M, et al. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res*. 1995; 26: 297-304.

Uribe F, Zuluaga AI, Leon W, Restrepo A. Histopathology of cutaneous and mucosal lesions in human paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1987; 29: 90-6.

Vergara ML, Martinez R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1998-1999, 144: 131-3.

Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, Souza W, 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: 1465-9.

Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem*. 1991; 266: 7313-6.

Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994. p. 109-20.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols – A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press Inc, 1990. p. 315-22.

White T, Madej R, Persing D. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv Clin Chem*. 1992; 29: 161-96.

Xander P, Vigna AF, Feitosa LS, Pugliese L, Bailão AM, Soares CMA, et al. A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. *Microbes Infect.* 2007, 9: 1484-92.

Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 2464-8.

Artigo

***Nested* PCR para diagnóstico de Paracoccidioidomicose: comparação com cultura, histopatologia, sorologia e produção de TNF- α .**

Keila Z. Siqueira¹, Raquel C. Theodoro¹, Sandra M. G. Bosco¹, Maria Rita Parise-Fortes³, Maria Terezinha S. Peraçoli¹, Mariângela E. A. Marques², Eduardo Bagagli¹, e Silvio A. Marques^{3*}.

¹Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências; ²Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu; ³Departamento de Dermatologia e Radioterapia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu-SP, Brasil.

Artigo a ser submetido à publicação na revista científica *Journal of Clinical Microbiology*.

Resumo

Siqueira, K. Z. Detecção molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* em amostras de tecido e sangue periférico de pacientes portadores de Paracoccidioidomicose. Correlação com perfis histopatológico, sorológico e produção de TNF- α . Tese doutorado. UNESP/Botucatu. 2008.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica, causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo imperfeito e termodimórfico. Embora o contágio ocorra principalmente pela via aérea, as vias transcutânea e mucosa não devem ser desconsideradas, devido à possibilidade de invasão através de pele ou mucosas.

No presente estudo, a detecção molecular de *P. brasiliensis* por *Nested-PCR* foi realizada em fragmentos de biópsias de lesões cutâneo-mucosas de pacientes com PCM ativa e comparada a outras técnicas utilizadas como rotina no diagnóstico dessa micose. Para tanto, amostras de 29 pacientes atendidos no Serviço de Dermatologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, foram coletadas no período de abril/2004 a abril/2007.

Na análise histopatológica observou-se granulomas compactos bem organizados, algumas vezes ao lado de áreas contendo granulomas frouxos mal definidos. Tal técnica foi positiva em todas as amostras avaliadas, com presença de grande quantidade de células fúngicas em 65,5% dos casos, algumas com multi-brotamentos.

Para as análises sorológicas, na técnica de ELISA, 74,1% dos casos apresentaram títulos de 1/12800, 11,1% apresentaram 1/3200, 3,7% apresentaram 1/800 e 11,1% foram negativos. Já para imunodifusão (ID), 3,5% apresentaram título de 1/512, 55,1% apresentaram títulos de 1/32, 3,5% apresentaram 1/16, 3,5% apresentaram 1/8, 10,3% apresentaram 1/4, 6,9% apresentaram 1/2 e 17,2% foram negativos.

Foi observado um aumento nos níveis de TNF- α , nos pacientes na forma grave, produzido por monócitos não estimulados, em comparação à forma leve e moderada, e ao controle. A produção desta citocina por monócitos estimulados com LPS também se mostrou gradativamente maior quanto maior a gravidade dos pacientes. Além disso, na análise do seguimento dos pacientes nota-se uma diminuição significativa nos níveis da citocina no período 60 dias pós-início do tratamento em comparação com o período pré-tratamento.

O resultado do processamento e análise das amostras de biópsia dos pacientes, através da PCR, seguida de *Nested-PCR*, foi de 56% de positividade; enquanto que não se obteve positividade do DNA extraído das amostras de sangue.

Diante dos dados apresentados, observa-se a possibilidade do uso de ferramentas moleculares, como a *Nested-PCR*, na detecção do *P. brasiliensis* em amostras biológicas de indivíduos infectados. Tais técnicas podem ser auxiliares no diagnóstico da PCM, principalmente em casos onde os métodos usuais falham ou requerem tempo demasiado.

Nested PCR para diagnóstico de Paracoccidioidomicose: comparação com cultura, histopatologia, sorologia e produção de TNF- α .

Keila Z. Siqueira¹, Raquel C. Theodoro¹, Sandra M. G. Bosco¹, Maria Rita Parise-Fortes³, Maria Terezinha S. Peraçoli¹, Mariângela E. A. Marques², Eduardo Bagagli¹, e Silvio A. Marques^{3*}.

¹Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências; ²Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu; ³Departamento de Dermatologia e Radioterapia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu-SP, Brasil.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica, causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, fungo imperfeito e termodimórfico (Franco *et al.*, 1987, 1989). Com distribuição endêmica no Brasil e outros países da América Latina (Restrepo *et al.*, 1973; Restrepo, 1985; Wanke & Londero, 1994), esse agente etiológico apresenta-se sob a forma de levedura em tecidos do hospedeiro ou quando cultivado à temperatura de 35-37°C, e sob a forma de micélio à temperatura ambiente (4-28°C) (Restrepo, 1985; San-Blas & San-Blas, 1985),

As lesões primárias da PCM ocorrem com mais frequência nos pulmões, dando origem a infecção subclínica, que pode evoluir para cura ou tornar-se latente na presença de resposta imune eficiente, ou ainda, disseminar para outros órgãos, por via hematogênica ou linfática, causando doença grave (Giraldo *et al.*, 1976; Londero & Severo, 1981; Restrepo, 1988; Montenegro & Franco, 1994; Bethlem *et al.*, 1999).

A PCM tem como apresentações clínicas as formas aguda-subaguda e crônica (Franco *et al.*, 1987). A primeira, também chamada juvenil, ocorre predominantemente em crianças, adolescentes e adultos jovens. Geralmente se desenvolve a partir de lesão primária não detectada, que se dissemina rapidamente pelas vias linfática e hematogênica para órgãos linfóides e hematopoiéticos, constituindo quadro infeccioso grave (Mendes *et al.*, 1988).

A forma crônica da doença é mais frequente e se desenvolve a partir do complexo primário ou do foco quiescente (reinfecção endógena). Esta geralmente afeta adultos do sexo masculino, com idade superior a 30 anos. Apresenta quadro clínico de duração prolongada, normalmente acima de seis meses, onde se pode dizer que o comprometimento pulmonar é constantemente observado e o tegumentar (cutâneo e/ou mucoso) é frequente (Marques *et al.*, 1994). Tais lesões podem ser localizadas (unifocal) ou podem se disseminar para vários órgãos (multifocal), com gravidade variável (Franco *et al.*, 1987; Franco *et al.*, 1993; Mendes, 1994; 1997).

* Correspondência para Prof. Dr. Silvio Alencar Marques, Depto. Dermatologia e Radioterapia, Faculdade de Medicina/UNESP, Campus de Botucatu, 18618-000 Botucatu, SP, Brasil. Telefone: 55 0xx14 3811-6015. E-mail: smarques@fmb.unesp.br

Histologicamente sabe-se que o *P. brasiliensis* causa inflamação granulomatosa, com predomínio de resposta imune tipo Th1, tais como IFN e TNF, que resulta em eficiente ativação de macrófagos (Travassos et al., 1995). Tais células são consideradas importante mecanismo inato de resistência ao fungo por secretarem TNF- α , que tem efeitos benéficos contra infecções fúngicas (Smith et al., 1990; Louie et al., 1994).

Entretanto, a produção elevada de TNF- α pode estar relacionada com efeitos sistêmicos não-protetores ou até mesmo deletérios, como indução da febre, anorexia, diarreia e estado de caquexia (Tracey & Cerami, 1994), já descritos na coccidioidomicose (Dooley et al., 1994) e na tuberculose (Rook et al., 1987; Pereira et al., 2004). Os níveis séricos de TNF- α descritos em doentes com PCM (Silva & Figueiredo, 1991; Mendes et al., 1991; Silva et al., 1995), bem como a elevada produção endógena dessa citocina por monócitos de pacientes com doença ativa, sugerem o papel do TNF- α na patogênese dessa micose; embora a correlação entre níveis séricos de tal citocina com a gravidade da doença na paracoccidioidomicose ainda não esteja estabelecida.

O diagnóstico da PCM pode ser obtido mediante testes complementares ao exame clínico, como cultura, micológico, sorológico e anatomopatológico. Cada uma dessas técnicas encerra vantagens e desvantagens (Ricci et al., 2007).

Dessa forma, na tentativa de cultivo do fungo, as dificuldades residem no risco de contaminação, na baixa sensibilidade e no longo tempo de incubação, que varia de uma a três semanas (Sano et al., 2001). No método direto, a visualização do fungo em material retirado da lesão tem sensibilidade variável, principalmente se a lesão é infiltrada ou secundariamente infectada (Salina et al., 1998). Diversas técnicas sorológicas utilizando diferentes antígenos de *P. brasiliensis* vêm sendo empregadas para o diagnóstico e o seguimento da terapêutica dos pacientes (Martins et al., 1997; Ortiz et al., 1998; Del Negro et al., 2000; Mamoni et al., 2002). Entretanto, Fava Netto (1976) e Negroni e colaboradores (1976) documentaram possíveis problemas sobre os antígenos usados no diagnóstico sorológico; o que foi confirmado por Albuquerque e colaboradores (2005), em trabalho sobre diferentes frações de antígenos e sua relação com a especificidade e sensibilidade da técnica de ELISA. A identificação do fungo por meio de exame histopatológico revela que, nos granulomas pauci-parasitários, quando o agente etiológico é dificilmente observado e, nas formas diminutas, pode ser confundido com outros fungos dimórficos, como *Histoplasma ssp* e *Cryptococcus neoformans* (Bialek et al., 2000).

