

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FLHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

**“Clamidósporos do *Paracoccidioides brasiliensis*: isolamento e
estudo da infectividade em modelo experimental murino”**

IGOR OTAVIO MINATEL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Patologia.

Botucatu - SP
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FLHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

**“Clamidósporos do *Paracoccidioides brasiliensis*: isolamento e
estudo da infectividade em modelo experimental murino”**

IGOR OTAVIO MINATEL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Dra. Denise Fecchio

Co-orientador: Dr. Julio Defaveri

Botucatu - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Minatel, Igor Otavio.

Clamidósporos do *Paracoccidioides brasiliensis*: isolamento e estudo da infectividade em modelo experimental murino. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Denise Fecchio

Capes: 21201030

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Micologia. 3. Fungos - Isolamento.

Palavras-chave: Clamidósporo; Infecção; Isolamento; *Paracoccidioides brasiliensis*; Paracoccidioidomicose; Purificação.

DEDICATÓRIA

À MINHA FAMÍLIA,

Exemplo de amor incondicional.

Agradeço aos meus pais Otavio e Maristelma por toda dedicação, carinho e compreensão. Amo vocês.

À minha querida irmã Marina, meus avós Olinda e Dércio e meu tio Junior, pela amizade e por sempre estarem ao meu lado.

Dedico este trabalho a todos vocês!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Denise Fecchio e Dr. Julio Defaveri por compartilharem seus conhecimentos na orientação deste trabalho.

Agradeço a todos os amigos, professores e colegas. Seria injusto citar alguns, quando muitos colaboraram diretamente na realização desta tese.

Para conhecermos os amigos é necessário passar pelo sucesso e pela desgraça.

No sucesso, verificamos a quantidade e, na desgraça, a qualidade.

Confúcio

LISTA DE ABREVIÇÕES

- °C:** Graus Celsius
- g:** Gramas
- h:** Horas
- HE:** Hematoxilina-eosina
- kHz:** Quilo Hertz
- l:** Litro
- ml:** Mililitros
- Log:** Logaritmo de base 10
- M:** Molar
- Pb:** *Paracoccidioides brasiliensis*
- PBS:** Tampão Fosfato
- PCM:** Paracoccidioidomicose
- PMN:** Polimorfonucleares
- rpm:** Rotações por minuto
- S1:** Primeira semana pós-infecção
- S2:** Segunda semana pós-infecção
- S4:** Quarta semana pós-infecção
- UFC:** Unidades Formadoras de Colônia
- v/v:** volume/volume
- µm:** Micrômetro
-
-

SUMÁRIO

	Pag.
Capítulo I _____	08
Revisão de Literatura _____	09
I – O Fungo: <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	09
1. Aspectos gerais	09
2. Ecologia	09
2.1-Espécies crípticas	11
3. Morfologia: Dimorfismo e estrutura microscópica	12
4. Biologia	14
4.1-Estruturas de resistência	14
4.2-Fatores de virulência	15
4.2.1-Dimorfismo	15
4.2.2-Constituintes da parede celular	16
4.2.3-Glicoproteína gp43	16
4.2.4-Melanina	17
4.2.5- Proteínas ligantes de estrógeno (PLE)	18
II – Paracoccidioidomicose	18
1.Doença	18
2. Modelos experimentais	20
2.1-Aspectos gerais	20
3.Vias de infecção	22
3.1-Via intranasal	22
3.2-Via intratraqueal	22
3.3-Via intraperitoneal	22
3.4-Via endovenosa	23
Referências Bibliográficas _____	24

Capítulo II – Artigo _____	41
Título	42
Resumo	43
Abstract	44
Introdução	45
Objetivos	48
Material e Métodos	49
Resultados	55
Discussão	68
Referências Bibliográficas	75
Anexo _____	79

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

I – O FUNGO: *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb)

1. Aspectos Gerais

Existem mais de 100.000 espécies de fungos patogênicos na natureza, porém especial atenção é dedicada aos fungos dimórficos por sua capacidade de causar doença sistêmica. A definição de fungo dimórfico é baseada na habilidade deste microrganismo de alterar sua morfologia, frente a condições ambientais específicas como variações de temperatura e privação de nutrientes (Nemecek *et al.*, 2006; Rappleye & Goldman, 2006). Dentre os fungos termo-dimórficos relacionam-se filogeneticamente os Ascomycetos: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* e *Penicillium marneffeii* (Nemecek *et al.*, 2006). Mais recentemente, um clã distinto da família Onygenaceae que inclui os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia* e *Histoplasma* foram re-classificados na nova Família Ajellomycetaceae, um clado monofilético que também inclui o *Paracoccidioides brasiliensis*, em sua fase anamórfica (mitospórica) (Untereiner *et al.*, 2004).

2. Ecologia

O nicho ecológico do Pb é praticamente desconhecido, diferentemente de outros fungos dimórficos como *Cryptococcus neoformans* (Jarvis & Harrison, 2008; Lin, 2009), *C. immitis* (Deus Filho, 2009; Laniado-Laborin, 2007; Pfaller & Diekema, 2010) e *H. capsulatum* (Ferreira & Borges, 2009; Kauffman, 2009; Pfaller & Diekema, 2010), que induzem micose sistêmica, com historia natural

similar no homem (Ajello, 1967; Schwarz, 1986). Há indícios de que o solo seja o habitat natural do fungo, porém este fato não é confirmado em virtude da dificuldade de isolar amostras positivas para *P. brasiliensis* deste substrato (De Albornoz, 1971; Negroni, 1968; Shome & Batista, 1963; Silva-Vergara *et al.*, 1998). A ausência de surtos epidêmicos torna praticamente impossível identificar os locais onde a infecção foi adquirida (Restrepo, 1985). Adicionalmente, o fungo tem a capacidade de entrar em prolongados períodos de latência, como demonstrado em indivíduos que manifestaram a doença após terem deixado de viver em áreas endêmicas há vários anos (Ginarte *et al.*, 2003; Horre *et al.*, 2002; Kamei *et al.*, 2003; Manns *et al.*, 1996; Mayr *et al.*, 2004; Van Damme *et al.*, 2006).

O Pb talvez apresente micronicho seletivo e localizado, fase saprofítica curta e transitória e baixa capacidade de esporulação. A identificação de *clusters* de Paracoccidioidomicose (PCM), em diferentes áreas geográficas (Barrozo *et al.*, 2010), permite analisar de forma mais detalhada as condições que favorecem o crescimento do Pb na natureza, uma vez que, este patógeno vive em áreas tropicais onde a maior concentração de fungos no ecossistema, pode inibir seu crescimento e isolamento (Franco *et al.*, 2000).

Amostras recentes de Pb isoladas de animais selvagens e domésticos demonstram a relação do fungo com hospedeiros animais (Bagagli *et al.*, 2006), com destaque para os isolamentos obtidos de tatu *Dasytus novemcinctus* (Bagagli *et al.*, 1998; Corredor *et al.*, 1999; Naiff *et al.*, 1986; Restrepo *et al.*, 2000; Silva-Vergara *et al.*, 2000). O hábito fossorial e escavatório dos tatus, bem como, sua imunidade relativamente baixa, tem influência direta no desenvolvimento da infecção paracoccidioidomycótica

(Bagagli *et al.*, 1998). A adaptação do fungo à condição zoofílica (adaptada ao tecido animal), demonstrou afetar sua virulência e produção de estruturas de resistência (Bagagli *et al.*, 2003; Macoris *et al.*, 2006).

A adaptação do Pb aos mais variados hospedeiros e ambientes tem sido relatada por inúmeros trabalhos. Estes isolamentos incluem amostra do trato intestinal de morcegos (Grose & Tamsitt, 1965) e fezes de pingüim (Gezuele, 1989). Outras observações com posterior isolamento do fungo foram obtidas em cachorros, que apresentaram manifestações clínicas típicas de PCM (Ono *et al.*, 2001; Ricci *et al.*, 2004), ração canina (Ferreira *et al.*, 1990), macacos (Corte *et al.*, 2007), bicho preguiça (*Choloepus didactylus*) (Trejo-Chavez *et al.*, 2010) e gato (Gonzalez *et al.*, 2010), sendo que neste último a identificação do fungo baseou-se apenas em exame microscópico dos esfregaços de liquor e urina.

2.1 – Espécies crípticas

Define-se como espécie críptica, duas ou mais espécies distintas, que são classificadas como espécie única em função de suas similaridades morfológicas (Pfenninger & Schwenk, 2007). Ao determinar diferenças genéticas, e não apenas morfológicas, é possível avaliar com maior precisão o potencial infectante de um microrganismo.

Ao longo dos anos a diversidade do Pb tem sido observada em termos de morfologia microscópica (Restrepo, 2000; Svidzinski *et al.*, 1999) e macroscópica (Macoris *et al.*, 2006), características de crescimento e transição (Kashino *et al.*, 1987; San-Blas *et al.*, 1997), composição lipídica (Hamdan *et al.*, 1992; Manocha *et al.*, 1980), componentes da parede celular (Camargo *et al.*, 1994; Crott *et al.*, 1997; San-Blas *et al.*, 1984; Silva *et al.*, 1994), perfis de

isoenzimas (Svidzinsky & Camargo, 1995), produção de antígenos (Campos *et al.*, 1995; Casotto *et al.*, 1991; Mendes-Giannini *et al.*, 1995), conteúdo protéico (Salem-Izacc *et al.*, 1997) e grau de virulência (Hebeler-Barbosa *et al.*, 2003; Kashino *et al.*, 1985; Singer-Vermes *et al.*, 1994; Zacharias *et al.*, 1986). Contudo a grande diversidade, entre diferentes isolados, deve-se a extensa variabilidade genética do Pb, comprovada através de análises moleculares (Soares *et al.*, 1995).

