

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 03/08/2019.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Débora de Fátima Almeida

**Fibrose pulmonar na paracoccidioidomicose: influência do
fungo e do hospedeiro na fibrogênese**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. James Venturini

**Botucatu
2017**

Débora de Fátima Almeida

Fibrose pulmonar na paracoccidioidomicose: influência do fungo e do hospedeiro na fibrogênese

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof.Dr. James Venturini

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Almeida, Débora de Fátima.

Fibrose pulmonar na paracoccidioidomicose : influência do fungo e do hospedeiro na fibrogênese / Débora de Fátima Almeida. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: James Venturini
Capes: 21102007

1. Pulmões - Doenças. 2. Fibroblastos. 3. Fibrose pulmonar. 4. Paracoccidioidomicose. 5. *Paracoccidioides*.

Palavras-chave: Fibroblasto pulmonar; Fibrose pulmonar; *Paracoccidioides*.

*“A verdadeira riqueza de um homem é o bem que ele faz ao
seu semelhante.”*

(Mahatma Gandhi)

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os pacientes portadores da Paracoccidioídomicose. Espero que estes achados possam auxiliar futuros estudos.



Agradecimientos

Agradecimentos

À minha mãe Fátima e ao meu pai Luiz por todo o amor e cuidado. Por sempre acreditarem na minha capacidade e me apoiarem nas dificuldades da vida.

Ao meu grande amor Bruno Donanzam, por estar do meu lado nos momentos bons e ruins sempre me dando colo nos momentos de fraqueza, puxão de orelha quando foi preciso e acima de tudo por sempre querer o meu bem. Obrigada por me fazer rir, por me dar esperança e por todo o amor.

Ao meu orientador Dr. James Venturini por tornar possível todas as minhas conquistas, me permitir ser sua primeira orientada na iniciação científica e me acompanhar também no mestrado. Foi uma honra fazer parte do grupo tão bonito que é o LIPE. Conviver com você me fez amadurecer tanto na vida profissional como na pessoal. Hoje eu percebo o quanto eu cresci convivendo com você e te desejo cada vez mais sucesso.

À Dra. Tatiani Donato por me ajudar na fase mais difícil do Mestrado e acima de tudo pela amizade. Você não só me ajudou a superar as dificuldades, você tornou esse trabalho possível. Saiba que me inspiro muito no seu jeito leve de viver e sou muito agradecida por toda ajuda.

Às minhas amigas e companheiras de longa data Amanda Ribeiro e Angela Finato que estão comigo desde a iniciação científica. Somos pessoas tão diferentes e como foi bom conhecer vocês! Foram longos anos de amizade, aprendizado, superação de dificuldades e trabalho em equipe. Crescemos juntas nesse mundo acadêmico. Vocês marcaram a minha vida e quero que saibam que mesmo que sigamos caminhos diferentes no futuro, sempre guardarei vocês no meu coração.

Aos meus companheiros do Lipe e todos os "agregados": Barbara Mello, Angela Liberali, Raul, Caio, Rodolfo Ferreira, Victor Resende, Karol, Adriely, Bia, Jonatas, Luiz Gustavo, Vitória, Silas, Thainá, Gaby, Anne, Laysla Leite e Pedro Hori, vocês presenciaram todas as coisas boas e ruins, partilharam conselhos, ensinamentos e risadas. Estar do lado de vocês deixou com certeza as coisas mais divertidas e leves por mais que houvesse dificuldades. Muito obrigada por todo o carinho e

amizade.

Um agradecimento especial para **Babi Amorim e Karoline Reis** por toda a ajuda em todo o meu percurso e por dividir comigo as dificuldades da cultura celular. Vocês foram grandes amigas e me ajudaram até o último minuto, nunca me esquecerei de tudo que fizeram e sempre guardarei vocês no meu coração. Muito obrigada pelo amor, companheirismo e amizade acima de tudo.

À **Dr. Maria Sulei Parreira de Arruda** pela oportunidade de estagiar no LIPE, pelo incentivo a sempre fazer o melhor, e por todo carinho.

Às minhas amigas **Thais Fraga, Camila Marchetti e Luiza Mimura** por todos os ensinamentos, conselhos e apoio em toda a minha jornada e formação. Aprendi muito com vocês.

À **Dra. Priscilla Maria Ponce Varela** e ao **Dr. José Roberto Bosqueiro** pelos ensinamentos de Western Blot e pelo carinho.

Ao **Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti** e ao **LaGenPe** por abrir as portas sempre quando precisei.

Ao **Dr. Willian Fernando Zambuzzi** e ao **Labio** pelos ensinamentos e ajuda com o Western Blot no início do mestrado.

À **Heloisa** e **Dra. Elenice Deffune** por me acolherem no início do mestrado e ensinar as boas práticas da cultura celular.

Ao **Dr. Rinaldo Poncio Mendes** por disponibilizar o soro de pacientes para este estudo e toda a ajuda concedida. E também, ao grupo de micoses sistêmicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. **Thaty, Drica, Lari, Bia e Camila** por toda a ajuda e risadas nas disciplinas do mestrado.

Aos amigos do Instituto Lauro de Souza Lima **Mariane, Keren, Giovanna, Elderson, e Rodrigo** pela parceria e em todas as fases do mestrado e pelas viagens à Botucatu. Às **Dra. Vania, Dra. Ana Carla e Dra. Maria Renata** pelo acolhimento e ajuda nos momentos de sufoco.

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação e à **Bruna Quirino Jorgetto** pela atenção a nós destinada.

Ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e a todos os

*funcionários da Faculdade de Medicina de Botucatu por toda atenção
e ajuda quando necessário.*

Aos funcionários da Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru.