Os recentes avanços em biologia molecular proporcionaram o surgimento de várias técnicas de identificação e tipagem de patógenos: métodos não-invasivos, seguros e rápidos empregados no diagnóstico de doenças fúngicas. Em relação ao *P. brasiliensis*, várias metodologias vêm sendo constantemente descritas (Soares et al., 1995; Cisalpino et al., 1996; Calcagno et al., 1998; Moraes et al., 2000; Kurokawa et al., 2005).

No intuito de contribuir para um melhor conhecimento dos padrões de lesão e evolução clínica de pacientes portadores de PCM com lesões mucocutâneas, lado a lado com o diagnóstico clínico, dados histopatológicos, quantificação de TNF- α , e isolamento fúngico nos materiais de biópsias, a ferramenta molecular mostra-se de grande valor, com o objetivo de aprimorar e consolidar a técnica de detecção molecular do *P. brasiliensis*, de aumentar a sensibilidade e

especificidade no diagnóstico e de auxiliar a melhor caracterização da gravidade da doença.

Nesse sentido o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença do *P. brasiliensis*, com a reação em cadeia pela polimerase (PCR), em fragmentos de tecidos obtidos por biópsias de lesões mucocutâneas e sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose, apresentando diferentes formas clínicas e graus de gravidade, e comparar com os dados histopatológicos, sorológicos e de produção de TNF- α obtidos dos mesmos pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes. Foram avaliados 29 indivíduos, com diagnóstico confirmado de paracoccidioidomicose em atividade clínica, portadores de lesões em mucosa e/ou pele, atendidos no Serviço de Dermatologia e Radioterapia, da FMB, UNESP-Botucatu, nos períodos antes e após 30 e 60 dias do início do tratamento específico. Os pacientes forneceram amostras de 10 ml de sangue venoso periférico, coletados com heparina, para a obtenção de culturas de monócitos e dosagem de TNF- α por ELISA, e 2ml de sangue em três amostras consecutivas, no período pré-início tratamento, coletadas com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) potássico, para detecção molecular. As amostras de tecido cutâneo e/ou mucoso (*punch* de 5 mm) foram obtidas, no pré-tratamento, no momento do procedimento anestésico na coleta de biópsia para estudo anatomopatológico.

Estudo anatomopatológico. O material, fixado em formalina a 10% e incluído em parafina, foi corado pelos métodos de hematoxilina-eosina (HE) e impregnação pela prata (Método de Grocott-Gomori), onde foram analisadas as alterações presentes na epiderme e na derme, a morfologia predominante dos granulomas, a presença e a intensidade da fibrose, as características do infiltrado inflamatório e a presença de células fúngicas.

Cultura fúngica, PCR e seqüenciamento parcial do gene da gp43. Fragmentos das amostras de biópsias coletadas foram utilizados para possível isolamento de *P. brasiliensis* e cultivados em meio ágar Mycosel[®], adicionado de cloranfenicol (50 μ g/ml), por no mínimo sete dias a 37°C. A partir dos isolados obtidos, realizou-se a extração de DNA, de acordo com McCullough e colaboradores (2000), com o rompimento celular inicial com pérolas de vidro estéreis (425-600 micras) [Sigma, St. Louis, MO, USA] em solução de sorbitol 1M e EDTA 125mM. Um fragmento de cerca de 1066pb do gene da GP43 foi amplificado, utilizando o *primer* PC1 (5' TCATCTCACGTCGCATCTCACATT 3'), *sense*, descrito por Gomes e colaboradores (2000), e o *primer* Exon 2 (5' GCCCCCTCCGTCTTCCATGTCC 3'), *antisense*, delineado por Cisalpino e colaboradores (1996). O perfil de ciclagem ocorreu sob as seguintes condições: 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 60°C por 2min, e extensão a 72°C por 2min. Uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5min e uma etapa final de extensão a 72°C por 7min também foram incluídas. Os *amplicons* obtidos foram purificados empregando-se o kit comercial GFX PCR DNA and gel band (GE Healthcare[®]) e o seqüenciamento foi realizado pelo Centro de Genoma Humano, da Universidade de São Paulo (USP). As seqüências foram alinhadas com auxílio de *software* Mega 4.0 para a análise dos sítios polimórficos.

Análise sorológica. O antígeno utilizado no teste da imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) e no ensaio imunoenzimático (ELISA) foi obtido a partir de uma mistura do antígeno filtrado de cultura e antígeno somático (Ag-FC/S), conforme as especificações de Silva e colaboradores (1991).

Dosagem de TNF- α . Realizou-se cultura *in vitro* de monócitos do sangue periférico dos pacientes, obtidos nos períodos pré-tratamento (G1) e 30 (G2) e 60 dias (G3) pós-início do tratamento, na ausência (cultura não estimulada) ou presença (cultura estimulada) de 10 μ g/ml de lipopolissacáride (LPS) de *Escherichia coli* O₅₅B₅.

Extração de DNA de biópsia e sangue periférico. A extração das amostras de tecido foi realizada empregando-se o protocolo *in house* de digestão enzimática com proteinase K e purificações com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, enquanto que a extração de sangue total foi realizada por kit comercial (Qiagen®), conforme especificações do fabricante.

Primers para PCR e Nested-PCR. Para as reações de PCR foram empregados os *primers* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG-3') descritos por White e colaboradores (1990), e, para Nested-PCR, os *primers* PbITSE (5'-GAGCTTTGACGTCTGAGACC-3') e PbITSR (5'-AAGGGTGTGATCGAGAGAG-3'), delineados por Theodoro e colaboradores (2005).

Amplificação e detecção do DNA. As reações foram realizadas em volumes totais de 25 μ l contendo 20 μ M de cada *primer*, 0,2 unidades da enzima Taq-DNA-polimerase (Amershan Biosciences®), 60 μ M de cada desoxinucleotídeos trifosfatados e 10ng de DNA fúngico em tampão de reação (10 mM de Tris a pH 8, 1,5mM de MgCl₂ e 50mM de KCl). A incubação foi realizada em termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf®, Hamburg, Germany), de acordo com o seguinte perfil de ciclagem: 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 2 min, e extensão a 72°C por 2 min, para a PCR. Um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, e extensão final a 72°C por 7 min também foram incluídos. Para a Nested-PCR, desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 2 min, extensão a 72°C por 2 min, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min. Controles negativos (água ultrapura estéril), bem como positivos (DNA da amostra Pb18 de *P. brasiliensis*, isolado clínico de 1929) foram incluídos em todas as reações realizadas.

RESULTADOS

Foram estudados 29 pacientes com diagnóstico confirmado de paracoccidiodomicose, dos quais foram coletadas amostras de biópsia e de sangue para detecção molecular do *P. brasiliensis* de 28 pacientes e, amostras de sangue para cultura de células e dosagem de TNF- α de 22 pacientes. Os indivíduos foram classificados clinicamente segundo os órgãos e sistemas comprometidos, história clínica e parâmetros de gravidade, de acordo com Franco e colaboradores (1987) e Mendes (1994), sendo 83% da forma crônica (FCM) e 17% da forma aguda-subaguda (FA-SA).

Os dados anatomopatológicos de 29 pacientes, dos quais 18 (62%) apresentavam lesões cutâneas e 11 (38%) apresentavam lesões de mucosa,

demonstraram 100% de positividade para presença de *P. brasiliensis*. Observou-se hiperplasia da epiderme e presença de numerosos microabcessos de neutrófilos em 69% dos casos. Os granulomas epitelióides freqüentemente apresentavam células gigantes multinucleadas, contendo células leveduriformes do fungo, com gemulação múltipla. Plasmócitos foram abundantes em 71,5% dos casos, enquanto eosinófilos e neutrófilos apresentavam-se em quantidades variáveis. Grande quantidade de células fúngicas foi observada em 65,5% dos casos, algumas com multi-brotamentos; por outro lado, alguns casos apresentaram fungos esparsos e escassos (34,5%). Ainda com relação às células fúngicas encontradas, em 95% dos casos notou-se a presença de muitos fungos inviáveis e raros viáveis. Os granulomas apresentaram-se compactos e bem organizados em 52% dos casos avaliados, mas também foi observado granuloma frouxo em alguns casos (17,2%), com aspecto desorganizado do infiltrado e raras fibroses. Alguns fragmentos apresentaram um padrão misto, com presença de granulomas compactos intercalados por granulomas frouxos (17,2%), onde se observaram numerosas formas do fungo, livres ou no interior de células gigantes, e em outros não foi possível observar a presença de granulomas (13,6%). Na análise anatomopatológica, a presença de ulceração ocorreu em 38% dos casos e tecido necrótico foi observado em 7% dos casos.

Dos fragmentos de tecido obtidos de 28 pacientes, obteve-se cultura positiva para o *P. brasiliensis* em dez amostras (D01 a D11, excluindo-se a amostra D08), que foram mantidas a 36°C (levedura) e a 25°C (micélio). Dos nove isolados seqüenciados, de forma bem-resolvida, obtiveram-se 1066 nucleotídeos. As seqüências tiveram seu início no sítio 121 (5') e seu término no sítio 1187 (3'), considerando as mesmas posições da seqüência total depositada por Cisalpino e colaboradores (1996) [GenBank acess number: U26160]. Para o alinhamento das seqüências desconsiderou-se o íntron, pois o objetivo foi detectar polimorfismos que pudessem alterar a seqüência de aminoácidos da proteína. Dos 987 nucleotídeos analisados, observaram-se três sítios polimórficos (Tabela 1). Uma substituição de A para G foi encontrada no isolado D03, na posição 556, levando à alteração do aminoácido de asparagina (N) para aspartato (D); outra substituição de A para T, no isolado D05, na posição 689, o que levou à substituição do aminoácido glutamato (E) para valina (V); e por fim, uma substituição de T para C, nos isolados D05, D07, D09 e D11, na posição 1143, que se mostrou sinônima já que não alterou o aminoácido codificado (serina).