Estudos sobre variabilidade genética entre populações são atualmente empregados para o reconhecimento de espécies filogenéticas distintas (Matute *et al.*, 2006a; Matute *et al.*, 2006b; Teixeira *et al.*, 2009). Ao analisar oito regiões gênicas de 65 isolados de Pb, Matute *et al.* (2006), detectou a presença de três espécies filogenéticas distintas. S1, encontrada no Brasil, Argentina, Peru, Paraguai, e Venezuela; PS2, encontrada no Brasil e Venezuela; e PS3, encontrada apenas na Colômbia. S1 e PS2 são espécies simpátricas e recombinantes, enquanto que PS3 é alopátrica e clonal (Matute *et al.*, 2006a). O reconhecimento destas diferentes espécies crípticas pode esclarecer variações na virulência e expressão gênica do Pb, bem como sua capacidade de induzir doença.

3. Morfologia: Dimorfismo e estrutura microscópica

O Pb apresenta dimorfismo termo-dependente, crescendo sob forma micelial a 18-25°C, *in vitro* ou em condições saprofiticas. Nesta fase as colônias são brancas, firmemente aderidas ao meio de cultura e cobertas por micélio aéreo curto. Quando observadas ao microscópio apresentam finos filamentos micelianos, septados, que produzem esporos denominados conídeos (Franco *et al.*, 1989; San-Blas, 1986). Estes conídeos são

classificados de acordo com seu aspecto morfológico e localização nas hifas como: clamidoconídeos (clamidósporos), artroconídeos, aleuroconídeos e conídeos unicelulares (Bustamante-Simon *et al.*, 1985; Franco *et al.*, 1989; Miyaji *et al.*, 2003; San-Blas, 1986).

A forma leveduriforme do Pb é observada à temperatura de 35-37°C, *in vitro* ou *in vivo*. Em cultura, as colônias são cerebriformes, de coloração bege, facilmente destacadas do meio e compostas por células de diferentes tamanhos (5 a 40 µm). A principal característica morfológica destas células é a presença de múltiplos brotamentos (blastósporos), surgindo da célula mãe, que conferem o característico aspecto de “roda de leme” (Lacaz, 1994), aspecto patognomônico, pelo qual se faz o diagnóstico histológico da doença.

Análises ultraestruturais da parede celular permitem observar matrix composta de proteínas e polissacarídeos complexos. Trata-se de estrutura mutável onde, composição e organização estrutural, são reguladas durante o ciclo celular e em resposta a mudanças nas condições ambientais ou fatores estressantes, como privação de nutrientes e oxigenação. A transição dimórfica do Pb é determinante na substituição do polissacarídeo presente na parede celular (Kanetsuna *et al.*, 1972). Na fase micelial, a parede celular apresenta espessura de 80 a 150 nanômetros, e é composta por duas camadas, sendo a externa, mais eletrodensa e composta por β-1,3 glucana e a interna, de menor eletrodensidade, composta principalmente por quitina. Na fase leveduriforme, a parede celular varia em espessura de 200 a 600 nanômetros, onde também é possível identificar duas camadas. A camada externa composta por α -1,3 glucana e a camada interna por quitina (Carbonell, 1967; Carbonell &

Rodriguez, 1968; Carbonell, 1969; Carbonell *et al.*, 1970; Kanetsuna *et al.*, 1969; Kanetsuna & Carbonell, 1970).

4. Biologia

4.1 – Estruturas de resistência

Conídeos são as principais estruturas de resistência produzidas pelo Pb frente a condições ambientais adversas. O tempo de formação destas estruturas é variável, sendo os clamidósporos formados em culturas relativamente recentes (15 a 30 dias) (Franco *et al.*, 1989; Miyaji *et al.*, 2003; San-Blas, 1986) e os conídeos de formação tardia (após 30 ou mais dias de cultivo) (Bustamante-Simon *et al.*, 1985; Restrepo *et al.*, 1986).

Clamidósporos: Os clamidósporos são estruturas arredondadas, refringentes, formadas em posição intercalar ou terminal ao longo das hifas, de diâmetro variável (5 a 15 μm) e parede celular espessa (160 a 200 nm) (Carbonell & Rodriguez, 1968; Queiroz-Telles, 1994). A produção de clamidósporos pode ser detectada em meios de cultura ricos ou pobres em nutrientes. Entretanto, sob condições ambientais adversas (baixos níveis de nutrientes e oxigenação) (Franco *et al.*, 1989; Miyaji *et al.*, 2003) e temperaturas acima de 35°C (Miyaji *et al.*, 2003), verifica-se abundante produção destas estruturas. Quando submetidos a temperaturas superiores a 35°C são convertidos na forma leveduriforme (Carbonell & Rodriguez, 1965; Carbonell, 1969; Miyaji *et al.*, 2003; Pollak, 1971; Restrepo, 1970; San-Blas, 1986). Durante o processo de formação dos clamidósporos (esporogênese), em meio de cultura sólido, é possível observar estruturas imaturas, com menos de 5 μm . A esporogênese é substancialmente menor, nas estruturas micélicas, crescendo na superfície do agar, quando comparada com estruturas presentes em camadas mais

profundas (Carbonell & Rodriguez, 1965; Franco *et al.*, 1989). Clamidósporos completamente desenvolvidos apresentam um ou mais núcleos, numerosos vacúolos, depósitos lipídicos, retículo endoplasmático, vesículas e mitocôndrias. A presença destas estruturas indica potencial capacidade de desenvolvimento autônomo (Franco *et al.*, 1989).

Arthroconídeos, aleuroconídeos e conídeos unicelulares: Estes conídeos apresentam formato irregular (Samsonoff *et al.*, 1991) e são produzidos quando o Pb é cultivado à temperatura de 25 °C por período superior a 30 dias e sob privação de nutrientes (Bustamante-Simon *et al.*, 1985). Estes propágulos são menores que 5 µm, uninucleados e quando incubados a temperatura de 37 °C apresentam conversão em leveduras (Aristizabal *et al.*, 1998).

4.2 – Fatores de virulência

Fatores de virulência são estritamente definidos como qualquer habilidade ou característica que possibilita ao fungo aumentar sua virulência no hospedeiro (Hogan *et al.*, 1996). Para entender a origem da virulência dos fungos patogênicos é importante considerar o nicho ecológico do patógeno e os mecanismos que alteram a relação parasita-hospedeiro.

4.2.1. Dimorfismo: Em fungos dimórficos como *B. dermatitidis*, *C. immitis*, *H. capsulatum* e *P. brasiliensis*, a capacidade de conversão morfológica, frente à variação de temperatura, demonstra ser um importante, talvez o principal, fator de virulência que permite vencer a barreira termal presente em hospedeiros endotérmicos (Casadevall, 2007). O dimorfismo não depende somente da presença de polissacarídeos na parede celular, mas da quantidade e arranjo espacial destes polissacarídeos (Paris *et al.*, 1986; San-Blas & San-Blas, 1977). O exato mecanismo que controla o processo de

transição dimórfica ainda é desconhecido, e genes reguladores desta conversão estão sendo descritos (Klein & Tebbets, 2007).

4.2.2. Constituintes da parede celular: O papel da α -1,3-glucana e β -1,3-glucana, na regulação dimórfica do Pb, é demonstrado em vários trabalhos da literatura (Hallak *et al.*, 1982; San-Blas & San-Blas, 1992; San-Blas, 1985) e possui estreita relação com a virulência do fungo (San-Blas *et al.*, 1977). Diminuição no conteúdo de α -1,3-glucana, na parede das leveduras, está diretamente relacionado com a atenuação de virulência do fungo (San-Blas, 1985), embora cepas mutantes avirulentas retenham níveis normais do polissacarídeo (Kanetsuna, 1981; Zacharias *et al.*, 1986). Culturas de cepas virulentas, *in vitro*, por um longo período, apresentaram redução nos níveis de α -1,3-glucana, estreitamento da parede celular e perda de virulência em vários modelos experimentais (Brummer *et al.*, 1990; Kashino *et al.*, 1990). Contudo, há recuperação destas características após passagem em animais (Brummer *et al.*, 1990; Kashino *et al.*, 1990) ou cultivo em meios suplementados com soro fetal bovino (San-Blas & Vernet, 1977).

Acreditava-se anteriormente que a β -1,3-glucana, também atuasse como fator de virulência do Pb, porém hoje sabe-se que este polissacarídeo atua como imunomodulador da resposta inflamatória do hospedeiro, influenciando o perfil de citocinas liberadas, assim como o influxo de células polimorfonucleares e mononucleares (Anjos *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 1994).