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.*

Lista de abreviaturas e siglas

ATP: Trifosfato de adenosina
BSA: Albumina do soro bovino
CMX: Cotrimoxazole
COL I: Colágeno tipo I
COL III: Colágeno tipo III
COL IV: Colágeno tipo IV
CONCEA: National Council for the Control of Animal Experimentation
CXCL: C-X-C motif chemokine ligand
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO: Dimetilsulfóxido
EMT: Transição epitelial-mesenquimal
EndMT: Transição endotelial-mesenquimal
FA: Forma aguda
FC: Forma crônica
FGFb: Fator de crescimento de fibroblasto básico/ Basic fibroblast growth factor
FP: Fibroblastos pulmonar/ Pulmonary fibroblast
FR: Forma residual
gp43: Glicoproteína de 43KDa
GPY: Glucose-peptone-yeast extract agar
IFN- β : Interferon-beta
IFN- γ : Interferon-gamma
Ig: Imunoglobulina
IL: Interleucina
ITC- Itraconazole
MMP- Metaloproteinase de matriz
MRC-5- Linhagem celular de fibroblastos pulmonar humano
NFkB: fator nuclear kappa B
PAMPS- Padrões moleculares associados a patógenos
PBS: Phosphate buffered saline
PbSAP: aspartil protease
PCM: Paracoccidioidomicose
PGE2: Prostaglandina E2
SBF: Soro bovino fetal
SDF-1: Stromal cell-derived factor 1
TBST: Tris Buffered Saline with Tween 20
TGF- β 1: Fator de transformação do crescimento beta 1
Th: T helper
TIMP: Inibidor tecidual de metaloproteinase/ Tissue inhibitor of metalloproteinase
TLR: Receptor tipo Toll
VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular
 α -SMA: Alpha-actina de músculo liso / Alpha-Smooth Muscle Actin

Resumo

Resumo

ALMEIDA, D. F. **Fibrose pulmonar na paracoccidioidomicose: influência do fungo e do hospedeiro na fibrogênese.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*; suas principais formas clínicas são aguda/subaguda e crônica (FC). Restrita à América Latina, a PCM apresenta alta incidência no Brasil, Colômbia e Venezuela, especialmente entre os trabalhadores rurais. A maioria dos pacientes com a forma crônica da doença, mesmo após tratamento eficaz, apresentam sequelas, incluindo fibrose pulmonar (FP). Os problemas sociais, econômicos e psicológicos desencadeados pela FP são subestimados. Apesar da fibrogênese na PCM ser reconhecida como um processo precoce, seus mecanismos não estão totalmente conhecidos. Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar a influência de componentes dos isolados fúngicos e do hospedeiro sobre fibroblastos pulmonares. Foram utilizados fibroblastos pulmonares humanos da linhagem MRC-5 e fibroblastos pulmonares murinos, isolados de camundongos BALB/c. Fibroblastos foram cultivados *in vitro* com exoantígenos de isolados das espécies *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb326) e *P. lutzii* (Pb01, Pb8334 e Pb66); gp43 purificada, e soros de pacientes com FC em diferentes momentos do tratamento (antes do tratamento, cura clínica, cura sorológica e cura aparente). Após 24 horas de cultivo, foram avaliadas a proliferação celular e produção de citocinas e fatores de crescimento por fibroblastos murinos e humanos. Nossos resultados demonstraram que componentes do fungo interferem em fibroblastos pulmonares, pela indução da proliferação, aumento dos níveis de TGF- β 1 e diminuição dos níveis de IL-6 e VEGF e FGFb. Além disso, nós observamos que exoantígenos induziram altas produções de pró-colágeno I por fibroblastos humanos. Gp43 induziu aumento nos níveis de TGF- β 1 em fibroblastos humanos. Em conclusão, nossos resultados demonstram pela primeira vez que componentes de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* interferem na fibrogênese por agir diretamente na biologia de fibroblastos pulmonares. Além disso, evidenciamos que soros de pacientes com FC interferem diferentemente na proliferação e ativação de fibroblastos pulmonares de acordo com cada momento do tratamento.

Palavras-chave: paracoccidioidomicose, fibroblasto, fibrose pulmonar.

Abstract

ALMEIDA, D. F. **Pulmonary Fibrosis in Paracoccidioidomycosis: Influence of fungus and host in Fibrogenesis.** 2017. Thesis (Master) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an endemic mycosis caused by fungi of genus *Paracoccidioides*; its main clinical forms are acute/subacute form and the chronic form (CF). Endemic in Latin America, PCM presents high incidence in Brazil, Colombia and Venezuela, especially among rural workers. Most part of patients with FC exhibits sequelae even after an effective fungal treatment, presenting pulmonary fibrosis (PF). The social, economic and psychological issues caused by PF are still underestimated. In PCM, fibrogenesis is recognized as an early process; however, its mechanisms are unknown. Thus, the present study aimed to evaluate the modulatory and functional influence of fungal and host components on pulmonary fibroblast. For this, it was utilized human pulmonary fibroblasts of cell line MRC-5 and murine pulmonary fibroblasts isolated of BALB/c mice. Next, cells were cultivated with different concentrations of isolates of *P. brasiliensis* (Pb18 and Pb326) and *P. lutzii* (Pb01, Pb8334 and Pb66); purified gp43, and serum of patients with CF in different moments of treatment (before treatment, clinical cure, serological cure and apparent cure). After 24 hours, cellular proliferation and production of cytokines and grow factors by murine and human pulmonary fibroblasts were evaluated. Our results showed that the fungal components interfered in fibroblast by induce proliferation and increased levels of TGF- β 1 and decreased IL-6, VEGF and bFGF. In addition we observed that exoantigens induced high production of pro-collagen I by human fibroblasts. Gp43 induced increased levels of TGF- β 1 by human cells. In conclusion, our findings showed at first time that components of *P.brasiliensis* and *P.lutzii* interfere in the fibrogenesis by directly act in the biology of pulmonary fibroblast. Furthermore, we verified that serum of FC-patients interfere in proliferation and activation of pulmonary fibroblasts according to each moment of treatment.