Tabela 1: Representação das substituições de nucleotídeos e aminoácidos encontradas no seqüenciamento parcial do gene gp43 de 10 isolados de *P. brasiliensis* obtidos de pacientes com PCM.

posição códon	Sítios	con	Ácidos nucléicos										Aminoácidos	
			D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D09	D10	D11	con	sub
1	556	A	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	N	D
2	689	A	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	E	V
3	1143	T	.	.	.	.	C	.	C	C	.	C	S	S*

con: seqüência consenso; **sub:** substituição; **sítios:** posição do nucleotídeo referente às seqüências depositadas no GenBank.

*: substituição sinônima, do códon TCT para TCC.

Nas análises sorológicas, de 27 pacientes avaliados, 74,1% apresentaram título 1:12800, 11,1% apresentaram 1:3200, 3,7% apresentaram 1:800 e 11,1% foram negativos para a técnica de ELISA. Utilizando-se a técnica de imunodifusão (ID), de 29 pacientes, 3,5% apresentaram título 1:512, 55,1% apresentaram 1:32, 3,5% apresentaram 1:16, 3,5% apresentaram 1:8, 10,3% apresentaram 1:4, 6,9% apresentaram 1:2 e 17,2% foram negativos.

Nos dados de produção de TNF- α , na fase pré-tratamento (G1), quando os pacientes foram dicotomizados em forma crônica e aguda-subaguda, não houve diferença significativa nos níveis de TNF- α produzidos e secretados pelos monócitos cultivados com e sem estímulo (Figura 1). Entretanto, quando os pacientes foram separados conforme sua gravidade (Figura 2), notou-se um aumento nos níveis dessa citocina, produzidos pelos monócitos não estimulados, nos pacientes na forma grave, em comparação à forma leve e moderada, e com o controle. A produção de TNF- α pelos monócitos estimulados com LPS também se mostrou gradativamente maior quanto maior a gravidade dos pacientes; entretanto, os níveis da citocina na forma grave não foram estatisticamente diferentes daqueles produzidos pelos indivíduos saudáveis.

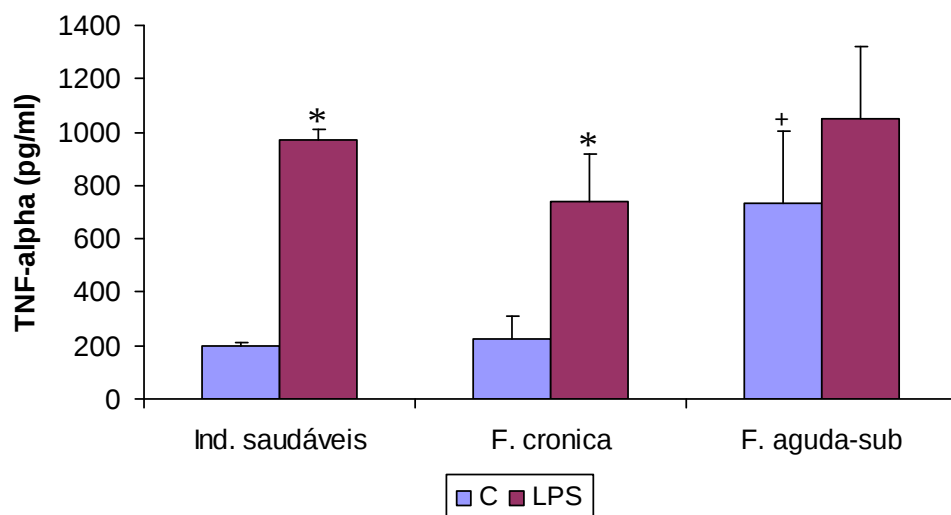


Figura 1: Comparação entre os níveis de TNF- α produzidos por monócitos de sangue periférico, estimulados ou não com LPS, de pacientes com paracoccidiodomicose, nas formas crônica e aguda-subaguda. C (controle) e LPS (estimulado)

* ($p < 0,01$) C X LPS (teste de Wilcoxon)

+ ($p < 0,01$) F.aguda-sub X F.crônica (teste de Mann-Whitney)

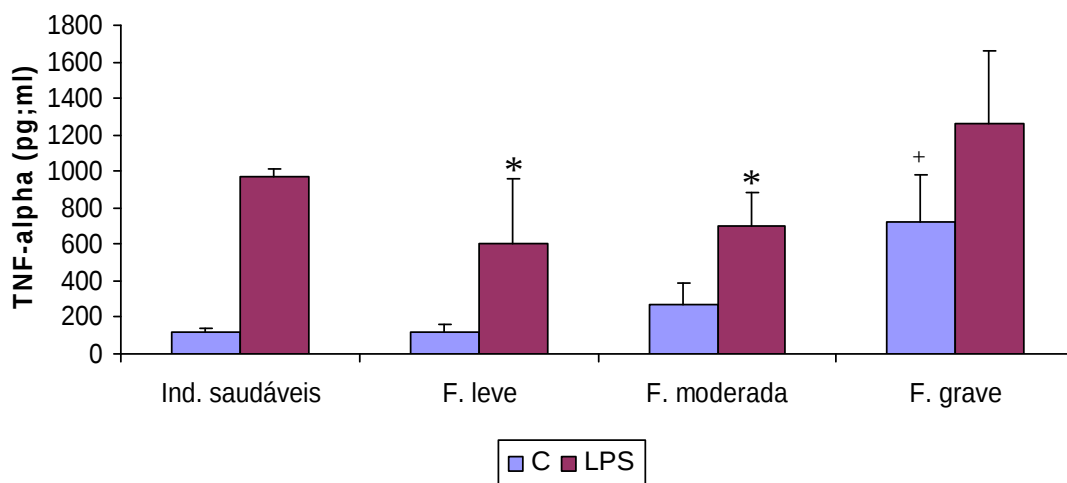


Figura 2: Comparação entre os níveis de TNF- α produzidos por monócitos de sangue periférico, estimulados ou não com LPS, de pacientes com paracoccidiodomicose, nas formas leve, moderada e grave.

* ($p < 0,05$) C X LPS (teste de Wilcoxon)

+ ($p < 0,01$) F.leve X F.grave; F.moderada X F.grave (teste de Mann-Whitney)

Além disso, realizou-se seguimento dos pacientes, através de coletas de sangue periférico nos períodos de 30 dias (G2) e 60 dias (G3) após o início do tratamento, para determinação dos níveis circulantes de TNF-a (Figura 3 e 4). Dessa forma, pode-se verificar uma cinética de produção espontânea e estimulada, ao longo do seguimento, comparando-se as formas clínicas (Figura 9) e os graus de gravidade (Figura 4).

Nota-se que, na comparação entre as culturas sem estímulo (C) e as culturas estimuladas (LPS), existe um aumento estatisticamente significativo nos níveis da citocina, observado na forma crônica da doença, nos três períodos avaliados. Além disso, comparando-se a produção espontânea, nas duas formas clínicas, observa-se maiores níveis de TNF-a na forma aguda-subaguda, somente no período pré-tratamento. Já na avaliação da produção da citocina por células estimuladas com LPS, nos dois grupos determinados, não se observaram diferenças estatisticamente significativas na produção de TNF- α (Figura 3).

Quando a comparação é feita nos períodos de coleta (G1, G2, G3), as células sem estímulo, dos indivíduos na forma crônica da doença, produzem níveis significativamente diferentes quando comparados entre si. O mesmo foi notado para os pacientes na forma aguda-subaguda e também para as células sob estímulo, em ambas as formas clínicas (Figura 3).

Não há diferenças estatísticas significantes quando se compara a produção dessa citocina por monócitos de indivíduos saudáveis com os níveis secretados por monócitos de pacientes no período de 60 dias pós-tratamento (dados não mostrados).

Com relação à Figura 4, pode-se observar que existe um maior aumento nos níveis de TNF-a pelas células estimuladas, em comparação as células sem estímulo, nos pacientes na forma moderada, no período pré-tratamento, e também nos pacientes na forma grave no período G2. Quando compara-se entre si os graus de gravidade nos três períodos de coleta, observa-se

diferenças estatísticas em todos os graus de gravidade, nas células sem estímulo; enquanto que, com relação as células estimuladas (LPS), a diferença foi significativa somente nas formas leve e moderada. No entanto, a comparação, entre os três grupos, dos níveis da citocina nas células estimuladas somente apresentou significância estatística no período G1.