4.2.3. Glicoproteína gp43: O gene PbGP43 codifica a glicoproteína fúngica gp43, um antígeno dominante do Pb, que foi amplamente estudado nas duas últimas décadas, quanto à caracterização, purificação e produção de anticorpos monoclonais anti-gp43 (Puccia *et al.*, 1986; Puccia & Travassos,

1991a; Puccia & Travassos, 1991b). Este antígeno é secretado para o ambiente extracelular, porém pode ser encontrado no citoplasma e parede celular do fungo (Straus *et al.*, 1996). Os estudos com a gp43 concentraram-se inicialmente no seu valor diagnóstico, uma vez que esta glicoproteína demonstrou alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico e prognóstico da PCM (Camargo *et al.*, 1994; Giannini *et al.*, 1990; Puccia & Travassos, 1991b). Entretanto o papel da gp43 como fator de virulência deve-se à capacidade desta molécula exercer efeito proteolítico sobre colágeno, elastina e caseína (Mendes-Giannini *et al.*, 1990), além de se ligar a laminina (Mendes-Giannini *et al.*, 2006), principal componente da membrana basal. Esta ligação desencadeia o processo de infecção do Pb, determinando invasão e disseminação tecidual (Barbosa *et al.*, 2006; Gesztes *et al.*, 1996; Mendes-Giannini *et al.*, 2006). Em modelo experimental demonstrou-se que a ligação gp43-laminina exacerba a resposta granulomatosa e aumenta a patogenicidade do fungo (Vicentini *et al.*, 1994).

4.2.4. Melanina: Melanina é um polímero multifuncional reportado como fator de virulência em inúmeros fungos (Gomez & Nosanchuk, 2003). A habilidade do Pb produzir melanina foi descrita primeiramente por Gómez *et al.* (2001) e revisada recentemente por Taborda *et al.* (2008). A produção de melanina aumenta a resistência do fungo contra o ataque de células efectoras do sistema imune, uma vez que, reduz a capacidade de fagocitose das leveduras pelos macrófagos alveolares (Gomez *et al.*, 2001; Taborda *et al.*, 2008). Células melanizadas também demonstraram menor susceptibilidade a potentes drogas antifúngicas utilizadas no tratamento da infecção por Pb (Da Silva *et al.*, 2006).

4.2.5. Proteínas ligantes de estrógeno (PLE): A PCM apresenta incidência desigual entre os sexos, apesar da exposição ao Pb em áreas endêmicas ser semelhante entre os sexos (Pereira, 1988). Estudos com paracoccidioidina indicam que ambos os sexos adquirem infecções sub-clínicas, nas mesmas proporções (Greer *et al.*, 1974; Restrepo *et al.*, 1968). Contudo, os hormônios femininos diminuem a virulência do fungo e conferem proteção contra o desenvolvimento da doença (Coutinho *et al.*, 2002; Loose *et al.*, 1983; Stevens, 1989). O principal hormônio envolvido neste processo, o 17β -estradiol, inibe o dimorfismo do Pb nos tecidos (Aristizabal *et al.*, 2002), similarmente ao que é observado *in vitro* (Restrepo *et al.*, 1984; Salazar *et al.*, 1988). O mecanismo de inibição é controlado pela ligação do estradiol com PLE de alta e baixa afinidade, presentes principalmente no citosol da célula fúngica (Loose *et al.*, 1983; Restrepo *et al.*, 1984; Stover *et al.*, 1986) e atua como um fator de virulência negativo, bloqueando o desenvolvimento da forma parasitária de Pb.

II – PARACOCCIDIOIDOMICOSE

1. Doença

Dados epidemiológicos, clínicos e experimentais têm substanciado a teoria de que a infecção por Pb se faz pela inalação de conídeos (Gonzalez *et al.*, 2008b; Lopera *et al.*, 2010; McEwen *et al.*, 1987) e determina o desenvolvimento da PCM, micose sistêmica de importância singular nos países da América Latina. A área endêmica situa-se entre México (23º Norte) e Argentina (34,5º Sul), porém a prevalência é maior nas Américas do Sul e Central (Restrepo, 1994; Wanke & Londero, 1994). A maioria das ocorrências

estão restritas a Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina (Blotta *et al.*, 1999; Brummer *et al.*, 1993; Dos Santos *et al.*, 1997; Manns *et al.*, 1996; Restrepo *et al.*, 2001). Não há evidências de transmissão da PCM entre humanos, fato que explica a doença não ser de notificação compulsória. Casos em mais de um membro da mesma família têm sido interpretados como eventos independentes de indivíduos expostos a fontes comuns de infecção na natureza (Lacaz, 1994; Restrepo, 1994).

PCM tem afetado tradicionalmente indivíduos vivendo em áreas endêmicas, principalmente trabalhadores rurais que estão em contato direto com o solo. Entretanto, com o advento de doenças imunossupressoras como AIDS e câncer são comuns os casos de infecção em regiões peri-urbanas (Anaissie *et al.*, 2009; John *et al.*, 2008; Morejon *et al.*, 2009; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2008; Silva-Vergara *et al.*, 2003). A história natural da infecção tem sido confirmada experimentalmente em animais de diferentes espécies, através da inoculação intranasal ou intratraqueal de suspensões conidiais. Estes modelos reproduzem a doença em suas fases iniciais, com lesão primária nos pulmões e lesões sistêmicas secundárias, em vários órgãos e sistemas, oriundas de disseminação linfática ou hematogênica (Montenegro & Franco, 1994; Restrepo Moreno, 1994).

A PCM apresenta-se sob duas formas clínicas: forma aguda/subaguda e forma crônica. A forma aguda/subaguda, também denominada forma juvenil, representa 15 a 20% de todos os casos, sendo diagnosticada principalmente em crianças, jovens e adultos até os 35 anos de idade (Ferreira, 2009). O curso da doença é progressivo e inferior a um ano, sendo as principais manifestações clínicas decorrentes do envolvimento do sistema fagocítico-mononuclear

(linfonôdos, fígado, baço e medula óssea) e acompanhadas de febre e perda de peso (Ferreira, 2009; Ramos e Silva & Saraiva, 2008; San-Blas *et al.*, 1992). A forma crônica é diagnosticada principalmente em homens entre 30 e 60 anos de idade, com apresentação clínica polimorfa, podendo envolver apenas um órgão, geralmente os pulmões, (forma unifocal) ou múltiplos órgãos (forma multifocal). A disseminação extra-pulmonar ocorre por via hematogênica e linfática e acomete linfonôdos, pele, glândulas adrenais e menos frequentemente o sistema nervoso central, ossos, fígado e baço (Brummer *et al.*, 1993; Ramos e Silva & Saraiva, 2008).

2. Modelos experimentais

2.1 – Aspectos gerais

A experimentação animal é amplamente utilizada em estudos que buscam reproduzir a infecção causada por fungos patógenos. Embora as condições criadas nos modelos experimentais possam variar frente ao observado no homem, o objetivo destes modelos é fornecer respostas a questões específicas sobre a doença em estudo. Na PCM, a experimentação animal gerou, ao longo dos anos, conhecimentos sobre a morfologia do Pb nos tecidos (Borba *et al.*, 2005; Lacaz *et al.*, 1963), a resposta tecidual frente à presença do fungo (Da Silva *et al.*, 2009; Lopera *et al.*, 2010), as vias de disseminação da infecção (Arruda *et al.*, 1994; Arruda & Montenegro, 1995), bem como as respostas imunológicas celular (Alves *et al.*, 2009) e humoral (Alves *et al.*, 2009; Pinzan *et al.*, 2010).

A maioria dos indivíduos expostos ao Pb desenvolvem apenas uma infecção assintomática, como revelado pela alta proporção de pessoas, nas

áreas endêmicas, com teste cutâneo positivo (Fava & Netto, 1998). Entretanto este fenômeno levanta várias questões difíceis de serem respondidas. Todos os indivíduos com teste positivo desenvolvem a doença no futuro? O desenvolvimento da doença está relacionado com a dose de infecção? Qual estrutura produzida pelo fungo é capaz de causar infecção? Na tentativa de responder estas perguntas é essencial a utilização de modelos experimentais, uma vez que, pouco se sabe sobre o nicho ecológico do Pb e o exato mecanismo de infecção.

Dentre as espécies animais utilizadas nos estudos experimentais, destaca-se o uso de camundongos (Defaveri *et al.*, 1982; Defaveri *et al.*, 1984; Defaveri *et al.*, 1989a; Defaveri *et al.*, 1989b; Defaveri *et al.*, 1992; Kerr *et al.*, 1982; Linares & Friedman, 1972; Mackinnon, 1959; Scavone & Burger, 2004), hamsters (Iabuki & Montenegro, 1979; Parise-Fortes *et al.*, 2000; Peraçoli *et al.*, 1982) e cobaias (De Brito & Netto, 1963; Kamegasawa *et al.*, 1988; Kamegasawa *et al.*, 1992). Porém, os camundongos são a espécie mais comumente utilizada nos modelos experimentais da PCM. Um importante estudo pioneiro, que forneceu novas perspectivas a respeito da patogênese desta infecção, foi realizado por Mackinnon *et al.* (1959), que infectou camundongos suíços, por 7 diferentes vias. Os animais infectados por via nasal apresentaram infecção pulmonar e posterior disseminação hematogênica e comprometimento dos linfonodos regionais. Estes resultados permitiram que MacKinnon levantasse a hipótese, amplamente aceita atualmente, de que a PCM inicia-se nos pulmões, após inalação do fungo, e que a disseminação ocorre por via hematogênica e linfática.