Keywords: paracoccidioidomycosis, fibroblast, pulmonary fibrosis

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
<i>1.1. Paracoccidiodomicose</i>	1
<i>1.2. Fungos do gênero Paracoccidioides</i>	2
<i>1.3. Resposta imune na PCM</i>	3
<i>1.4. Fibrose pulmonar na PCM</i>	4
<i>1.5 Mecanismos relacionados à fibrose pulmonar</i>	5
<i>1.6. Papel dos fibroblastos na inflamação</i>	6
<i>1.7. Racional do estudo</i>	7
2. OBJETIVOS	8
<i>2.1. Objetivo Geral</i>	8
<i>2.2 Objetivos Específicos</i>	8
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
4. MANUSCRITO I	16
5. MANUSCRITO II	31
6. CONCLUSÃO	56



Introdução

1.INTRODUÇÃO

1.1. Paracoccidioidomicose

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica granulomatosa causada por fungos termo-dimórficos do gênero *Paracoccidioides* [1,2]. A PCM foi descrita pela primeira vez, em 1908, por Adolfo Lutz. O termo paracoccidioidomicose foi instituído em 1971 na reunião de micologistas das Américas em Medellin (Colombia) e persiste, até hoje, como nomenclatura oficial.

O nicho e habitat deste gênero de fungos ainda não foram totalmente caracterizados, porém, sabe-se que colonizam solos úmidos na fase micelial e podem ter como hospedeiro natural o tatu *Dasypus novemcinctus* [3,4]. A PCM representa grande impacto na saúde pública em países da América Latina, sendo Brasil, Venezuela e Colômbia os mais acometidos com prevalência de mais de 15.000 casos relatados entre 1930 e 2012 [5]. E no Brasil, foi considerada em 2009 a nona maior causa de mortalidade entre doenças parasitárias [6]. São considerados fatores de risco para a manifestação da doença a desnutrição, tabagismo e consumo de álcool [7]

A infecção ocorre através da inalação de conídeos e/ou fragmentos de hifas (forma infectante) que atingem os pulmões e se transformam em leveduras (forma patogênica) [8]. Uma vez dentro do hospedeiro pode ocorrer disseminação do parênquima pulmonar para os linfonodos regionais, podendo também se disseminar via corrente sanguínea e/ ou linfática [9].

As principais formas clínicas são a forma aguda/subaguda (FA) e forma crônica (FC). A FA é caracterizada por acometer principalmente crianças e adultos jovens, apresenta história clínica de curta duração (mediana de dois meses) e atinge órgãos do sistema fagocítico mononuclear como fígado, baço e linfonodos. A FC acomete em geral adultos com 30 anos ou mais, apresenta história clínica de longa duração (acima de 6 meses) e acomete principalmente pulmões e mucosa das vias aero-digestivas. A maioria dos pacientes acometidos é do sexo masculino, trabalhadores rurais, que assim se tornam impossibilitados de exercerem suas atividades devido aos problemas respiratórios decorridos da doença, levando a diversos problemas socioeconômicos e psicológicos ainda subestimados. Pacientes que apresentam sequelas após o tratamento são classificados como FR [10].

Para o tratamento da PCM são utilizadas drogas como os derivados azólicos cetoconazol e itraconazol (ITC) e também a associação sufametoxazol-trimetoprim, também chamada de cotrimoxazol (CMX) [11]. A sulfadiazina é pouco utilizada e a anfotericina B é

reservada para casos mais graves, devido à sua toxicidade. O ITC é atualmente, a melhor escolha para o tratamento da PCM, Cavalcante *et al.* evidenciaram que sua utilização propiciou cura clínica mais precoce e uma melhor tolerância [12].

1.2 Fungos do gênero *Paracoccidioides*

O gênero de fungos *Paracoccidioides* pertence à ordem Onygenales e a família Ajellomycetaceae [13] e é composto por duas espécies: *Paracoccidioides brasiliensis* e o *Paracoccidioides lutzii*. Sendo ainda a espécie *P.brasiliensis* dividida em 5 espécies crípticas: S1a e S1b que compreende isolados distribuídos por toda a América Latina, principalmente Brasil, Argentina e Paraguai [14,15], PS2 composta por isolados venezuelanos e brasileiros; PS3 restrita na Colômbia e PS4 restrita na Venezuela. O isolado Pb01 é filogeneticamente distinto das outras cepas, definido como *Paracoccidioides lutzii* e principalmente isolado em pacientes da região Centro-Oeste [2,14] e região Norte do Brasil, mais precisamente no Estado do Pará [16].

Este gênero ainda possui a característica do termo-dimorfismo, ou seja, possui a capacidade de mudar morfológicamente dependendo da temperatura. O fungo se encontra na forma micelial (forma infectante) e a 37°C no interior do hospedeiro transforma-se na forma leveduriforme (forma patogênica) [8].

Em relação ao metabolismo, são capazes de secretar de 30 à 35 proteases como ubiquitinil hidrolase (família C19) e metaloendopeptidase dependente de ATP (família M41) que são exclusivas desses fungos. Além disso, secretam enzimas que degradam açúcares abundantes em paredes celulares de plantas, indicando que esse grupo pode ser capaz de se alimentar de celulose, enquanto crescem no solo [17].