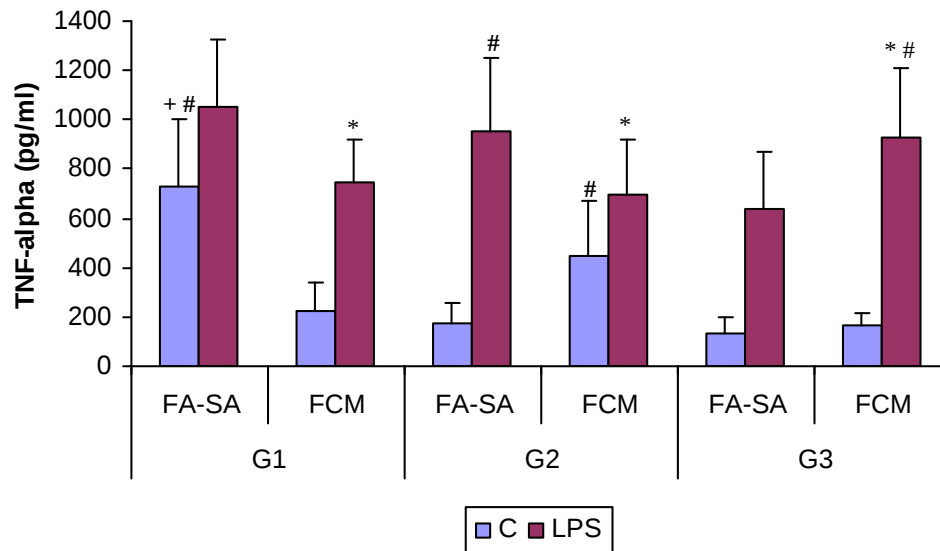


Figura 3: Comparação da produção de TNF-a por monócitos de sangue periférico, estimulados ou não com LPS, de indivíduos saudáveis e pacientes com paracoccidiodomicose em atividade, nas formas aguda/subaguda e crônica, nos diferentes períodos de coleta.

* ($p < 0,05$) C X LPS (teste pareado – Prova de Wilcoxon);

+ ($p < 0,01$) C(FA-SA) X C(FCM) (teste amostras independentes – Prova de Mann-Whitney);

($p < 0,05$) G1 X G2 X G3 (C – FCM e FA-SA; LPS – FCM e FA-SA) (teste de Friedman)

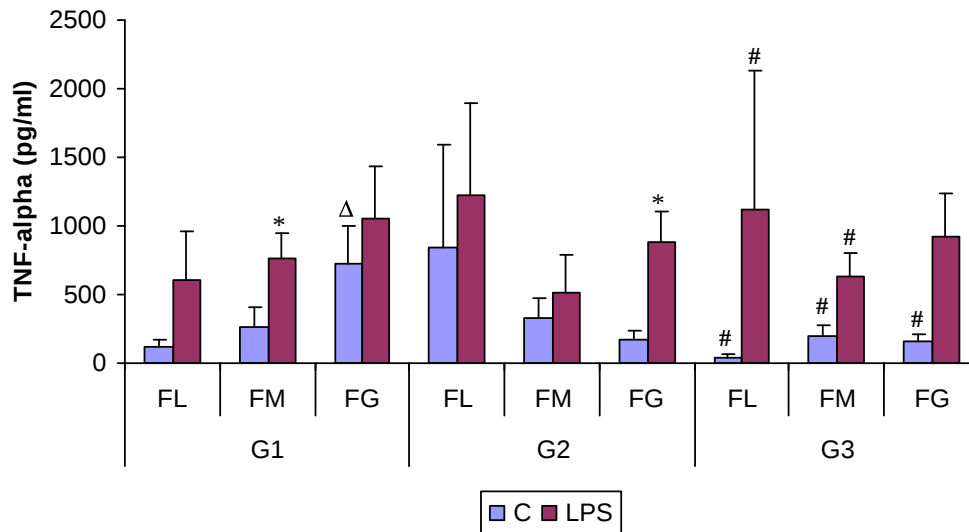


Figura 4: Comparação da produção de TNF-a por monócitos de sangue periférico, estimulados ou não com LPS, de indivíduos saudáveis e pacientes com paracoccidiodomicose em atividade, nas formas leve, moderada e grave, nos diferentes períodos de coleta.

* ($p < 0,05$) C X LPS (teste pareado – Prova de Wilcoxon);

Δ ($p < 0,05$) C(FL) X C(FM) X C(FG) (teste amostras independentes – Prova de Kruskal-Wallis);

($p < 0,05$) G1 X G2 X G3 (C – FCM e FA-SA; LPS – FCM e FA-SA) (teste de Friedman)

O resultado do processamento e análise das amostras de biópsia dos pacientes, através da PCR, seguida de *Nested-PCR*, foi de 56% de positividade; enquanto que não se obteve positividade do DNA extraído das amostras de sangue (Figura 5).

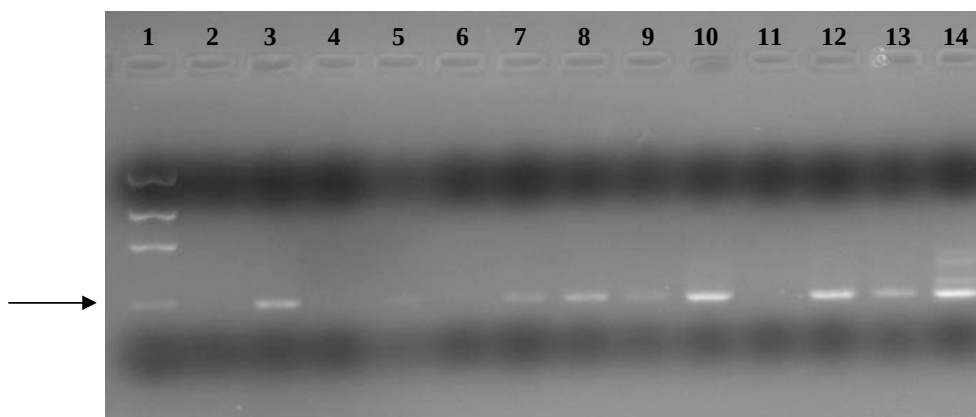


Figura 5: Padrão de bandas visualizadas após reações de *Nested-PCR* das amostras de sangue e tecido dos pacientes avaliados. Coluna: 1, marcador de 100pb; 2, controle negativo; 3 a 13, amplificações das amostras com *primers* PbITSE e PbITSR; 14, controle positivo. A seta indica bandas com 387pb.

DISCUSSÃO

No presente estudo, a detecção molecular de *P. brasiliensis* por *Nested-PCR* foi realizada em fragmentos de biópsias de lesões cutâneo-mucosas de pacientes com PCM ativa e comparada a outras técnicas utilizadas como rotina no diagnóstico dessa micose.

O diagnóstico baseia-se na identificação dos fungos em amostras obtidas de tecidos orgânicos, mais precisamente de lesões de pele e/ou mucosa dos pacientes, quando se visualiza e identifica a forma patogênica da levedura do *P. brasiliensis*, caracterizada pela figura em “roda de leme”, com a célula mãe circundada pelas células filhas (Lacaz *et al.*, 1991). Nesse sentido, a PCM é uma das poucas micoses sistêmicas cujo diagnóstico de certeza pode ser estabelecido pelo exame cito ou anatomopatológico.

A histopatologia das lesões fúngicas é extremamente útil, porém, nem sempre o diagnóstico é conclusivo. A dificuldade da técnica surge quando as lesões são pauci-fúngicas e há predomínio das formas diminutas ou inviáveis do fungo. Nesse estudo, utilizou-se as colorações de hematoxilina-eosina (HE) e prata-metanamina (método de Gomori-Grocott) para avaliação das amostras, o que resultou em visualização de processo inflamatório crônico granulomatoso, associado a infiltrado de células mononucleares, plasmócitos, eosinófilos e neutrófilos.

A resposta granulomatosa foi representada por granulomas compactos bem organizados, algumas vezes ao lado de áreas contendo granulomas frouxos mal definidos, explicada pela textura frouxa da derme e do cório, principalmente nas mucosas, onde, em geral, a inflamação paracoccidióidica é granulomatosa e mal definida, com formação de granulomas frouxos (Franco & Montenegro, 1982). Segundo Montenegro & Franco (1994), o granuloma presente na PCM pode apresentar forma complexa, com lesões pouco definidas, contendo grande quantidade de fungos, ou lesões epitelióides bem definidas, que circunscrevem os poucos fungos presentes.

As distintas manifestações clínicas observadas no tegumento dos pacientes correspondem à expressão morfológica de eventos imunopatológicos, que se estabelecem no curso da infecção, a partir da interação do *P. brasiliensis* com as células do hospedeiro, resultando na produção de citocinas e seus efeitos sobre a formação, intensidade e manutenção da resposta granulomatosa.

Teorias sobre a importância da resposta imune inata na proteção ou imunopatogenia, e o padrão da resposta imune adaptativa nas infecções fúngicas, dão embasamento a idéias sobre o fato de que a amplitude da resposta inflamatória inicial pode influenciar o prognóstico da doença. Em resposta a microrganismos, as células do hospedeiro liberam citocinas como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , que são responsáveis pela comunicação célula-célula e quimiotaxia de leucócitos para os sítios inflamatórios (Dustin, *et al.*, 1986). Como sugerido na literatura (Calich & Blotta, 2005), essas citocinas e muitas outras podem exercer um papel preponderante na patogênese da PCM.

A importância do TNF- α na resistência à infecção pelo *P. brasiliensis* e na formação de granulomas na PCM experimental foi demonstrada em camundongos deficientes do gene para o receptor p55 do TNF- α . Esses animais infectados com a cepa Pb18 do fungo, por via intravenosa, não desenvolviam granulomas pulmonares e as lesões eram constituídas por

infiltrado inflamatório contendo poucas células polimorfonucleares, mononucleares e grande número de células fúngicas. Esses resultados refletem o comprometimento dos mecanismos de defesa dos animais, associado à incapacidade de desenvolver reações granulomatosas, eficientes para conter a multiplicação fúngica (Souto *et al.*, 2000). Também tem sido demonstrado que o TNF- α atua na defesa contra o fungo através da indução no aumento da permeabilidade vascular e no acúmulo de macrófagos nos tecidos, bem como na sua diferenciação em células epitelióides, favorecendo a formação de granulomas mais compactos e, conseqüentemente, menor disseminação fúngica (Figueiredo *et al.*, 1993; Souto *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 2003).