3. Vias de Infecção

Entre as principais vias de infecção utilizadas experimentalmente para o estudo da PCM destacam-se:

3.1 – Via Intranasal

É a principal via de infecção utilizada em estudos de PCM, uma vez que, mimetiza a rota mais provável de infecção humana. Os primeiros trabalhos obtiveram infecção, em baixo grau, quando inoculadas, por esta via, células leveduriformes (Bedoya *et al.*, 1986). Entretanto, após McEwen *et al.* (1987) ter demonstrado o potencial infectante, dos conídeos de Pb, os estudos utilizando esta via passaram a ser amplamente aplicados (Gonzalez *et al.*, 2008a; Gonzalez *et al.*, 2008b; González *et al.*, 2008).

3.2 – Via Intratraqueal

Esta via foi alvo dos primeiros estudos de PCM pulmonar, onde os estudos obtiveram altos índices de reprodutibilidade da PCM, ao inocular por via traqueal, leveduras do Pb (Defaveri *et al.*, 1982; Robledo *et al.*, 1982). Por esta via, o fungo é diretamente inoculado nos pulmões, atingindo os alvéolos, praticamente sem barreiras, o que torna este modelo experimental bastante reproduzível. Entretanto, este modelo apresenta o viés de não reproduzir o mecanismo inalatório natural de infecção.

3.3 – Via intraperitoneal

Amplamente utilizada em estudos da resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção. A disseminação da infecção para os mais variados órgãos ocorre pouco tempo após a realização do inóculo (Kerr *et al.*, 1982; Robledo *et al.*, 1982; Singer-Vermes *et al.*, 1993).

3.4 – Via endovenosa

Utilizada nos primeiros estudos da resposta inflamatória, onde a disseminação do fungo permite uma extensa análise dos padrões de resposta imune celular (Defaveri *et al.*, 1984; Linares & Friedman, 1972).

Há décadas os modelos experimentais fornecem ferramentas para a análise dos mecanismos responsáveis pela instalação da PCM. Entretanto ainda são alvos de muita discussão, itens como: falta de padronização dos inóculos e reprodutibilidade dos métodos. Atualmente apesar dos estudos experimentais fornecerem características mais detalhadas dos animais utilizados, dados da literatura demonstram que a susceptibilidade ao Pb pode variar entre as espécies, ou mesmo, dentro da mesma espécie, de acordo com o sexo, idade e via de infecção utilizada.

As diferentes vias de inoculação podem influenciar diretamente no padrão da infecção observada, fenômeno que provavelmente está relacionado ao tipo de inóculo (conídeos ou leveduras), quantidade e distribuição do inóculo nos tecidos. Contudo, deve-se enfatizar que a maioria dos estudos experimentais utilizam leveduras do Pb, como partícula infectante, embora acredite-se que a infecção do homem seja induzida pelos conídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajello, L. (1967). Comparative ecology of respiratory mycotic disease agents. *Bacteriol Rev* 31:6-24.
- Alves, C. C., Azevedo, A. L., Rodrigues, M. F., *et. al.* (2009). Cellular and humoral immune responses during intrathoracic paracoccidioidomycosis in BALB/c mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32:513-525.
- Anaissie, E., Graziutti, M., Nucci, M., Elias, J. A., Michael, R. M., & Michael, A. P. (2009). Invasive fungal infections in cancer patients. In *Clinical Mycology (Second edition)*, pp. 431-471. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Anjos, A. R., Calvi, S. A., Ferracini, R., Peraçoli, M. T., Silva, C. L. & Soares, A. M. (2002). Role of Paracoccidioides brasiliensis cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. *Med Mycol* 40:377-382.
- Aristizabal, B. H., Clemons, K. V., Stevens, D. A. & Restrepo, A. (1998). Morphological transition of Paracoccidioides brasiliensis conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect Immun* 66:5587-5591.
- Aristizabal, B. H., Clemons, K. V., Cock, A. M., Restrepo, A. & Stevens, D. A. (2002). Experimental paracoccidioides brasiliensis infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol* 40:169-178.
- Arruda, M. S., Coelho, K. I. & Montenegro, M. R. (1994). Experimental paracoccidioidomycosis of hamster inoculated in the cheek pouch. *Mycopathologia* 128:67-73.
- Arruda, M. S. & Montenegro, M. R. (1995). The hamster cheek pouch: an immunologically privileged site suitable to the study of granulomatous infections. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 37:303-309.
- Bagagli, E., Sano, A., Coelho, K. I., *et. al.* (1998). Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from armadillos (Dasypus noveminctus) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 58:505-512.
- Bagagli, E., Franco, M., Bosco, S. M., Hebel-Barbosa, F., Trinca, L. A. & Montenegro, M. R. (2003). High frequency of Paracoccidioides brasiliensis
-

- infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol* 41:217-223.
- Bagagli, E., Bosco, S. M. G., Theodoro, R. C. & Franco, M. (2006). Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infection, Genetics and Evolution* 6:344-351.
- Barbosa, M. S., Bao, S. N., Andreotti, P. F., *et. al.* (2006). Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* 74:382-389.
- Barrozo, L. V., Benard, G., Silva, M. E., Bagagli, E., Marques, S. A. & Mendes, R. P. (2010). First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e643.
- Bedoya, V., McEwen, J. G., Tabares, A. M., Jaramillo, F. U. & Restrepo, A. (1986). Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a histopathological study of the experimental murine infection. *Mycopathologia* 94:133-144.
- Blotta, M., Mamoni, R., Oliveira, S., *et. al.* (1999). Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg* 61:390-394.
- Borba, C. M., Vinhas, E. A., Lopes-Bezerra, L. M. & Lucena-Silva, N. (2005). Morphological, biochemical and molecular approaches for comparing typical and atypical *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek* 88:257-266.
- Brummer, E., Restrepo, A., Hanson, L. H. & Stevens, D. A. (1990). Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of in vitro passage and storage. *Mycopathologia* 109:13-17.
- Brummer, E., Castaneda, E. & Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6:89-117.
-

- Bustamante-Simon, B., McEwen, J. G., Tabares, A. M., Arango, M. & Restrepo-Moreno, A. (1985). Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 23:407-414.
- Camargo, Z. P., Gesztesi, J. L., Saraiva, E. C., Taborda, C. P., Vicentini, A. P. & Lopes, J. D. (1994). Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 32:2377-2381.
- Campos, M. C., Gesztesi, J. L., Vincentini, A. P., Lopes, J. D. & Camargo, Z. P. (1995). Expression and isoforms of gp43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 33:223-227.
- Carbonell, L. M. & Rodriguez, J. (1965). Transformation of Mycelial and Yeast Forms of *Paracoccidioides Brasiliensis* in Cultures and in Experimental Inoculations. *J Bacteriol* 90:504-510.
- Carbonell, L. M. (1967). Cell wall changes during the budding process of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. *J Bacteriol* 94:213-223.
- Carbonell, L. M. & Rodriguez, J. (1968). Mycelial phase of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*: an electron microscope study. *J Bacteriol* 96:533-543.
- Carbonell, L. M. (1969). Ultrastructure of dimorphic transformation in *paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 100:1076-1082.
- Carbonell, L. M., Kanetsuna, F. & Gil, F. (1970). Chemical morphology of glucan and chitin in the cell wall of the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 101:636-642.
- Casadevall, A. (2007). Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biology Reviews* 21:130-132.
- Casotto, M., Paris, S. & Camargo, Z. P. (1991). Antigens of diagnostic value in three isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 29:243-253.
- Corredor, G. G., Castano, J. H., Peralta, L. A., *et. al.* (1999). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasyus*
-

- novemcinctus, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol* 16:216-220.
- Corte, A. C., Svoboda, W. K., Navarro, I. T., *et. al.* (2007). Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil. *Mycopathologia* 164:225-228.
- Coutinho, Z. F., Silva, D., Lazera, M., *et. al.* (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* 18:1441-1454.
- Crott, L. S., Lucisano-Valim, Y. M., Silva, C. L. & Barbosa, J. E. (1997). Interactions of F1 fractions from different strains of *Paracoccidioides brasiliensis* with human complement and with human neutrophils. *Mycopathologia* 140:19-27.
- Da Silva, F. C., Svidzinski, T. I., Patussi, E. V., Cardoso, C. P., De Oliveira Dalalio, M. M. & Hernandez, L. (2009). Morphologic organization of pulmonary granulomas in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 80:798-804.
- Da Silva, M. B., Marques, A. F., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Travassos, L. R. & Tabora, C. P. (2006). Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes and Infection* 8:197-205.
- De Albornoz, M. B. (1971). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia* 9:248-253.
- De Brito, T. & Netto, C. F. (1963). Disseminated experimental South American blastomycosis of the guinea pig; a pathologic and immunologic study. *Pathol Microbiol* 26:29-43.
- Defaveri, J., Rezkallah-Iwasso, M. T. & de Franco, M. F. (1982). Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in mice: morphology and correlation of lesions with humoral and cellular immune response. *Mycopathologia* 77:3-11.
- Defaveri, J., Tamanini, J., Tonolli, L. & Franco, M. (1984). Skin and pulmonary models using coated bentonite particles for the study of the inflammation
-