Em cultura, estes fungos na fase micelial apresentam o crescimento lento (20 – 30 dias), a colônia apresenta micélio aéreo curto de cor branca ou creme e, muitas vezes, apresenta pigmento castanho na parte reversa, quando aderidas ao ágar, apresentam rachaduras e irregularidades no contorno. À temperatura entre 35-37°C, em meio de cultura, a colônia se desenvolve mais rapidamente (8-12 dias), apresenta um aspecto cerebriforme e consistência macia, cor creme e pode ser facilmente removida do substrato. [18].

Sua parede celular é composta principalmente por polissacarídeos como quitina, polímeros de glicose, proteínas e lipídeos podendo variar de acordo com sua morfologia. A quitina apresenta-se em maior quantidade na forma leveduriforme, podendo alcançar 43% do peso seco da parede celular e no máximo 13% da parede celular micelial. A camada externa da parede na fase leveduriforme é constituída por α -1-3glucana predominante e por β -1-3-

glucana, na fase de micélio [19]. Especula-se que essa dinâmica de composição de parede representa um mecanismo de escape do fungo, uma vez que fagócitos humanos são incapazes de digerir a α -1,3 glucana, por produzirem apenas a enzima β - glucanase, sendo capazes de digerir a parede somente quando o fungo se encontra na fase micelial [20].

Os vários isolados podem apresentar diferenças em sua composição e também podem produzir quantidades variáveis de antígenos. Entre as proteínas intracelulares estão: a glicoproteína de 43 kDa (gp43) principal antígeno secretado e o mais específico para o diagnóstico de infecção por *P. brasiliensis* [20–22]; aspartil protease (PbSAP) de 66-kDa [23]; chaperona mitocondrial de choque térmico Mdj1 [24] e proteína gp75 que tem atividade fosfatase [25].

1.3. Resposta Imune na PCM

A resposta imune do indivíduo à infecção pelo *Paracoccidioides* spp determina a evolução da infecção. A resposta pode variar de acordo com o estado nutricional, tamanho do inóculo, carga genética e gênero do indivíduo. A ação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido pelos macrófagos [26], é a principal causa da morte do *Paracoccidioides* spp. A produção deste metabólito é potencializada pela resposta imune adaptativa do tipo Th_1 , caracterizada pela produção de $IFN-\gamma$ pelos linfócitos ativado, atraídos para o sítio da lesão. Qualquer descompasso, deficiência ou alteração nesse processo leva ao estabelecimento da doença e a sua progressão.

O comportamento imunológico é distinto entre as formas clínicas da doença [27–30]. Em pacientes com FA, observa-se produção de citocinas do perfil Th_2/Th_9 (IL-4, IL-5 e IL-9). A produção elevada dessas citocinas acentua a deficiência da resposta imune celular, levando à ausência de reatividade frente a antígenos de *Paracoccidioides* spp. Além disso, as citocinas de perfil Th_2/Th_9 induzem produção muito elevada de anticorpos do isotipo IgG4 [31] que apresentam reduzida capacidade de fixação de complemento e pequena afinidade pelos receptores FcR, fagocitose e, conseqüentemente, a eliminação do fungo, tornam-se comprometidas.

A FC, que ocorre devido à reativação de focos latentes e, portanto, após o hospedeiro ter organizado uma resposta imune adaptativa eficiente frente ao *Paracoccidioides* spp, apresenta instalação lenta e progressiva. À exceção dos que apresentam a forma grave, pacientes com a FC apresentam resposta Th_1 preservada, isto é, são reatores ao teste intradérmico com paracoccidioidina. Apresentam ainda, intensa produção de citocinas pró-inflamatórias como $TNF-\alpha$, IL-1 β , IL-17 e de peróxido de hidrogênio. Embora esses

mediadores sejam importantes para a eliminação do fungo, sua superprodução induz efeitos deletérios e não conferem proteção. A produção de anticorpos também pode estar elevada, e se caracteriza por imunoglobulinas dos isotipos IgG1 e IgG2 [31], que possuem maior capacidade de fixação de complemento e maior afinidade pelos receptores FcR (IgG1 > IgG2 > IgG4). Embora esse conjunto de elementos seja importante para a eliminação do fungo, a capacidade de lise microbiana não acompanha a multiplicação do fungo e o indivíduo adocece. Por se tratar de processo inflamatório crônico, esses pacientes, em geral, já apresentam fibrose logo no primeiro atendimento clínico, quando se observa produção mais acentuada de TGF- β_1 e do fator de crescimento de fibroblasto básico (FGFb) [32].

1.4. Fibrose Pulmonar na PCM

Após tratamento antifúngico eficaz, pacientes com FC podem apresentar fibrose nos diferentes órgãos comprometidos, os pulmões, particularmente, também exibem o enfisema. Essas sequelas levam ao comprometimento funcional e incapacitação do paciente. A função pulmonar poucas vezes é normal, revelando padrão obstrutivo em 85% dos casos, com frequências iguais de obstrução leve, moderada e intensa [33–35]. Os achados necroscópicos de pacientes com PCM revelam que a fibrose pulmonar é caracterizada por extensas áreas de depósito de colágeno próximas à região hilar, envolvendo outras estruturas como linfonodos, brônquios e artérias. As fibras colágenas se encontram na periferia dos granulomas e se estendem a brônquios e vasos sanguíneos próximos. Além disso, Tuder *et al.* [36] observaram proliferação de fibras reticulares em áreas distintas do processo granulomatoso, indicando que o próprio fungo ou seus componentes podem induzir a produção de colágeno.