Assim, é possível que nas lesões apresentadas pelos pacientes na fase pré-tratamento, constituintes da parede celular do fungo poderiam ser responsáveis pela indução da síntese de TNF- α , que resultaria no desenvolvimento da rede de citocinas inflamatórias, iniciando o recrutamento de monócitos e sua diferenciação no sítio da lesão.

O dano tecidual, comumente observado em pacientes com PCM, pode ser decorrente da presença do *P. brasiliensis* nos tecidos, que estimula a produção de TNF- α pelas células fagocíticas, levando à lesão tecidual através da produção exacerbada de metabólitos intermediários do oxigênio, collagenases, fibroblastos e das moléculas de adesão, por essas células ativadas. Assim, na paracoccidiodomicose, como em outras doenças granulomatosas como tuberculose (Bean *et al.*, 1999) e esquistossomose (Chensue *et al.*, 1995), o TNF- α parece estar envolvido na proteção contra os agentes infecciosos, através da indução da atividade fungicida de fagócitos mononucleares, na iniciação e manutenção da resposta granulomatosa, como também na imunopatogênese tecidual.

No presente estudo foi avaliado a produção sistêmica de TNF- α por monócitos de sangue periférico de pacientes com PCM, nos períodos pré-tratamento e 30 e 60 dias pós-tratamento. Os resultados demonstraram produção endógena elevada dessas citocinas por monócitos cultivados *in vitro* sem estímulo, e indicam que essas células encontram-se ativadas *in vivo*, durante a doença ativa. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Peraçoli e colaboradores (2003) e Parise-Fortes e colaboradores (2006), que verificam produção espontânea dessa citocina em pacientes com paracoccidiodomicose em atividade. Além disso, nossos resultados de níveis elevados dessa citocina nos pacientes com PCM nas formas mais graves, parece estar envolvido no papel deletério do TNF- α secretado em tais circunstâncias. Níveis elevados de TNF- α já foram detectados anteriormente em pacientes com PCM (Mendes *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1995; Peraçoli *et al.*, 2003; Calvi *et al.*, 2003; Parise-Fortes *et al.*, 2006).

A severidade da PCM está relacionada à resposta imune do hospedeiro e à virulência do agente infeccioso, uma vez que estudos demonstram a ocorrência de uma imunossupressão celular na doença ativa (Restrepo *et al.*, 1978; Mota *et al.*, 1988; Benard *et al.*, 1996; Karhawi *et al.*, 2000). Dessa forma, a queda na produção de TNF- α no seguimento dos pacientes no pós-tratamento, avaliada nesse estudo, pode estar relacionada ao restabelecimento da resposta imune celular no hospedeiro, uma vez que os níveis dessa citocina produzidos por monócitos não estimulados, detectados no grupo G3 (60 dias

pós-início do tratamento), não diferem estatisticamente dos níveis produzidos por indivíduos saudáveis.

Tal resposta pode estar relacionada à eficiência no tratamento empregado, observada pela evidente cura das lesões e melhora no quadro clínico geral do paciente nessa fase, que estaria atuando na eliminação do fungo, com conseqüente diminuição do estímulo de monócitos para produção de TNF- α . Em trabalho experimental, Scavone & Burger (2004) demonstraram a diminuição no número de fungos viáveis em baço e pulmões de camundongos *inbred* suscetíveis, após o tratamento com Sulfametoxazol-Trimetoprim (SMT-TMP), nas fases mais iniciais da infecção.

Técnicas baseadas na detecção de anticorpos também são consideradas úteis para o diagnóstico de micoses sistêmicas, principalmente na PCM e histoplasmose, e suas sensibilidades e especificidades dependem do antígeno e teste utilizados (Cano & Restrepo, 1987; Múnera *et al.*, 1989; Ferreira-da-Cruz *et al.*, 1990). Infelizmente, existem testes para detecção de anticorpos que empregam antígenos inadequados, levando à reatividades cruzadas com outras micoses (Camargo & Franco, 2000). Atualmente, a imunodifusão dupla (ID) é empregada na rotina de laboratórios clínicos, devido ao fácil manuseio, sua alta especificidade e uma sensibilidade de até 100% (Cano *et al.*, 1987). Assim, neste trabalho foram avaliados os resultados obtidos através de ID para os pacientes avaliados. Os resultados obtidos mostram que a maioria dos pacientes apresentou positividade nesta técnica, demonstrando uma sensibilidade de 80%.

Dos pacientes avaliados, cinco apresentaram resultados negativos. Nossos resultados estão de acordo com Do-Valle e colaboradores (2001), que detectaram resultados negativos em 28,5% de pacientes na forma juvenil e 7,3% na forma crônica. Segundo os autores, várias causas podem ser responsáveis pela negatividade, entre elas: um efeito pró-zona devido ao excesso de antígenos; a formação de imunecomplexos que oculta os epítomos; a presença de anticorpos assimétricos que possam inibir a ligação secundária em reações de precipitação; e os níveis de anticorpos abaixo da sensibilidade do método. Neves e colaboradores (2003) relataram a falta de reatividade da ID no soro de pacientes com PCM associada a produção de baixos títulos de IgG2 com baixa-avidez dirigidos contra carboidratos.

Dos poucos pacientes com ID negativo encontrados em nosso estudo, 100% foram classificados na forma crônica da doença, com gravidade leve a moderada, concordando com dados da literatura (Vidal *et al.*, 2005) que relataram a presença de negatividade em pacientes com forma crônica, localizada e mais benigna da doença, além de possível diminuição na produção de anticorpos.

Imunoensaios de fase sólida, em especial ELISA, são amplamente utilizados para quantificação de anticorpos tanto em clínica como em pesquisa. São ensaios considerados seguros e extremamente sensíveis, que fornecem resultados reprodutíveis (Camargo & Franco, 2000). Numa série de estudos, Mendes-Gianini e colaboradores (1984) e Camargo e colaboradores (1984) padronizaram um ELISA utilizando um antígeno de filtrado de leveduras do *P. brasiliensis*, constituído principalmente por gp43, e encontraram 95-100% de sensibilidade e 88-93,4% de especificidade.

Nos últimos anos, vários estudos demonstraram correlação entre a severidade da doença e altos títulos de anticorpos (Biagioni *et al.*, 1984; Robles

et al., 1990; Bueno *et al.*, 1997; Del Negro *et al.*, 2000). Essa associação pode ser importante na avaliação do prognóstico e seguimento terapêutico. Entretanto, Camargo & Franco (2000) demonstraram que alguns pacientes podem ser negativos para detecção de anticorpos anti-gp43, no ELISA, enquanto outros exibem níveis persistentes de anticorpos específicos no seguimento da doença. Em recente trabalho, Bertini e colaboradores (2007) também demonstraram um aumento nos títulos de IgG1 após o início do tratamento e uma queda nos níveis de anticorpos anti-Pb1 - um lipídio altamente expresso na superfície de leveduras - cinco meses pós-tratamento. Em nosso trabalho, avaliou-se a detecção de anticorpos anti-gp43 pela técnica de ELISA, no período pré-tratamento. Dos 27 pacientes analisados, obteve-se 89% de positividade, com títulos variando de 1:800 a 1:12800.

A porcentagem de indivíduos não reagentes pode estar relacionada, como descrito na literatura, às reações cruzadas com outros antígenos presentes na amostra testada, tal como observado no soro de pacientes com histoplasmose e lobomicose (Mendes-Gianini *et al.*, 1984; Camargo *et al.*, 1984; Cano *et al.*, 1986; Puccia & Travassos, 1991), representando resultados falso-negativos. A dificuldade em se obter uma técnica específica para o diagnóstico definitivo na PCM também foi recentemente observada por Albuquerque e colaboradores (2005), quando da padronização de um ELISA através de purificação da gp43 e diminuição da reatividade cruzada com *H. capsulatum*.

Sendo assim, a ocorrência de falso-negativos, a variação na sensibilidade e especificidade dessas técnicas, e a diversidade e complexidade da resposta imune humoral dos pacientes com PCM, sugerem que tanto a ID quanto o ELISA devem vir acompanhados de testes mais específicos e confiáveis para o diagnóstico e seguimento terapêutico (Gómez *et al.*, 1998).

Apesar de existirem várias técnicas importantes e extremamente utilizadas na pesquisa de *P. brasiliensis* em fluidos biológicos suspeitos, os métodos moleculares de detecção de DNA têm, cada vez mais, aberto possibilidades para o diagnóstico de micoses sistêmicas. Estudos com espécimes clínicos como sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR) e escarro, de pacientes com diferentes infecções fúngicas indicam que a PCR é um método mais sensível no diagnóstico de micoses invasivas quando comparado com métodos de cultivo (Reiss *et al.*, 1998). Em estudo empregando espécimes de escarro, DNA de *P. brasiliensis* foi detectado através da PCR para o gene da gp43 em 100% dos pacientes com infecção pulmonar (Gomes *et al.*, 2000). Goldani & Sugar (1998), utilizando primers para um fragmento específico de 62pb, foram capazes de detectar a presença do fungo no soro de camundongos experimentalmente infectados. Bialek *et al.* (2000) desenvolveram um *Nested-PCR* altamente sensível e específico para detecção de um fragmento da gp43 em macerado de pulmão de animais infectados e amostras clínicas de tecido. Este protocolo mostrou ser também útil na detecção do patógeno em materiais parafinados de pacientes (Ricci *et al.*, 2007).