- evoked by *Paracoccidioides brasiliensis* antigens in previously immunized mice. *Sabouraudia* 22:477-486.
- Defaveri, J., Coelho, K. I., Rezkallah-Iwasso, M. T. & Franco, M. (1989a). Hypersensitivity pneumonitis to *Paracoccidioides brasiliensis* antigens in mice. *J Med Vet Mycol* 27:93-104.
- Defaveri, J., Martin, L. C. & Franco, M. (1989b). Histological and ultrastructural study of the inflammation evoked by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in previously immunized mice. *Mycopathologia* 105:53-58.
- Defaveri, J., Rezkallah-Iwasso, M. T. & Franco, M. F. (1992). Pulmonary paracoccidioidomycosis in immunized mice. *Mycopathologia* 119:1-9.
- Deus Filho, A. (2009). Chapter 2: coccidioidomycosis. *J Bras Pneumol* 35:920-930.
- Dos Santos, J. W., Michel, G. T. & Londero, A. T. (1997). Paracoccidioidoma: case record and review. *Mycopathologia* 137:83-85.
- Fava, S. C. & Netto, C. F. (1998). Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 40:155-164.
- Ferreira, M. S., Freitas, L. H., Lacaz, C. S., *et. al.* (1990). Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. *J Med Vet Mycol* 28:253-256.
- Ferreira, M. S. (2009). Paracoccidioidomycosis. *Paediatric Respiratory Reviews* 10:161-165.
- Ferreira, M. S. & Borges, A. S. (2009). [Histoplasmosis]. *Rev Soc Bras Med Trop* 42:192-198.
- Franco, M., Sano, A., Kera, K., Nishimura, K., Takeo, K. & Miyaji, M. (1989). Chlamyospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 31:151-157.
-

- Franco, M., Bagagli, E., Scapolio, S. & Lacaz, C. S. (2000). A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Medical Mycology* 38:185-191.
- Gesztési, J. L., Puccia, R., Travassos, L. R., *et. al.* (1996). Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. *Hybridoma* 15:415-422.
- Gezuele, E. (1989). Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. de heces de pinguino de la Antártida. In *Proceedings IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis*. Edited by G. San-Blas. Caracas, Venezuela: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).
- Giannini, M. J., Bueno, J. P., Shikanai-Yasuda, M. A., *et. al.* (1990). Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med Hyg* 43:200-206.
- Ginarte, M., Pereiro, M., Jr. & Toribio, J. (2003). Imported paracoccidioidomycosis in Spain. *Mycoses* 46:407-411.
- Gomez, B. L., Nosanchuk, J. D., Diez, S., *et. al.* (2001). Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. *Infect Immun* 69:5760-5767.
- Gomez, B. L. & Nosanchuk, J. D. (2003). Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis* 16:91-96.
- Gonzalez, A., Lenzi, H. L., Motta, E. M., Caputo, L., Restrepo, A. & Cano, L. E. (2008a). Expression and arrangement of extracellular matrix proteins in the lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Int J Exp Pathol* 89:106-116.
- Gonzalez, A., Restrepo, A. & Cano, L. E. (2008b). Pulmonary immune responses induced in BALB/c mice by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Mycopathologia* 165:313-330.
- González, A., Caro, E., Muñoz, C., Restrepo, A., Hamilton, A. J. & Cano, L. E. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis* conidia recognize fibronectin and
-

- fibrinogen which subsequently participate in adherence to human type II alveolar cells: Involvement of a specific adhesin. *Microbial Pathogenesis* 44:389-401.
- Gonzalez, J. F., Montiel, N. A. & Maass, R. L. (2010). First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat. *Journal of Feline Medicine & Surgery* 12:659-662.
- Greer, D. L., D'Costa de Estrada, D. & Agredo de Trejos, L. (1974). Dermal sensitivity to paracoccidioidin and histoplasmin in family members of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 23:87-98.
- Grose, E. & Tamsitt, J. R. (1965). Paracoccidioides brasiliensis recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia* 4:124-125.
- Hallak, J., San-Blas, F. & San-Blas, G. (1982). Isolation and wall analysis of dimorphic mutants of Paracoccidioides brasiliensis. *Sabouraudia* 20:51-62.
- Hamdan, J. S., de Resende, M. A., Franzot, S. P. & Cisalpino, E. O. (1992). Biochemical analysis of the methylic antigen of Paracoccidioides brasiliensis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 34:511-516.
- Hebeler-Barbosa, F., Montenegro, M. R. & Bagagli, E. (2003). Virulence profiles of ten Paracoccidioides brasiliensis isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Med Mycol* 41:89-96.
- Hogan, L. H., Klein, B. S. & Levitz, S. M. (1996). Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 9:469-488.
- Horre, R., Schumacher, G., Alpers, K., et. al. (2002). A case of imported paracoccidioidomycosis in a German legionnaire. *Med Mycol* 40:213-216.
- labuki, K. & Montenegro, M. R. (1979). Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. *Mycopathologia* 67:131-141.
- Jarvis, J. N. & Harrison, T. S. (2008). Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med* 29:141-150.
-

- John, M., Paul, A. V., Merle, A. S., Warner, C. G., & Joep, M. A. L. (2008). The HIV-infected International Traveler. In *Global HIV/AIDS Medicine (First edition)*, pp. 555-563. Edinburgh: W.B. Saunders.
- Kamegasawa, A., Viero, R. M., Rezkallah-Iwasso, M. T. & Franco, M. F. (1988). Protective effect of prior immunization on ocular paracoccidioidomycosis in guinea pigs. *Mycopathologia* 103:35-42.
- Kamegasawa, A., Iwasso, M. T., Viero, R. & Franco, M. (1992). Evaluation of different immunization protocols with *P. brasiliensis* antigens in guinea pigs. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 34:243-249.
- Kamei, K., Sano, A., Kikuchi, K., *et. al.* (2003). The trend of imported mycoses in Japan. *J Infect Chemother* 9:16-20.
- Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Moreno, R. E. & Rodriguez, J. (1969). Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 97:1036-1041.
- Kanetsuna, F. & Carbonell, L. M. (1970). Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 101:675-680.
- Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Azuma, I. & Yamamura, Y. (1972). Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 110:208-218.
- Kanetsuna, F. (1981). Ultrastructural studies on the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia* 19:275-286.
- Kashino, S. S., Calich, V. L., Burger, E. & Singer-Vermes, L. M. (1985). In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia* 92:173-178.
- Kashino, S. S., Calich, V. L., Singer-Vermes, L. M., Abrahamsohn, P. A. & Burger, E. (1987). Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycopathologia* 99:119-128.
- Kashino, S. S., Singer-Vermes, L. M., Calich, V. L. & Burger, E. (1990). Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis* isolate do not correlate with its in vitro growth. *Mycopathologia* 111:173-180.
-

- Kauffman, C. A. (2009). Histoplasmosis. *Clin Chest Med* 30:217-225.
- Kerr, I. B., da Costa, S. C. G. & Alencar, A. (1982). Experimental paracoccidioidomycosis in immunosuppressed mice. *Immunology Letters* 5:151-154.
- Klein, B. S. & Tebbets, B. (2007). Dimorphism and virulence in fungi. *Current Opinion in Microbiology* 10:314-319.
- Lacaz, C. D., Minami, P. S. & Ramos, W. F. (1963). [Morphological Aspects of Paracoccidioides Brasiliensis in Parasitic Life.]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 18:273-284.
- Lacaz, C. S. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. In *Paracoccidioidomycosis*, pp. 13-25. Edited by M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno & G. Del Negro. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Laniado-Laborin, R. (2007). Expanding understanding of epidemiology of coccidioidomycosis in the Western hemisphere. *Ann N Y Acad Sci*, 29.
- Lin, X. (2009). Cryptococcus neoformans: morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol* 9:401-416.
- Linares, L. I. & Friedman, L. (1972). Experimental paracoccidioidomycosis in mice. *Infect Immun* 5:681-687.
- Loose, D. S., Stover, E. P., Restrepo, A., Stevens, D. A. & Feldman, D. (1983). Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in Paracoccidioides brasiliensis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:7659-7663.
- Lopera, D., Naranjo, T., Hidalgo, J. M., et. al. (2010). Pulmonary abnormalities in mice with paracoccidioidomycosis: a sequential study comparing high resolution computed tomography and pathologic findings. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e726.
- Mackinnon, J. E. (1959). Pathogenesis of South American blastomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 53:487-494.
-

- Macoris, S. A., Sugizaki, M. F., Peraçoli, M. T., *et. al.* (2006). Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:331-334.
- Manns, B. J., Baylis, B. W., Urbanski, S. J., Gibb, A. P. & Rabin, H. R. (1996). Paracoccidioidomycosis: case report and review. *Clin Infect Dis* 23:1026-1032.
- Manocha, M. S., San-Blas, G. & Centeno, S. (1980). Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. *J Gen Microbiol* 117:147-154.
- Matute, D. R., McEwen, J. G., Puccia, R., *et. al.* (2006a). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 23:65-73.
- Matute, D. R., Sepulveda, V. E., Quesada, L. M., *et. al.* (2006b). Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 44:2153-2157.
- Mayr, A., Kirchmair, M., Rainer, J., *et. al.* (2004). Chronic paracoccidioidomycosis in a female patient in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23:916-919.
- McEwen, J. G., Bedoya, V., Patino, M. M., Salazar, M. E. & Restrepo, A. (1987). Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 25:165-175.
- Mendes-Giannini, M. J., Moraes, R. A. & Ricci, T. A. (1990). Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 32:384-385.
- Mendes-Giannini, M. J., Toscano, E., del Negro, G. B., Assis, C. M. & Garcia, N. M. (1995). Immunochemical study of a *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide-like antigen. *J Med Vet Mycol* 33:379-383.
- Mendes-Giannini, M. J. S., Andreotti, P. F., Vincenzi, L. R., *et. al.* (2006). Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infection* 8:1550-1559.
-