Apesar da sua importância, poucos estudos têm focado especificamente a fibrogênese pulmonar que ocorre na PCM. Cock *et al.* [37] demonstraram em modelo experimental murino que esse processo é precoce. Araujo [38], em estudos necroscópicos demonstrou a presença de fibrose em pacientes que não receberam tratamento antifúngico, mais recentemente, Venturini *et al.* [32] demonstraram que a produção de TGF β_1 e FGF por monócitos de pacientes com FC já se encontra elevada no momento do diagnóstico, e em outro estudo, foi demonstrado que após a introdução do tratamento antifúngico, ocorre aumento da fibrose pulmonar [39]. Em geral, durante a evolução da PCM, a função pulmonar encontra-se alterada observando-se hipoxemia com predominância da perfusão sobre a ventilação pulmonar [40]. De acordo com os autores, é possível que o envolvimento pulmonar ocorra na fase precoce da doença, uma vez que pacientes com padrão obstrutivo e misto apresentam envolvimento precoce das vias respiratórias com alterações na difusão e ventilação. Mesmo com a regressão

das lesões radiológicas após o tratamento, não há recuperação da função pulmonar sendo comum a dispnéia a grandes e pequenos esforços [34].

1.5. Mecanismos relacionados à fibrose pulmonar

Fibrose é uma patologia associada com um amplo espectro de injúrias que podem ser causadas por diversas razões, incluindo tratamento antibiótico, infecção e exposição ambiental [41–43].

Denomina-se fibrose a formação ou desenvolvimento de tecido conectivo em órgãos ou tecidos quando em processo de cicatrização. Ocorre em determinadas circunstâncias em que há aumento do estroma conjuntivo de um órgão decorrente de cicatrização ou de um processo reacional em que a produção de matriz extracelular pode não estar relacionada com o processo reparativo. Em consequência das modificações na arquitetura do órgão e das alterações na função das células parenquimatosas, podem surgir distúrbios funcionais [44].

Os mecanismos que induzem a fibrose ainda não foram elucidados, porém, acredita-se que seja resultado de uma desregulação durante o reparo tecidual [45]. O reparo tecidual ocorre em 4 estágios: 1- Coagulação, 2- Homeostase, 3-Inflamação, 4-Proliferação e remodelação [46]. Durante a proliferação e remodelação, os fibroblastos proliferam no local da injúria [47] e secretam citocinas incluindo o TGF- β 1 que atua de forma autócrina e parácrina para induzir proliferação e/ou eventual diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos [48–50]. Estas células secretam matriz extracelular e proteínas incluindo colágeno e fibronectina [45,47,51] que são entrelaçadas para proporcionar um substrato de re-epitelização do tecido [47]. Miofibroblastos também expressam α -SMA, proteína que integra filamentos de actina, proporcionando as células o fenótipo contrátil [52,53]. Embora inicialmente benéfico, o processo de regeneração tecidual pode se tornar patogênico se este continuar desenfreadamente, resultando em remodelamento da matriz extracelular e formação de cicatriz permanente. Em alguns casos, pode até evoluir para falha do órgão e morte.

No ápice da interação célula-célula durante a cura tecidual há duas classes chave de citocinas: mediadores pró-fibróticos e mediadores antifibróticos. O TGF- β 1 é o mais bem caracterizado mediador pró-fibrótico na fibrose pulmonar este é um fator de crescimento secretado por um amplo espectro de células, incluindo fibroblastos, com efeitos que são específicos para o tipo celular e tecidual [49,54–58].

Em oposição ao TGF- β 1, a prostaglandina E2 (PGE2) é um mediador lipídico anti-fibrótico predominantemente secretado por células epiteliais como indutor de quiescência de fibroblastos [59,60]. Ele ainda atua como regulador negativo de TGF- β 1, inibindo a

proliferação de fibroblastos e diferenciação em miofibroblastos e secreção de matriz extracelular [48,50,60–62].

Acredita-se que o balanço de reguladores positivos e negativos (TGF- β 1 e PGE2, por exemplo) seja necessário para o alcance da homeostase e assim evitar a ativação excessiva de fibroblastos [63]. A rede de colágeno depositada por fibroblastos é regulada continuamente pela síntese do colágeno e seu catabolismo. O “desligamento” do colágeno e outras proteínas da matriz extracelular são controlados por várias metaloproteinases (MMPS) e seus inibidores de metaloproteinases (TIMPs) que são produzidas por granulócitos, macrófagos, células epidermais e miofibroblastos.

Pacientes com fibrose pulmonar apresentam dificuldade ao respirar, obtêm um mau prognóstico e conseqüentemente uma redução da qualidade de vida [64–68]. Tratamentos para a fibrose pulmonar são limitados. Transplante de pulmão foi considerado a única intervenção até recentemente. Em outubro de 2015 duas drogas Nintedanib (Iheim, Ingelheim am Rhein, Alemanha) e perferidone (Shionogi & Co., Ltd., Osaka, Japan; Marnac Inc., Dallas, TX, USA) foram aprovadas nos EUA para o tratamento para a fibrose pulmonar idiopática [69]. Nenhuma dessas terapias é curativa, ambos os tratamentos diminuem, mas, não param ou reverterem o progresso da fibrose pulmonar idiopática marcada pela redução do declínio da capacidade vital dos pacientes [70–72]. Ambas as drogas atuam na dinâmica dos fibroblastos inibindo proliferação, diferenciação e produção de TGF- β 1. Contudo, nenhuma destas drogas demonstrou promover a sobrevivência ou regeneração das células epiteliais em pulmões fibróticos.