Entretanto, na pesquisa do fungo em amostras de sangue de pacientes, coletadas no período pré-tratamento, nossos dados foram negativos na totalidade das amostras testadas. Esse dado está de acordo com Charbel e colaboradores (2006), que também não obtiveram êxito na detecção molecular do *P. brasiliensis* em amostras de soro de pacientes, demonstrando a pouca

utilidade desses espécimes no diagnóstico da PCM. A baixa taxa de detecção aqui relatada pode estar baseada na observação da escassez de fungemia pelo *P. brasiliensis* e de seu isolamento em culturas de sangue de pacientes e animais infectados (Singer-Vermes *et al.*, 1993).

Protocolos diversos para detecção molecular de espécies fúngicas em amostras de tecido humano ou animal são facilmente encontrados na literatura (Hendolin *et al.*, 2000; Bialek *et al.*, 2000; 2001; 2002a; 2002b; Rickerts *et al.*, 2006). A maioria dos autores baseiam-se na região ITS, que compreende as seqüências ITS1, 5.8S e ITS2 do DNA ribossomal, como alvo da amplificação do material genético fúngico. Isso se deve ao fato dessa região conter domínios conservados e variáveis, presentes na maioria dos fungos, que facilitam sua identificação (Iwen *et al.*, 2002). Assim, ensaios baseados no DNA, utilizando a região ITS como marcador molecular, demonstram grande potencial para o diagnóstico de infecções fúngicas (Chen *et al.*, 2002; Iwen *et al.*, 2002).

Com o objetivo de associar uma ferramenta molecular ao diagnóstico de *P. brasiliensis* em amostras de tecido, foi realizada uma reação de PCR, seguida de *Nested-PCR*, em fragmentos de biópsias coletadas de lesões de pele e/ou mucosa de pacientes com PCM. Os dados obtidos em nosso trabalho demonstraram que a *Nested-PCR* foi superior na detecção do fungo em comparação com seu cultivo (15 de 27 amostras versus 11 de 28 amostras). Por outro lado, na comparação da técnica molecular com o exame histopatológico, não se observou a mesma positividade (15 de 27 amostras versus 29 de 29 amostras).

A não detecção, ou baixa produção, do produto desejado provavelmente se deve à presença de outros materiais que competem com o DNA que se deseja amplificar. Tais materiais incluem: DNA do paciente, excesso de proteína, presença de contaminantes fúngicos ou bacterianos na amostra. Todos esses fatores podem formar bandas inespecíficas que competem com o DNA que se deseja amplificar (Innins & Gelfand, 1990).

Os resultados aqui obtidos indicam que os métodos de diagnóstico molecular da PCM são viáveis e já estão disponíveis para uso em rotina em laboratórios clínicos; entretanto, não podem ser empregados como única forma de diagnóstico e sim associados aos demais procedimentos de detecção (cultura, sorologia, histopatologia, dados clínicos e epidemiológicos).

Além do uso no diagnóstico, as ferramentas moleculares podem ser extremamente úteis em estudos filogenéticos. Dados da literatura apontam que o *P. brasiliensis* tem demonstrado ampla variabilidade gênica quando analisado por técnicas como RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), RAPD (Soares *et al.*, 1995; Niño-Vega *et al.*, 2000) e cariotipagem eletroforética (Montoya *et al.*, 1997). Uma vez que as características morfológicas que diferenciam as espécies não são claramente identificáveis nos fungos e podem ser geneticamente isoladas antes de sua manifestação (Taylor *et al.*, 1999), torna-se necessário a caracterização dessas alterações genéticas entre os isolados obtidos na natureza, de animais ou de espécimes clínicos.

Nesse sentido, utilizando *primers* baseados no gene da gp43 (Gomes *et al.*, 2000; Bialek *et al.*, 2000; Ricci *et al.*, 2007) foi demonstrada uma substituição de nucleotídeos, quando comparadas entre si seqüências do gene da gp43 de 17 cepas de *P. brasiliensis*. Essas substituições foram agrupadas em sítios informativos e não-informativos, demonstrando o alto grau de polimorfismo desse gene.

Outros trabalhos também têm demonstrado variações genéticas no principal antígeno imunodominante do *P. brasiliensis*, a gp43. Através de seqüenciamento de dois fragmentos do gene da proteína e comparação entre isolados clínicos de pacientes com formas aguda e crônica da PCM, Moraes e colaboradores (2000) observaram grande polimorfismo do gene codificador da gp43 entre os diferentes isolados. O mesmo foi observado por Matute e colaboradores (2006), quando analisaram seqüências de DNA de oito regiões a partir de cinco genes nucleares codificadores, incluindo o gene da gp43, e observaram variações de genealogia dos isolados, que puderam ser distinguidos em três espécies crípticas.

Com o intuito de avaliar uma possível variação genética entre as amostras e correlacioná-las às diferentes formas clínicas e resposta imunológica dos pacientes com PCM, realizou-se o seqüenciamento parcial do gene da gp43. Os isolados analisados foram obtidos através do cultivo de fragmento das biópsias de pele e/ou mucosa. Os dados das análises e comparações das amostras, entre si e com a seqüência consenso, mostram uma substituição de aminoácidos, devido à troca de bases nessas posições, em dois (D03 e D05) dos dez isolados. Observou-se também uma substituição não-informativa nos isolados D05, D07, D09 e D11, que não resultou em alteração do aminoácido em questão. Todavia, comparando-se os aspectos clínicos, de resposta imune e as análises histopatológicas, sorológicas e de produção de TNF- α dos pacientes dos quais se obteve tais isolados polimórficos, percebe-se que não há padrão com relação a esses parâmetros, nos respectivos pacientes.

A análise do seqüenciamento dessas amostras demonstra que pode haver alterações significativas na síntese da gp43 e que isso pode influenciar a resposta imune contra o fungo e como o fungo reage aos mecanismos protetores do hospedeiro. Entretanto, outros fatores inerentes ao indivíduo infectado, podem interferir nessa interação, tais como fatores genéticos, nutricionais e ambientais.

Diante dos dados apresentados, observa-se a possibilidade do uso de ferramentas moleculares, como a *Nested-PCR*, na detecção do *P. brasiliensis* em amostras biológicas de indivíduos infectados. Tais técnicas podem ser auxiliares no diagnóstico da PCM, principalmente em casos onde os métodos usuais falham ou requerem tempo demasiado.

Em conclusão, o uso da técnica de *Nested-PCR* para detecção de *P. brasiliensis* em amostras de tecido cutâneo e/ou mucoso é plausível e pode ser utilizada como técnica auxiliar no diagnóstico da Paracoccidioidomicose.

Nas formas mais graves da PCM, os níveis de TNF- α estão mais elevados em comparação aos pacientes com formas leves e aos indivíduos saudáveis, e diminuem a partir de 60 dias pós-tratamento. Além disso, na forma aguda-subaguda, os níveis dessa citocina estão mais elevados em comparação aos pacientes na forma crônica.

O seqüenciamento molecular parcial do gene da gp43 nas amostras isoladas em cultura aponta polimorfismos informativos e não-informativos. Tais alterações não se correlacionam aos dados de detecção molecular, aos níveis de TNF- α avaliados e aos dados de histopatologia dos pacientes.

AGRADECIMENTOS

À FUNDUNESP, CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro.

Aos pacientes, que consentiram em participar da pesquisa e aos médicos-residentes do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela coleta das amostras.

Ao professor Dr. Carlos Efraim, do Departamento de Matemática, da Universidade Regional de Blumenau - FURB, pelo auxílio na análise estatística do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. **Albuquerque, C. F., S. H. Marques da Silva, and Z. P. Camargo.** 2005. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1944-1946.
2. **Bean, A. G., D. R. Roach, H. Briscoe, M. P. France, H. Korner, J. D. Sedgwick, and W. J. Britton.** 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated by lymphotoxin. *J. Immunol.* **162**:3504-3511.
3. **Benard, G., M. A. Hong, G. M. B. Del Negro, L. Batista, M. A. Shikanai-Yasuda, and A. J. S. Duarte.** 1996. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**:7-12.
4. **Bertini, S., A. L. Colombo, H. K. Takahashi, and A. H. Strauss.** 2007. Expression of antibodies directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of paracoccidioidomycosis treatment. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**:150-156.
5. **Bethlem, E. P., D. Capone, B. Maranhão, C. R. Carvalho, and B. Wanke.** 1999. Paracoccidioidomycosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **5**:319-325.
6. **Biagioni, L., M. J. Souza, L. G. Chamma, R. P. Mendes, S. A. Marques, N. G. Mota, and M. Franco.** 1984. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**:617-621.
7. **Bialek, R., A. Ibricevic, C. Aepinus, L. K. Najvar, A. W. Fothergill, J. Knobloch, and J. R. Graybill.** 2000. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a Nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2940-2942.
8. **Bialek, R., J. Fischer, A. Feucht, L. K. Najvar, K. Dietz, J. Knobloch, and J. R. Graybill.** 2001. Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a Nested-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1506-1509.
9. **Bialek, R., A. Feucht, C. Aepinus, G. Just-Nubling, V. J. Robertson, J. Knobloch, and R. Hohle.** 2002a. Evaluation of two Nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1644-1647.
10. **Bialek, R., M. Weiss, K. Bekure-Nemariam, L. K. Najvar, M. B. Alberdi, J. R. Graybill, and U. Reischl.** 2002b. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by Nested and real-time PCR assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**:461-466.
11. **Bueno, J. P., M. J. S. Mendes-Gianini, G. M. B. Del Negro, C. M. Assis, C. K. Takiguti, and M. A. Shikanai-Yasuda.** 1997. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmuno-electrophoresis and complement fixation. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**:213-217.