- Miyaji, M., Sano, A., Sharmin, S., Kamei, K. & Nishimura, K. (2003). The role of chlamyospores of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 44:133-138.
- Montenegro, M. & Franco, M. (1994). Pathology In *Paracoccidioidomycosis*, pp. 131-150. Edited by M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno & G. Del Negro. Boca Raton, FL: CRC Press
- Morejon, K. M., Machado, A. A. & Martinez, R. (2009). Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. *Am J Trop Med Hyg* 80:359-366.
- Naiff, R. D., Ferreira, L. C., Barrett, T. V., Naiff, M. F. & Arias, J. R. (1986). [Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 28:19-27.
- Negróni, P. (1968). Studies on the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* in Argentina. *Torax* 17:60-63.
- Nemecek, J. C., Wuthrich, M. & Klein, B. S. (2006). Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* 312:583-588.
- Ono, M. A., Bracarense, A. P., Morais, H. S., Trapp, S. M., Belitardo, D. R. & Camargo, Z. P. (2001). Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol* 39:277-282.
- Paris, S., Prevost, M.-C., Latgé, J.-P. & Garrison, R. G. (1986). Cytochemical study of the yeast and mycelial cell walls of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Experimental Mycology* 10:228-242.
- Parise-Fortes, M. R., da Silva, M. F., Sugizaki, M. F., *et. al.* (2000). Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. *Med Mycol* 38:51-60.
- Peraçoli, M. T., Mota, N. G. & Montenegro, M. R. (1982). Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster. Morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. *Mycopathologia* 79:7-17.
-

- Pereira, A. J. C. S. (1988). Inquérito intradérmico para paracoccidioidomicose em Goiânia. *Rev Pat trop* 17:157-186.
- Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36:1-53.
- Pfenninger, M. & Schwenk, K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* 7:121.
- Pinzan, C. F., Ruas, L. P., Casabona-Fortunato, A. S., Carvalho, F. C. & Roque-Barreira, M. C. (2010). Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS One* 5:e10757.
- Pollak, L. (1971). Aleuriospores of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathol Mycol Appl* 45:217-219.
- Puccia, R., Schenkman, S., Gorin, P. A. & Travassos, L. R. (1986). Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun* 53:199-206.
- Puccia, R. & Travassos, L. R. (1991a). The 43-kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: Excretion and susceptibility to proteolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 289:298-302.
- Puccia, R. & Travassos, L. R. (1991b). 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.
- Queiroz-Telles, F. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis* Ultrastructural Findings. In *Paracoccidioidomycosis*, pp. 27-47. Edited by M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno & G. Del Negro. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Ramos e Silva, M. & Saraiva, L. d. E. S. (2008). Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin* 26:257-269.
- Rappleye, C. A. & Goldman, W. E. (2006). Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol* 60:281-303.
-

- Restrepo, A., Robledo, M., Ospina, S., Restrepo, M. & Correa, A. (1968). Distribution of paracoccidioidin sensitivity in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 17:25-37.
- Restrepo, A. (1970). A reappraisal of the microscopical appearance of the mycelial phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 8:141-144.
- Restrepo, A., Salazar, M. E., Cano, L. E., Stover, E. P., Feldman, D. & Stevens, D. A. (1984). Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 46:346-353.
- Restrepo, A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* 23:323-334.
- Restrepo, A., Salazar, M. E., Cano, L. E. & Patino, M. M. (1986). A technique to collect and dislodge conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *J Med Vet Mycol* 24:247-250.
- Restrepo, A. (1994). *Ecology of Paracoccidioides brasiliensis*. In *Paracoccidioidomycosis*, pp. 121-131. Edited by M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno & G. Del Negro. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Restrepo, A. (2000). Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? *Med Mycol* 38:317-322.
- Restrepo, A., Baumgardner, D. J., Bagagli, E., *et. al.* (2000). Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Medical Mycology* 38:67-77.
- Restrepo, A., McEwen, J. G. & Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 39:233-241.
- Restrepo Moreno, A. (1994). *Ecology of Paracoccidioides brasiliensis*. In *Paracoccidioidomycosis*, pp. 121-131. Edited by M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno & G. Del Negro. Boca Raton: CRC PRESS.
- Ricci, G., Mota, F. T., Wakamatsu, A., Serafim, R. C., Borra, R. C. & Franco, M. (2004). Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 42:379-383.
-

-
-
- Robledo, M. A., Graybill, J. R., Ahrens, J., Restrepo, A., Drutz, D. J. & Robledo, M. (1982). Host defense against experimental paracoccidioidomycosis. *Am Rev Respir Dis* 125:563-567.
- Salazar, M. E., Restrepo, A. & Stevens, D. A. (1988). Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun* 56:711-713.
- Salem-Izacc, S. M., Jesuino, R. S., Brito, W. A., Pereira, M., Felipe, M. S. & Soares, C. M. (1997). Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stage-specific forms and during cellular differentiation. *J Med Vet Mycol* 35:205-211.
- Samsonoff, W. A., Salazar, M. E., McKee, M. L., Restrepo, A., Cano, L. E. & Edwards, M. R. (1991). Scanning electron microscopy of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 114:9-15.
- San-Blas, F. (1986). Ultrastructure of spore formation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 24:203-210.
- San-Blas, F. & San-Blas, G. (1992). Mutants of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 affected in dimorphism. *J Med Vet Mycol* 30:51-60.
- San-Blas, G. & San-Blas, F. (1977). *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia* 62:77-86.
- San-Blas, G., San-Blas, F. & Serrano, L. E. (1977). Host-parasite relationships in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. *Infect Immun* 15:343-346.
- San-Blas, G. & Vernet, D. (1977). Induction of the synthesis of cell wall alpha-1,3-glucan in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. *Infect Immun* 15:897-902.
- San-Blas, G., San-Blas, F., Ordaz, D., Centeno, S. & Albornoz, M. C. (1984). Chemical changes in cell wall structure of five strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 22:255-257.
- San-Blas, G. (1985). *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. *Curr Top Med Mycol* 1:235-257.
-
-

- San-Blas, G., Restrepo, A., Clemons, K. & other authors (1992). Paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1:59-71.
- San-Blas, G., Padron, R., Alamo, L. & San-Blas, F. (1997). Use of morphology index histograms to quantify populations of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology* 143:197-202.
- Scavone, R. & Burger, E. (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.
- Schwarz, J. (1986). Comparative epidemiology of four deep mycoses--a review. *Mykosen* 29:5-9.
- Shikanai-Yasuda, M. A., Conceicao, Y. M., Kono, A., Rivitti, E., Campos, A. F. & Campos, S. V. (2008). Neoplasia and paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 165:303-312.
- Shome, S. K. & Batista, A. C. (1963). Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife (Brazil). *Rev Fac Med Univ Ceará* 3:90-94.
- Silva-Vergara, M. L., Martinez, R., Chadu, A., Madeira, M., Freitas-Silva, G. & Leite Maffei, C. M. (1998). Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol* 36:37-42.
- Silva-Vergara, M. L., Martinez, R., Camargo, Z. P., Malta, M. H. B., Maffei, C. M. L. & Chadu, J. B. (2000). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Medical Mycology* 38:193-199.
- Silva-Vergara, M. L., Teixeira, A. C., Curi, V. G., *et. al.* (2003). Paracoccidioidomycosis associated with human immunodeficiency virus infection. Report of 10 cases. *Med Mycol* 41:259-263.
- Silva, C. L., Alves, L. M. & Figueiredo, F. (1994). Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology* 140:1189-1194.
-

- Singer-Vermes, L. M., Caldeira, C. B., Burger, E. & Calich, L. G. (1993). Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol* 94:75-79.
- Singer-Vermes, L. M., Burger, E., Calich, V. L., *et. al.* (1994). Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in an experimental murine model. *Clin Exp Immunol* 97:113-119.
- Soares, C. M., Madlun, E. E., da Silva, S. P., Pereira, M. & Felipe, M. S. (1995). Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 33:505-507.
- Stevens, D. A. (1989). The interface of mycology and endocrinology. *J Med Vet Mycol* 27:133-140.
- Stover, E. P., Schar, G., Clemons, K. V., Stevens, D. A. & Feldman, D. (1986). Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun* 51:199-203.
- Straus, A. H., Freymuller, E., Travassos, L. R. & Takahashi, H. K. (1996). Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. *J Med Vet Mycol* 34:181-186.
- Svidzinski, T. I., Miranda Neto, M. H., Santana, R. G., Fischman, O. & Colombo, A. L. (1999). *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 41:279-283.
- Svidzinsky, T. I. & Camargo, Z. P. (1995). Isoenzyme profile of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 33:281-285.
- Taborda, C. P., da Silva, M. B., Nosanchuk, J. D. & Travassos, L. R. (2008). Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia* 165:331-339.
-