1.6. Papel dos fibroblastos na inflamação

Os fibroblastos são células presentes em diversos tecidos e possuem a capacidade de se diferenciar em outras células, incluindo cartilagem, osso, adipócito e células de músculo liso. Fibroblastos são uma população heterogênea e se origina através de diferentes processos. Entre esses processos estão a migração e diferenciação de células da medula óssea, denominadas de fibrócitos; a diferenciação de células epiteliais através da transição epitelial-mesenquimal (EMT), e sendo recentemente sugerido a diferenciação de células endoteliais através da transição endotelial-mesenquimal (EndMT) [73]. Apesar dos fibroblastos serem uma das células mais abundante do estroma, estas células permanecem relativamente mal caracterizadas em termos moleculares [74]. Esta ausência de marcadores específicos dificulta a caracterização dos subconjuntos dessas células. Porém, algumas proteínas específicas

possibilitam a fenotipagem de fibroblastos como fibronectina, CD90, COL I, III e IV e pró-colágeno [75].

Em resposta a estímulo microbiano, injúria mecânica, sinais derivados de linfócitos e macrófagos, fatores autócrinos e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) que interagem com receptores de reconhecimento (TLR), fibroblastos podem secretar citocinas, quimiocinas e prostaglandinas [76]. A interação entre fibroblastos e leucócitos através de receptores CD40/CD40L, resulta na ativação do fator nuclear NFkB com níveis elevados de IL-6, IL-8 e ciclooxigenase 2 [77]. Além disso, essas células são responsáveis por definir ativamente o microambiente dos tecidos e desempenharem papel importante na transição da inflamação, visto que a produção inapropriada de quimiocinas como SDF-1, IFN- β e componentes da matriz extracelular por fibroblastos pode afetar diretamente as células do sistema imune levando ao estabelecimento da inflamação crônica [78].

1.7. Racional científico do estudo

A PCM é uma doença endêmica da América latina, e apesar de representar problemas na saúde pública, é negligenciada. Mesmo após o tratamento antifúngico finalizado com sucesso, a maior parte dos pacientes portadores da forma crônica apresenta sequelas, dentre elas a fibrose pulmonar. Como consequência esses pacientes apresentam problemas respiratórios que acabam incapacitando-os muitas vezes de exercerem suas profissões e atividades. Em alguns casos, essa condição pode desencadear problemas psicológicos, e intensificar o quadro de alcoolismo já frequente nesses pacientes.

Até o momento, ainda não foram totalmente elucidados os mecanismos que levam a fibrose durante a PCM, e poucos são os estudos que focam no papel das células pulmonares durante esse processo. Na literatura estudos focam no mecanismo de adesão e infecção de células por parte do fungo [79,80]. Uma lacuna ainda não explorada é o papel do fungo e seus componentes no aspecto funcional e modulador nas células responsáveis pela instalação da fibrose, como fibroblastos e miofibroblastos. Esse racional tem por fundamento estudos patológicos que verificaram que áreas de deposição de colágenos em septo alveolar ocorrem à distância da lesão granulomatosa, sugerindo que componentes do fungo poderiam atuar nesse processo.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Restrepo A, Gómez BL, Tobón A. Paracoccidioidomycosis: Latin America's Own Fungal Disorder. *Curr Fungal Infect Rep.* 2012;6: 303–311. doi:10.1007/s12281-012-0114-x
2. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009;52: 273–283. doi:10.1016/j.ympev.2009.04.005
3. Vidal MS, de Melo NT, Garcia NM, Del Negro GM, de Assis CM, Heins-Vaccari EM, et al. *Paracoccidioides brasiliensis*. A mycologic and immunochemical study of a sample isolated from an armadillo (*Dasipus novencinctus*). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1995;37: 43–49.
4. Peraçoli MT, Sugizaki MF, Mendes RP, Naiff R, Montenegro MR. *Paracoccidioides brasiliensis* isolated from armadillos is virulent to Syrian hamsters. *Mycopathologia.* 1999;148: 123–130.
5. Martinez R. EPIDEMIOLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57 Suppl 19: 11–20. doi:10.1590/S0036-46652015000700004
6. Prado M, Silva MB da, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2009;104: 513–521. doi:10.1590/S0074-02762009000300019
7. Martinez R, Moya MJ. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. *Revista de Saúde Pública.* 1992;26: 12–16. doi:10.1590/S0034-89101992000100003
8. Bagagli E, Franco M, Bosco SDMG, Hebel-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol.* 2003;41: 217–223.
9. Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol.* 1993;5: 115–149.
10. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho F de Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39: 297–310.
11. Negroni R, Palmieri O, Koren F, Tiraboschi IN, Galimberti RL. Oral treatment of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis with itraconazole in humans. *Rev Infect Dis.* 1987;9 Suppl 1: S47-50.
12. Cavalcante R de S, Sylvestre TF, Levorato AD, de Carvalho LR, Mendes RP. Comparison between itraconazole and cotrimoxazole in the treatment of paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8: e2793. doi:10.1371/journal.pntd.0002793
13. Untereiner WA, Scott JA, Naveau FA, Sigler L, Bachewich J, Angus A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycologia.* 2004;96: 812–821.
14. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 2006;23: 65–73. doi:10.1093/molbev/msj008

15. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F de, Kono ASG, Paniago AM, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017; 0. doi:10.1590/0037-8682-0230-2017
16. Marques-da-Silva SH, Rodrigues AM, de Hoog GS, Silveira-Gomes F, Camargo ZP de. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87: 710–714. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0340
17. Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, Muszewska A, Goldberg J, Bailão AM, et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS Genet.* 2011;7: e1002345. doi:10.1371/journal.pgen.1002345
18. Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Guia para Identificação: Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico . Savier. São Paulo. 1998
19. San-Blas G, San-Blas F. Variability of cell wall composition in *Paracoccidioides brasiliensis*: a study of two strains. *Sabouraudia.* 1982;20: 31–40.
20. Felipe MSS, Torres FAG, Maranhão AQ, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, et al. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;45: 369–381. doi:10.1016/j.femsim.2005.05.013
21. Puccia R, Schenkman S, Gorin PA, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun.* 1986;53: 199–206.
22. Almeida OP, Jacks J, Scully C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14: 377–383.
23. Tacco BAC de A, Parente JA, Barbosa MS, Bão SN, Gsóes T de S, Pereira M, et al. Characterization of a secreted aspartyl protease of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2009;47: 845–854. doi:10.3109/13693780802695512
24. Batista WL, Matsuo AL, Ganiko L, Barros TF, Veiga TR, Freymüller E, et al. The PbMDJ1 gene belongs to a conserved MDJ1/LON locus in thermotolerant pathogenic fungi and encodes a heat shock protein that localizes to both the mitochondria and cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryotic Cell.* 2006;5: 379–390. doi:10.1128/EC.5.2.379-390.2006
25. Xander P, Vigna AF, Feitosa LDS, Pugliese L, Bailão AM, Soares CM de A, et al. A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. *Microbes Infect.* 2007;9: 1484–1492. doi:10.1016/j.micinf.2007.08.001
26. Carmo JPM, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med Mycol.* 2006;44: 363–368. doi:10.1080/13693780500536885
27. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH de SL, Longhi LNA, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect.* 2013;67: 470–485. doi:10.1016/j.jinf.2013.07.019
28. Mamoni RL, Blotta MHSL. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2006;35: 207–216. doi:10.1016/j.cyto.2006.08.005

29. Mota NG, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MT, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985;79: 765–772.
30. Mota NG, Peraçoli MT, Mendes RP, Gattass CR, Marques SA, Soares AM, et al. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1988;26: 105–111.
31. Juvenale M, Del Negro GM, Duarte AJ, Benard G. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. *J Med Microbiol.* 2001;50: 127–134.
32. Venturini J, Cavalcante RS, Golim M de A, Marchetti CM, Azevedo PZ de, Amorim BC, et al. Phenotypic and functional evaluations of peripheral blood monocytes from chronic-form paracoccidioidomycosis patients before and after treatment. *BMC Infect Dis.* 2014;14: 552. doi:10.1186/s12879-014-0552-x
33. Campos EP, Cataneo AJ. [Pulmonary function in 35 patients with paracoccidioidomycosis]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986;28: 330–336.
34. Campos EP, Padovani CR, Cataneo AM. [Paracoccidioidomycosis: radiologic and pulmonary study in 58 cases]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1991;33: 267–276.
35. Lemle A, Wanke B, Miranda JL, Kropf GL, Mandel MB, Mandel S. Pulmonary function in paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). An analysis of the obstructive defect. *Chest.* 1983;83: 827–828.
36. Tuder RM, el Ibrahim R, Godoy CE, De Brito T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 1985;92: 179–188.
37. Cock AM, Cano LE, Vélez D, Aristizábal BH, Trujillo J, Restrepo A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *paracoccidioides brasiliensis* propagules. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000;42: 59–66.
38. Araujo S de A. Contribuição ao estudo anátomo-clínico da Paracoccidioiodomicose em Minas Gerais. meio século de experiência - avaliação das necrópsias realizadas no período compreendido entre 1944 até 1999, no departamento de anatomia patológica e medicina legal, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte, MG, Brazil: Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.
39. Tobón AM, Agudelo CA, Osorio ML, Alvarez DL, Arango M, Cano LE, et al. Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after itraconazole therapy. *Clin Infect Dis.* 2003;37: 898–904. doi:10.1086/377538
40. Afonso JE, Nery LE, Romaldini H, Bogossian M, Ribeiro-Ratto O. [Pulmonary function in paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis)]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1979;21: 269–280.
41. Vanhee D, Gosset P, Wallaert B, Voisin C, Tonnel AB. Mechanisms of fibrosis in coal workers' pneumoconiosis. Increased production of platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor type I, and transforming growth factor beta and relationship to disease severity. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150: 1049–1055. doi:10.1164/ajrccm.150.4.7921435

42. Daba MH, El-Tahir KE, Al-Arifi MN, Gubara OA. Drug-induced pulmonary fibrosis. *Saudi Med J*. 2004;25: 700–706.
43. Wootton SC, Kim DS, Kondoh Y, Chen E, Lee JS, Song JW, et al. Viral infection in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183: 1698–1702. doi:10.1164/rccm.201010-1752OC
44. Brasileiro Filho G. *Bogliolo -Patologia Geral*. 5^a Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2013.
45. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77: 509–528.
46. Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, Zisman DA, Martinez FJ, Lynch JP. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs*. 2004;64: 405–430.
47. Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36: 1031–1037. doi:10.1016/j.biocel.2003.12.003
48. Kolodsick JE, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal VJ, Moore BB. Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29: 537–544. doi:10.1165/rcmb.2002-0243OC
49. Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, et al. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem*. 2003;278: 12384–12389. doi:10.1074/jbc.M208544200
50. Epa AP, Thatcher TH, Pollock SJ, Wahl LA, Lyda E, Kottmann RM, et al. Normal Human Lung Epithelial Cells Inhibit Transforming Growth Factor- β Induced Myofibroblast Differentiation via Prostaglandin E2. *PLOS ONE*. 2015;10: e0135266. doi:10.1371/journal.pone.0135266
51. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009;37: 1528–1542. doi:10.1177/147323000903700531
52. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell*. 2001;12: 2730–2741.
53. Peyton SR, Kim PD, Ghajar CM, Seliktar D, Putnam AJ. The effects of matrix stiffness and RhoA on the phenotypic plasticity of smooth muscle cells in a 3-D biosynthetic hydrogel system. *Biomaterials*. 2008;29: 2597–2607. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.02.005
54. Coffey RJ, Bascom CC, Sipes NJ, Graves-Deal R, Weissman BE, Moses HL. Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol*. 1988;8: 3088–3093.
55. Pietenpol JA, Stein RW, Moran E, Yaciuk P, Schlegel R, Lyons RM, et al. TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. *Cell*. 1990;61: 777–785.
56. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15: 535–562. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.535