12. **Calcagno, A. M., G. Nino-Vega, F. San-Blas, and G. San-Blas.** 1998. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1733-1736.
13. **Calich, V. L. G., and M. H. S. L. Blotta.** 2005. Pulmonary paracoccidioidomycosis. In Fidel PL, Huffnagle GB, (ed.), *Fungal immunology: from organ perspective*. New York: Springer, p. 201-27.
14. **Camargo, Z. P., J. L. Guesdon, E. Drochet, and L. Improvisi.** 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmunoelectrophoresis and erythro-immunoassay. *Mycopathologia.* **8**:31-37.
15. **Camargo, Z. P., and M. F. Franco.** 2000. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev. Iberoam. Micol.* **17**:41-48.
16. **Cano, L. E., E. Brummer, D. A. Stevens, and A. Restrepo.** 1986. An evaluation of the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for quantitation of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* **24**:467-475.
17. **Cano, L. E., and A. Restrepo.** 1987. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **29**:276-283.
18. **Charbel, C. E., J. E. Levi, and J. E. C. Martins.** 2006. Evaluation of polymerase chain reaction of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA on serum samples from patients with paracoccidioidomycosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **101**:219-221.
19. **Chen, S. C. A., C. L. Halliday, and W. Meyer.** 2002. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med. Mycol.* **40**:333-357.
20. **Chensue, S. W., K. S. Warmington, J. H. Ruth, P. Lincoln, and S. L. Kunkel.** 1995. Cytokine function during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Local and regional participation of IFN-gamma, IL-10 and TNF-alpha. *J. Immunol.* **154**:5969-5976.
21. **Cisalpino, P. S., R. Puccia, L. M. Yamauchi, M. I. Cano, J. F. Silveira, and L. R. Travassos.** 1996. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Biol. Chem.* **271**:4553-4560.
22. **Del Negro, G. M., C. N. Pereira, H. F. Andrade, S. A. Palacios, M. M. Vidal, C. E. Charbel, and G. Benard.** 2000. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. *J. Med. Microbiol.* **49**:37-46.
23. **Dooley, D. P., R. A. Cox, K. L. Hestilow, M. J. Dolan, and D. M. Magee.** 1994. Cytokine induction in human coccidioidomycosis. *Infect. Immun.* **62**:3980-3983.
24. **Do Valle, A. C. F., R. L. B. Costa, P. C. Fialho Monteiro, J. Von Helder, M. M. Muniz, and R. M. Zancopé-Oliveira.** 2001. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* **39**:373-377.
25. **Dustin, M. L., R. Rothlein, A. K. Bhan, C. A. Dinarello, and T. A. Springer.** 1986. Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* **137**:245-254.
26. **Fava Netto C.** 1976. Paracoccidioidomycosis immunology. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **18**:42-53.
27. **Ferreira-da-Cruz, M. F., A. C. F. Vale, M. C. D. Espinera, B. Wanke, and B. Galvão-de-Castro.** 1990. Study of antibodies in paracoccidioidomycosis: follow-up of patients during and after treatment. *J. Med. Vet. Mycol.* **28**:151-157.
28. **Figueiredo, F., L. M. C. Alves, and C. L. Silva.** 1993. Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin. Exp. Immunol.* **93**:189-194.
29. **Franco, M. F., and M. R. Montenegro.** Anatomia patológica. In Del Negro G, Lacaz CS, Fiorello AM, (ed.), *Paracoccidioidomycose*. São Paulo: Sarvier; 1982. p. 97-117.

30. **Franco, M., M. R. Montenegro, R. P. Mendes, S. A. Marques, N. L. Dillon, and N. G. Mota.** 1987. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev. Soc. Med. Trop.* **20**:129-32.
31. **Franco, M., M. R. Montenegro, R. P. Mendes, S. A. Marques, N. L. Dillon, and N. G. Mota.** 1989. Paracoccidioidomycosis. *Baill's. Clin. Trop. Med. Commun. Dis.* **4**:185-200.
32. **Franco, M., M. T. S. Peraçoli, A. M. V. C. Soares, M. R. Montenegro, R. P. Mendes, and D. A. Meira.** 1993. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr. Top. Med. Mycol.* **5**:115-149.
33. **Giraldo, R., A. Restrepo, F. Gutiérrez, M. Robledo, F. Londono, H. Hernández, F. Sierra, G. Calle.** 1976. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. *Mycopathologia* **58**:63-70.
34. **Goldani, L. Z., and A. M. Sugar.** 1998. Short report: use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**:152-153.
35. **Gomes, G. M., P. S. Cisalpino, C. P. Taborda, and Z. P. Camargo.** 2000. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3478-3480.
36. **Gómez, B. L., J. I. Figueroa, A. J. Hamilton, S. Díez, M. Rojas, A. M. Tobón, R. J. Hay, and A. Restrepo.** 1998. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87-kilodalton determinant during and after antifungal therapy. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3309-3316.
37. **Gonzalez, A., J. H. Sahaza, B. L. Ortiz, A. Restrepo, and L. E. Cano.** 2003. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Med. Mycol.* **41**:391-399.
38. **Hendolin PH, Paulin L, Koukila-Kahkola P, Antilla VJ, Malmberg H, Richardson M, and J. Ylikoski.** 2000. Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue samples. *J. Clin. Microbiol.* **38**:4186-4192.
39. **Innins, M. A., and D. H. Gelfand.** Optimization of PCRs. *In* Innins MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, (ed.), *PCR protocols – A guide to methods and applications*. New York: Academic Press. 1990. p. 3-12.
40. **Iwen, P. C., S. H. Hinrichs, and M. E. Rupp.** 2002. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med. Mycol.* **40**:87-109.
41. **Karhawi, A. S., A. L. Colombo, and R. Salomão.** 2000. Production of IFN- γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. *Med. Mycol.* **38**:225-229.
42. **Kurokawa, C. S., C. R. Lopes, M. F. Sugizaki, E. E. Kuramae, M. F. Franco, and M. T. S. Peraçoli.** 2005. Virulence profile of ten *P. brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. *Rev. Inst. Med. Trop, São Paulo* **47**:257-262.
43. **Lacaz, C. S., E. Porto, and J. E. C. Martins.** Paracoccidioidomycose. *In* Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, (ed.), *Micologia Médica*. São Paulo: Ed. Sarvier, 1991. p. 248-92.
44. **Londero, A. T., and L. C. Severo.** 1981. The gamut of progressive pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* **75**:65-74.
45. **Louie, A., A. L. Baltch, R. P. Smith, M. A. Franke, W. J. Ritz, J. K. Singh, and M. A. Gordon.** 1994. Tumor necrosis factor alpha has a protective role in murine model of systemic candidiasis. *Infect. Immun.* **62**:2761-2772.
46. **Mamoni, R. L., S. A. Nouér, S. J. Oliveira, C. C. Musatti, C. L. Rossi, Z. P. Camargo, and M. H. Blotta.** 2002. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* **40**:153-159.

47. **Marques, S. A.** Cutaneous lesions. In M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno, G. Del Negro (ed.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, FL. 1994. p. 259-266.
48. **Martins, R., S. A. Marques, M. Alves, D. Fecchio, and M. F. Franco.** 1997. Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with itraconazole using Dot-blot, ELISA and Western-blot. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **39**:261-269.
49. **Matute, D. R., J. G. McEwen, R. Puccia, B. A. Montes, G. San-Blas, E. Bagagli, J. T. Rauscher, A. Restrepo, F. Morais, G. Nino-Veja, and J. W. Taylor.** 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* **23**:65-73.
50. **McCullough, M. J., A. F. Disalvo, K. V. Clemons, P. Park, and D. A. Stevens.** 2000. Molecular epidemiology of *Blastomyces dermatitidis*. *Clin. Infect. Dis.* **30**:328-335.
51. **Mendes, R. P., P. C. M. Pereira, D. A. Meira, J. Marcondes-Machado, B. Barraviera, M. T. Rezkallah-Iwasso, et al.** 1988. Paracoccidioidomicose juvenil. Estudo retrospectivo de 30 casos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **21**:47.
52. **Mendes, R. P., M. A. Scheinberg, M. T. Rezkallah-Iwasso, D. A. Scheinberg, D. A. Meira, J. Marcondes-Machado, et al.** 1991. Evaluation of tumor necrosis factor (TNF) in sera of patients with paracoccidioidomycosis (PCM). p. 11. Proceedings of the Congress of International Society for Human and Animal Mycology. Montreal: Canada.
53. **Mendes, R. P.** 1994. The gamut of clinical manifestations, p. 233-258. In M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno, and G. Del Negro (ed.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, FL.
54. **Mendes, R. P.** 1997. Quadro clínico, p. 1803. In R. Veronesi, and R. Foccacia (ed.), *Tratado de Infectologia*. Atheneu, Rio de Janeiro, RJ.
55. **Mendes-Gianini, M. J. S., M. E. Camargo, C. S. Lacaz, and A. W. Ferreira.** 1984. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **20**:103-108.
56. **Montenegro, M. R., and M. Franco.** 1994. Pathology, p. 131-150. In M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno, and G. Del Negro (ed.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, FL.
57. **Morais, F. V., T. F. Barros, M. K. Fukada, P. S. Cisalpino, and R. Puccia.** 2000. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3960-3966.
58. **Mota, N. G. S., M. T. S. Peraçoli, R. P. Mendes, C. R. Gattass, S. A. Marques, A. M. Soares, I. C. Izatto, and M. T. Rezkallah-Iwasso.** 1988. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* **26**:105-111.
59. **Motoyama, A. B., E. J. Venancio, G. O. Brandão, S. Petrofeza-Silva, I. S. Pereira, C. M. Soares, and M. S. Felipe.** 2000. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3106-3109.
60. **Múnera, M. I., M. S. Naranjo, I. Gómez, and A. Restrepo.** 1989. Seguimiento post-terapia de pacientes con paracoccidioidomicosis tratados con itraconazol. *Medicina UPB* **8**:33-37.
61. **Negróni, R., C. I. de Flores, and A. M. Robles.** 1976. Study of serologic cross reactions between the antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Histoplasma capsulatum*. *Rev. Asoc. Argent. Microbiol.* **8**:68-73.
62. **Neves, A. R., R. L. Mamoni, C. L. Rossi, Z. P. Camargo, and M. H. S. L. Blotta.** 2003. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2