57. Kronenberg M, Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature*. 2005;435: 598–604. doi:10.1038/nature03725
58. Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2008;9: 632–640. doi:10.1038/ni.1607
59. Lama V, Moore BB, Christensen P, Toews GB, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 synthesis and suppression of fibroblast proliferation by alveolar epithelial cells is cyclooxygenase-2-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27: 752–758. doi:10.1165/rcmb.4857
60. Moore BB, Peters-Golden M, Christensen PJ, Lama V, Kuziel WA, Paine R, et al. Alveolar epithelial cell inhibition of fibroblast proliferation is regulated by MCP-1/CCR2 and mediated by PGE2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284: L342-349. doi:10.1152/ajplung.00168.2002
61. Fine A, Poliks CF, Donahue LP, Smith BD, Goldstein RH. The differential effect of prostaglandin E2 on transforming growth factor-beta and insulin-induced collagen formation in lung fibroblasts. *J Biol Chem*. 1989;264: 16988–16991.
62. Tian M, Schiemann WP. PGE2 receptor EP2 mediates the antagonistic effect of COX-2 on TGF-beta signaling during mammary tumorigenesis. *FASEB J*. 2010;24: 1105–1116. doi:10.1096/fj.09-141341
63. Warsinske HC, Ashley SL, Linderman JJ, Moore BB, Kirschner DE. Identifying Mechanisms of Homeostatic Signaling in Fibroblast Differentiation. *Bull Math Biol*. 2015;77: 1556–1582. doi:10.1007/s11538-015-0096-2
64. De Vries J, Kessels BL, Drent M. Quality of life of idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Eur Respir J*. 2001;17: 954–961.
65. Nishiyama O, Taniguchi H, Kondoh Y, Kimura T, Ogawa T, Watanabe F, et al. Health-related quality of life in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. What is the main contributing factor? *Respiratory Medicine*. 2005;99: 408–414. doi:10.1016/j.rmed.2004.09.005
66. Swigris JJ, Kuschner WG, Jacobs SS, Wilson SR, Gould MK. Health-related quality of life in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Thorax*. 2005;60: 588–594. doi:10.1136/thx.2004.035220
67. Tzanakis N, Samiou M, Lambiri I, Antoniou K, Siafakas N, Bouros D. Evaluation of health-related quality-of-life and dyspnea scales in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Correlation with pulmonary function tests. *Eur J Intern Med*. 2005;16: 105–112. doi:10.1016/j.ejim.2004.09.013
68. Tomioka H, Imanaka K, Hashimoto K, Iwasaki H. Health-related quality of life in patients with idiopathic pulmonary fibrosis--cross-sectional and longitudinal study. *Intern Med*. 2007;46: 1533–1542.
69. George G, Vaid U, Summer R. Therapeutic advances in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Pharmacol Ther*. 2016;99: 30–32. doi:10.1002/cpt.283
70. King TE, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014;370: 2083–2092. doi:10.1056/NEJMoa1402582

71. Kreuter M. Pirfenidone: an update on clinical trial data and insights from everyday practice. *Eur Respir Rev.* 2014;23: 111–117. doi:10.1183/09059180.00008513
72. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2014;370: 2071–2082. doi:10.1056/NEJMoa1402584
73. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003;112: 1776–1784. doi:10.1172/JCI20530
74. Hughes CCW. Endothelial-stromal interactions in angiogenesis. *Curr Opin Hematol.* 2008;15: 204–209. doi:10.1097/MOH.0b013e3282f97dbc
75. Pilling D, Fan T, Huang D, Kaul B, Gomer RH. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS ONE.* 2009;4: e7475. doi:10.1371/journal.pone.0007475
76. Ekuni D, Yamanaka R, Yamamoto T, Miyauchi M, Takata T, Watanabe T. Effects of mechanical stimulation by a powered toothbrush on the healing of periodontal tissue in a rat model of periodontal disease. *J Periodont Res.* 2010;45: 45–51. doi:10.1111/j.1600-0765.2009.01195.x
77. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol.* 1997;151: 317–322.
78. Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol.* 2001;22: 199–204.
79. Ywazaki CY, Maza PK, Suzuki E, Takahashi HK, Straus AH. Role of host glycosphingolipids on *Paracoccidioides brasiliensis* adhesion. *Mycopathologia.* 2011;171: 325–332. doi:10.1007/s11046-010-9376-4
80. Mendes-Giannini MJS, Monteiro da Silva JL, de Fátima da Silva J, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF, et al. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia.* 2008;165: 237–248. doi:10.1007/s11046-007-9074-z

Conclusão

6.CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram pela primeira vez uma nova metodologia de isolamento de fibroblastos pulmonares murinos, além de evidenciar a capacidade de exoantígenos de isolados de fungos do gênero *Paracoccidioides* ssp promoverem a proliferação e elevada produção de pró-colágeno I e TGF- β 1 em fibroblastos pulmonares. Evidenciamos também que componentes do soro de pacientes com a forma crônica da paracoccidioidomicose interferem diferentemente na proliferação e ativação de fibroblastos pulmonares de acordo com cada momento do tratamento.