- antibodies directed against carbohydrate epitopes. Clin. Diag. Lab. Immunol. **10**:802-807.
63. **Niño-Vega, G. A., A. M. Calcagno, G. San-Blas, F. San-Blas, G. W. Gooday, N. A. Gow.** 2000. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med. Mycol. **38**:437-441.
 64. **Ortiz, B. L., S. Diez, M. E. Uran, J. M. Rivas, M. Romero, V. Caicedo, A. Restrepo, and J. G. McEwen.** 1998. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Clin. Diag. Lab. Immunol. **5**:826-830.
 65. **Parise-Fortes, M. R., S. A. Marques, A. M. Soares, C. S. Kurokawa, M. E. A. Marques, and M. T. S. Peraçoli.** 2006. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. Brit. J. Dermatol. **154**:643-650.
 66. **Peraçoli, M. T., C. S. Kurokawa, S. A. Calvi, R. P. Mendes, P. C. Pereira, S. A. Marques, and A. M. Soares.** 2003. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. Microbes Infect. **5**:413-418.
 67. **Pereira, C. B., M. Palaci, O. H. M. Leite, A. J. S. Duarte, and G. Benard.** 2004. Monocyte cytokine secretion in patients with pulmonary tuberculosis differs from that of healthy infected subjects and correlates with clinical manifestations. Microbes Infect. **6**:25-33.
 68. **Puccia, R., and L. R. Travassos.** 1991. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. J. Clin. Microbiol. **29**:1610-1615.
 69. **Reiss, E., K. Tanaka, G. Bruker, V. Chazalet, D. Coleman, J. P. Debeauvais, R. Hanazawa, J. P. Latgé, J. Lortholary, K. Makimura, C. J. Morrison, S. Y. Murayama, S. Naoe, S. Paris, J. Sarfati, K. Shibuya, D. Sullivan, K. Uchida, and H. Yamaguchi.** 1998. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. Med. Mycol. **36**:249-257.
 70. **Restrepo, A., D. L. Greer, and M. Vasconcellos.** 1973. Paracoccidioidomycosis: a review. Rev. Med. Vet. Mycol. **8**:97-123.
 71. **Restrepo, A., M. Restrepo, F. Restrepo, L. H. Aristizábal, L. H. Moncada, and H. Velez.** 1978. Immune response in paracoccidioidomycosis. A controlled study of 16 patients before and after treatment. Sabouraudia. **16**:151-163.
 72. **Restrepo, A.** 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. J. Med. Vet. Mycol. **23**:323-334.
 73. **Restrepo, A.** 1988. Immune response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Curr. Top. Med. Mycol. **2**:239-277.
 74. **Ricci, G., I. D. da Silva, A. Sano, R. C. Borra, and M. Franco.** 2007. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR in biopsies from patients with paracoccidioidomycosis: correlation with the histopathological pattern. Pathologica **99**:41-45.
 75. **Rickerts, V., G. Just-Nubling, F. Konrad, J. Kern, E. Lambrecht, A. Bohme, V. Jacobi, and R. Bialek.** 2006. Diagnosis of invasive aspergillosis and mucormycosis in immunocompromised patients by seminested PCR assay of tissue samples. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **25**:8-13.
 76. **Robles, A. M., A. I. Arechavala, R. Negroni, and J. L. Finquelievich.** 1990. Estudio de algunas técnicas inmunológicas en pacientes con paracoccidioidomycosis. Rev. Arg. Micología. **13**: 15-25.
 77. **Rook, G. A., J. Taverne, C. Leveton, and J. Steele.** 1987. The role of gamma-interferon, vitamin D₃ metabolites and tumor necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. Immunology. **62**:229-234.

78. **Salina, M. A., M. A. Shikanai-Yasuda, R. P. Mendes, B. Barraviera, and M. J. Mendes-Giannini.** 1998. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1723-1728.
79. **San-Blas, F., and G. San-Blas.** 1985. *Paracoccidioides brasiliensis*, p. 93-120. In P. J. Szaniszló (ed.) *Fungal dimorphism*. Plenum, New York, NY.
80. **Sano, A., K. Yokoyama, M. Tamura, Y. Mikami, I. Takahashi, K. Fukushima, M. Miyaji, and K. Nishimura.** 2001. Detection of gp43 and ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal RNA genes of *Paracoccidioides brasiliensis* in paraffin-embedded tissue. *Nippon. Ishinkin. Gakkai. Zasshi.* **42**:23-27.
81. **Scavone, R., and E. Burger.** 2004. Paracoccidioidomycosis: reduction in fungal load and abrogation of delayed-type hypersensitivity anergy in susceptible inbred mice submitted to therapy with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Med. Microbiol. Immunol.* **193**:53-59.
82. **Silva, C. L., and F. Figueiredo.** 1991. Tumor necrosis factor in paracoccidioidomycosis patients. *J. Infect. Dis.* **164**:1033-1034.
83. **Silva, C. L., M. F. Silva, L. H. Faccioli, R. C. Pietro, S. A. Cortez, and N. T. Foss.** 1995. Differential correlation between interleukin patterns in disseminated and chronic human paracoccidioidomycosis. *Clin. Exp. Immunol.* **101**:314-320.
84. **Singer-Vermes, L. M., C. B. Caldeira, E. Burger, and V. L. G. Calich.** 1993. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin. Exp. Immunol.* **94**:75-79.
85. **Smith, J. G., D. M. Magee, D. M. Williams, and J. R. Graybill.** 1990. Tumor necrosis factor- α plays a role in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *J. Infect. Dis.* **162**:1349-1353.
86. **Soares, C. M., E. E. Madlun, S. P. Silva, M. Pereira, and M. S. Felipe.** 1995. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* **33**:505-507.
87. **Souto, J. T., F. Figueiredo, A. Furlaneto, K. Pfeffer, M. A. Rossi, and J. S. Silva.** 2000. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.* **156**:1811-1820.
88. **Taylor, J., D. Jacobson, and M. Fisher.** 1999. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**:197-246.
89. **Tracey, K. J., and A. Cerami.** 1994. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* **45**:491-503.
90. **Travassos, L. R., R. Puccia, P. Cisalpino, C. Taborda, E. G. Rodrigues, M. Rodrigues, J. F. Silveira, and I. C. Almeida.** 1995. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res.* **26**:297-304.
91. **Vidal, M. S. M., G. Benard, T. Brito, K. C. Dantas, C. N. Pereira, F. O. S. França, A. M. da Silva, and J. E. Martins.** 2005. Atypical serological response marked by a lack of detectable anti-gp43 antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **43**:3014-3016.
92. **Wanke, B., and A. T. Londero.** 1994. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection, p. 109-20. In M. Franco, C. S. Lacaz, and G. Del Negro (ed.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, FL.

ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

BOTUCATU - SP- CEP 18.618-000 - FONE (14) 3811-6058 - FAX (14) 3811-3744

e-mail : microimunologia@ibb.unesp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que fui informado e esclarecido sobre o projeto de pesquisa intitulado “Detecção molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* em amostras de tecido e sangue periférico de pacientes portadores de Paracoccidioidomicose. Correlação com perfis histopatológico, sorológico e produção de TNF- α ”.

A paracoccidioidomicose é uma doença infecciosa crônica, causada por um fungo, o *Paracoccidioides brasiliensis*. A doença é grave, necessitando de tratamento e assistência constante.

Fui informado que o referido projeto tem por finalidade avaliar a utilidade do método na detecção do fungo que causa minha doença. O qual pode estar presente no sangue e em lesão específica de pele ou de mucosa que eu possa apresentar. Fui informado que a amostra de sangue que irei fornecer faz parte da que será coletada como rotina para outros exames relativos à minha doença. E, que a amostra de tecido será obtida ao mesmo tempo e com o mesmo procedimento anestésico em que fornecerei amostra para exame de rotina do serviço. Fui também informado que o procedimento de coleta de sangue será repetido após 30 e 60 dias do início do tratamento como controle de resultado do tratamento. Fui informado que o referido projeto não modifica o tipo de tratamento clínico e o acompanhamento clínico que o Serviço habitualmente pratica.

Fui esclarecido que minha participação no referido projeto é voluntária e que dele posso não participar ou dele me retirar sem que exista qualquer tipo de prejuízo para o meu tratamento e seguimento neste Serviço de Dermatologia ou neste Hospital. Fui esclarecido que, em caso de dúvida que eu ou meus familiares diretos possam ter, posso procurar os pesquisadores responsáveis, Dr. Silvio Alencar Marques e a Bióloga Keila Zaniboni Siqueira, nos telefones e endereços abaixo.

Portanto dou meu consentimento livre e esclarecido.

Nome.....

Assinatura.....

Data:...../...../.....

Silvio Alencar Marques
Orientador da Pesquisa
Depto de Dermatologia e Radioterapia
UNESP/Botucatu-SP
Telefone: 14-38116015

Keila Zaniboni Siqueira
Pesquisadora Responsável
Depto. de Microbiologia e Imunologia
UNESP/Botucatu-SP
Telefone: 14-38116058

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.