-
- Teixeira, M. M., Theodoro, R. C., de Carvalho, M. J. A., *et. al.* (2009). Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52:273-283.
- Trejo-Chavez, A., Ramirez-Romero, R., Ancer-Rodriguez, J., Nevarez-Garza, A. M. & Rodriguez-Tovar, L. E. (2010). Disseminated Paracoccidioidomycosis in a Southern Two-Toed Sloth (*Choloepus didactylus*). *J Comp Pathol*, 18.
- Untereiner, W. A., Scott, J. A., Naveau, F. A., Sigler, L., Bachewich, J. & Angus, A. (2004). The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycologia* 96:812-821.
- Van Damme, P. A., Bierenbroodspot, F., Telggt, D. S., Kwakman, J. M., De Wilde, P. C. & Meis, J. F. (2006). A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in The Netherlands. *Med Mycol* 44:13-18.
- Vicentini, A. P., Gesztesi, J. L., Franco, M. F., *et. al.* (1994). Binding of Paracoccidioides brasiliensis to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* 62:1465-1469.
- Wanke, B. & Londero, A. T. (1994). Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In *Paracoccidioidomycosis*, pp. 109-120. Edited by M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno & G. Del Negro. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Zacharias, D., Ueda, A., Moscardi-Bacchi, M., Franco, M. & San-Blas, G. (1986). A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three Paracoccidioides brasiliensis isolates. *J Med Vet Mycol* 24:445-454.
-

CAPÍTULO II

ARTIGO

TÍTULO

Clamidósporos do *Paracoccidioides brasiliensis*: isolamento e estudo da infectividade em modelo experimental murino

Autores:

Igor Otavio Minatel¹, Julio Defaveri¹, Denise Fecchio¹

¹Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Abreviações:

Minatel, I.O.

Defaveri, J.

Fecchio, D.

Em conformidade com as normas do periódico **Medical Mycology** (exceto Tabelas e Figuras, dispostas ao longo do texto para facilitar a leitura).

RESUMO

Este trabalho objetivou desenvolver um protocolo para produção, isolamento e purificação de clamidósporos do *P. brasiliensis* (Pb) e estudar seu potencial infectante em camundongos. A cepa Bt83 foi cultivada em meio líquido por 14 dias à temperatura de 25 °C e posteriormente incubada por 36 horas a 32 °C para a produção de clamidósporos. Os clamidósporos foram liberados por agitação magnética e sonicação. A purificação foi realizada em gradiente de concentração com Percoll a 95%, resultando em suspensão de clamidósporos com viabilidade de 90% e com poucos (8%) fragmentos miceliais. Para avaliar seu potencial infectante, os clamidósporos foram inoculados em camundongos por via intranasal, e os animais eutanasiados após 24h, 1, 2 e 4 semanas de infecção foram estudados através da histologia e quantificação da carga fúngica pela contagem de unidades formadoras de colônia dos pulmões, baço e fígado. Vinte e quatro horas pós-infecção observaram-se no pulmão focos de broncopneumonia contendo grande número de leveduras, algumas em brotamento múltiplo. Nos períodos subseqüentes observaram-se lesões granulomatosas, com presença de fungos, principalmente nos pulmões. A disseminação para baço e fígado foi precoce, iniciando na 1ª semana de infecção. Neste trabalho demonstramos que os clamidósporos do Pb podem ser, fácil e rapidamente, produzidos e isolados. Também mostramos que estes esporos são altamente infectantes e capazes de disseminação precoce. Os resultados indicam que os clamidósporos podem desempenhar um importante papel na infecção e desenvolvimento da paracoccidioomicose.

Palavras-chave: Clamidósporo; Infecção; Isolamento; *Paracoccidioides brasiliensis*; Paracoccidioomicose; Purificação.

ABSTRACT

This study aimed at development a protocol for production, isolation and purification of chlamyospores of *P. brasiliensis* (Pb) and study their potential infectious in mice. Bt83 strain was grown in liquid medium for 14 days at 25 °C and then incubated for 36 hours at 32°C to produce chlamyospores. The chlamyospores were released by magnetic stirring and sonication. The purification was performed in concentration gradient with Percoll to 95%, resulting in a suspension of chlamyospores 90% viable and few (8%) mycelia non-viable fragments. To assess their potential infectious the chlamyospores, mice were inoculated intranasally and euthanized after 24 h, 1, 2 and 4 weeks of infection and their lungs, spleen and liver studied histologically and quantified the fungal burden by colony forming units counting. Twenty-four hours post-infection, multiple foci of bronchopneumonia were seen containing many multibudding yeast cells. In subsequent periods there were granulomatous lesions with the presence of fungi, mainly in the lungs. Dissemination to the spleen and liver was an early event, starting at 1 week of infection. This work provided evidences that the chlamyospores of Pb can be quickly and easily produced and isolated. It was also shown that these spores are highly infectious and have great ability to disseminate soon after infection. These results indicate that chlamyospores might be elected as an important infectious particle in paracoccidioidomycosis.

Keywords: Chlamyospore; Infection; Isolation; *Paracoccidioides brasiliensis*; Paracoccidioidomycosis; Purification.

INTRODUÇÃO

Paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica, causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). A PCM cursa como inflamação granulomatosa, envolvendo particularmente o pulmão e o sistema monocítico-macrofágico (linfonodos e baço) [1, 2]. A infecção é endêmica em áreas subtropicais da América Latina afetando principalmente homens e lavradores que estão em contato direto com o solo [3, 4]. À semelhança de outras micoses profundas como histoplasmose, blastomicose e coccidioidomicose [5], acredita-se que a infecção ocorra por via respiratória, através da inalação de propágulos infectantes denominados conídeos [6, 7]. Estes propágulos são formados ao longo das hifas presentes no solo, que ao ser revolvido, leva ao desprendimento mecânico destes conídeos, que suspensos no ar seriam inspirados produzindo infecção.

O Pb é considerado um fungo dimórfico termo-dependente, pois cresce sob forma de leveduras, *in vivo* ou *in vitro*, quando submetido à temperatura de 37°C. Nesta forma, o Pb produz colônias de aspecto cerebriforme, compostas por células arredondadas, de dupla parede, birrefringentes, com ou sem gemulação múltipla. Estes brotamentos múltiplos conferem o aspecto de “roda-de-leme”, característico do Pb e patognomônico da doença. As leveduras podem atingir de 5 a 40 µm no seu maior diâmetro [8]. Em condições saprófitas, ou cultura a temperatura ambiente (23-25°C), desenvolve finos filamentos micelianos septados e aderentes ao meio [8, 9].

A conidiogênese do Pb é processo complexo e dependente de diversos fatores, como composição do meio de cultura, temperatura, período de incubação e oxigenação [6, 7, 10]. Basicamente, dois tipos de conídeos do Pb

são considerados possíveis partículas infectantes: artroconídeos e os clamidoconídeos (clamidósporos) [11]. Os artroconídeos têm sido bastante estudados pelo grupo colombiano de pesquisadores, que estabeleceram o método de produção [6], isolamento [12] e teste da infectividade destas partículas [13]. Entretanto, a produção destas estruturas é realizada exclusivamente em meio de cultura pobre em nutrientes [12], após 1-2 meses, o que, somado à difícil separação dos artroconídeos das hifas torna o processo longo e trabalhoso, colocando em dúvida a idéia de que estas partículas sejam realmente os propágulos infectantes do Pb na natureza.

Por outro lado, sabe-se que, *in vitro*, culturas do Pb à temperatura ambiente (23-25 °C) produzem espontaneamente clamidósporos que brotam sob forma de pequenas estruturas globosas, em diferentes posições, ao longo do micélio (terminais, septais) [14]. A formação de clamidósporos em cultura é precoce e aumenta com o passar do tempo, principalmente após 14 dias, porém variações bruscas na temperatura (25-32 °C), em curto espaço de tempo (1 a 3 dias) exacerbam a produção destes esporos [10]. Este fato levou alguns pesquisadores [7, 10] a sugerirem que a infecção humana poderia acontecer pela inalação destes propágulos, uma vez que, variações na temperatura são comuns nas áreas endêmicas de Paracoccidioidomicose [15].

O papel dos clamidósporos no desenvolvimento da infecção por Pb não é conhecido, porém análises ultraestruturais demonstraram que eles apresentam um ou mais núcleos, depósitos lipídicos, retículo endoplasmático e mitocôndrias, tais estruturas são indicativo de potencial capacidade de desenvolvimento autônomo e propagação [7]. Os principais estudos da conideogênese do Pb foram realizados em agar [7, 10, 12], observando-se,

contudo, que a aderência do micélio à superfície deste substrato dificulta a separação dos clamidósporos produzidos. Este fato nos levou a procurar um método de cultivo alternativo em meio líquido, o qual permitisse adequado crescimento de hifas livres do meio de cultura e, após indução da produção dos clamidósporos, poder isolá-los e estudá-los mais facilmente.

A metodologia descrita neste trabalho possibilitou produzir, isolar e purificar clamidósporos do Pb e estudar o potencial infectante desta partícula em modelo experimental.

OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos:

1. Padronizar a produção de clamidósporos do *Paracoccidioides brasiliensis* em meio de cultura líquido.
 2. Desenvolver um protocolo de isolamento e purificação de clamidósporos.
 3. Avaliar o potencial infectante dos clamidósporos em modelo experimental murino através de:
 - a. Infecção dos camundongos por via nasal;
 - b. Análise histológica e contagem de unidades formadoras de colônia;
-
-

MATERIAL E MÉTODOS

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho constou de duas fases: *Fase I*: produção, isolamento e purificação dos clamidósporos. *Fase II*: teste de infectividade dos clamidósporos. *Fase I*: Os clamidósporos foram produzidos em meio líquido e uma metodologia de isolamento e purificação foi padronizada, objetivando primordialmente obter partículas menores que 7 µm de diâmetro. *Fase II*: Para testar a infectividade dos clamidósporos isolados, estas partículas foram inoculadas por via nasal em camundongos suíços e o potencial infectante foi avaliado ao longo de 4 semanas. Para tanto, nestes períodos de infecção, os seguintes parâmetros foram utilizados: a) Contagem de unidades formadoras de colônia em pulmão, fígado e baço; b) Estudo histopatológico do pulmão, fígado e baço.

FASE I: Produção, isolamento e purificação de clamidósporos

1. Fungo

Foi utilizada a cepa Bt83, isolada de paciente com Paracoccidioidomicose, e mantida à temperatura ambiente na micoteca do Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Esta cepa foi escolhida dentre outras, pois, em experimento piloto, revelou grande capacidade de produzir clamidósporos.

2. Produção de clamidósporos

O fungo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 100 ml contendo 30 ml de caldo batata dextrose (Difco, USA), suplementado com 1 ml/l de complexo vitamínico [19] e 4 camadas de esferas de vidro com 2 e 4 mm. A cultura foi mantida a temperatura de 25°C e sob agitação constante a 50 rpm, (TE 320, Tecnal, Brasil), para evitar aglomeração das hifas. Para inibir esporulação natural do fungo foram realizados repiques da cultura a cada 14 dias, onde 2 ml da suspensão foram transferidos para um novo frasco de cultura.

Para estimular a produção de clamidósporos, 10 frascos com cultura, recém repicados foram cultivados por outros 14 dias, nas mesmas condições citadas acima, e ao final deste período, incubados à temperatura de 32°C por 36 horas. Decorridas 36 horas de incubação, a produção de clamidósporos foi verificada através de alíquotas, de cada frasco, coradas com Cotton-Blue e analisadas em microscópio de luz. A quantificação dos clamidósporos produzidos em cada frasco foi realizada em câmara hemocitométrica.

3. Isolamento dos clamidósporos

Ocorrendo produção de clamidósporos procedeu-se seu isolamento. Primeiramente, os frascos Erlenmeyer foram submetidos à agitação magnética (400 rpm) por 20 min, para quebrar as hifas em fragmentos menores. A seguir, todo o conteúdo do Erlenmeyer foi transferido para um tubo Falcon de 50 ml e submetido à centrifugação por 30 min a 4000 rpm. O pellet resultante foi ressuspenso em 15 ml de salina estéril contendo 40 mg/L de gentamicina (Sigma, St, Louis, USA) e os clamidósporos foram liberados com o auxílio de

um sonicador (Microson XL2000, Misonix, USA), submetendo a suspensão a pulsos (6 ± 2 pulsos) de 22.5 kHz, com duração de 5 segundos.

4. Purificação dos clamidósporos

Para obtenção de clamidósporos, livres de micélio, seguiu-se a metodologia aplicada por Del *et al.* [20], na purificação de conídeos do Pb. A suspensão contendo clamidósporos livres e fragmentos de micélio (15 ml) foi adicionada sobre 10 ml de um gradiente (v/v) de Percoll[®] (Sigma, St. Louis, USA) 95% (g/ml) em sacarose 0,25 M (densidade $1.162 \pm 0,07$) e centrifugada por 40 min a 4°C e 2500 rpm. O pellet resultante, contendo clamidósporos, foi coletado e lavado 3 vezes em tampão fosfato (PBS) por 20 min a 4°C e 2000 rpm.

A densidade do gradiente de centrifugação foi medida utilizando-se picnômetro. O número total de clamidósporos na suspensão foi determinado com hemocitômetro e a viabilidade dos clamidósporos verificada pela coloração com diacetato de fluoresceína e brometo de etídio [21].

5. Análise morfométrica dos clamidósporos

Alíquotas dos clamidósporos purificados foram preparadas em lâmina-lamínula e coradas com Cotton-Blue. O diâmetro médio dos clamidósporos foi obtido da medida de 200 partículas em 20 campos microscópicos aleatórios. As medidas foram feitas em microscópio de luz (Olympus BX60F5, Japão) acoplado a um sistema de captura de imagens e os campos digitalizados foram analisados no software ImageJ.

FASE II: Teste de infectividade dos clamidósporos.

1. Animais

Trinta e três camundongos machos suíços, com 8 semanas de idade e peso médio de 30g foram utilizados neste estudo. A quantidade de animais por caixa foi restrita a 5, com temperatura (24°C), ciclo de luz (12h) e umidade (55%) controladas. Os camundongos foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, e receberam água e ração *ad libitum*.

O período de eutanásia dos animais após o inóculo foi: 24 horas (n=3), uma semana (n=10), duas semanas (n=10) e quatro semanas (n=10). Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) e recebeu parecer favorável sob n° 771 em 29/10/2009.

2. Infecção intranasal

A inoculação intranasal dos clamidósporos seguiu metodologia utilizada por Defaveri & Graybill [22], com pequenas modificações. Os camundongos foram anestesiados com solução (v/v) de cloridrato de cetamina (50 mg/ml - Ketalar[®], Parke-Davis[®], Brasil) e xilazina (20 mg/ml – Rompum[®], Bayer[®], Brasil), na concentração de 100 µl para cada 100 g de peso corpóreo do camundongo. Quando anestesia profunda foi observada, 1x10⁶ clamidósporos (em 50 µl de inóculo) foram instilados por via intranasal. Para evitar que os animais deixassem de inspirar todo o conteúdo do inóculo, este foi dividido em duas doses de 25 µl, administradas com intervalo de 20 minutos. No momento da instilação o abdômen do camundongo foi pressionado e o inóculo

depositado nas narinas. Quando a pressão foi liberada, o animal inspirou profundamente todo o inóculo.

3. Quantificação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Para avaliar a disseminação e quantificar o número de fungos nos tecidos, o pulmão direito, parte do fígado e metade do baço de cada animal foram removidos, pesados e individualmente macerados em 2 ml de salina estéril. Da solução macerada de cada órgão, 1 ml foi plaqueado em meio de cultura composto de agar BHI, suplementado com 4% de soro de cavalo, 5% de fator de crescimento (sobrenadante de cultura da cepa Pb192) e 40 mg/L de gentamicina [23]. As placas foram seladas e incubadas a temperatura de 37°C. A contagem de UFCs foi realizada diariamente por um período de 20 dias e os resultados foram expressos em UFC por grama de tecido. Todos os órgãos foram plaqueados em duplicata.

4. Histologia

O pulmão esquerdo foi inflado com formol tamponado a 10%, e, juntamente com parte do fígado e metade do baço, mantidos no mesmo fixador por 24h. Este material foi processado pelo método histológico habitual e incluído em parafina. Seções histológicas de 4µm foram coradas pela hematoxilina-eosina (HE) e avaliadas quanto aos seguintes parâmetros: a) padrão da inflamação granulomatosa nos pulmões, fígado e baço; b) intensidade da inflamação em cada órgão, feita através de medida semiquantitativa (porcentagem) da área inflamatória em cada corte histológico.

Coloração de Gomori-Grocott foi realizada para identificação das estruturas fúngicas nos cortes histológicos.

5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software SigmaStat 3.1. O número de UFC/g de tecido foi transformado em unidades logarítmicas e analisado pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por comparação múltipla através do teste de Tukey. O nível de significância adotado para o teste empregado de 5%.

RESULTADOS

FASE I: Produção, Isolamento e Purificação de Clamidósporos

A cepa Bt83 produziu grande quantidade de clamidósporos, em posição intercalar ou terminal, quando cultivada em caldo batata suplementado com complexo vitamínico (Figura 1a). A incubação por 36 horas a 32°C estimulou apenas a formação de clamidósporos, não sendo observados outros tipos de conídeos. O número médio de clamidósporos produzidos em cada frasco de cultura foi $16,1 \times 10^6$ (Tabela 1).

Os procedimentos de agitação magnética e sonicação para isolamento não causaram alterações na parede celular dos clamidósporos, uma vez que estas células mantiveram suas características morfológicas preservadas. Ao final do processo de isolamento, a suspensão resultante apresentou inúmeros clamidósporos livres dos micélios (Figura 1b).

No processo de purificação, o gradiente de Percoll[®] 95% em sacarose 0,25M permitiu recuperação média dos clamidósporos de 80,1%, com variação de 74,4% a 91,3% (Tabela 1). A taxa de contaminação da suspensão com fragmentos de micélio nunca foi maior que 10%, sendo estes fragmentos não viáveis.

Os processos de isolamento e purificação dos clamidósporos foram pouco danosos a estas estruturas, uma vez que a viabilidade média dos clamidósporos recuperados foi de 85 com coeficiente de variação de 7%.

O diâmetro médio dos clamidósporos purificados foi de $6,57 \pm 1,53 \mu\text{m}$.

Em nenhuma fase do processo de obtenção dos clamidósporos observou-se transição clamidósporo-levedura, ou seja, não foram observados os brotamentos característicos das leveduras (Figura 1c).

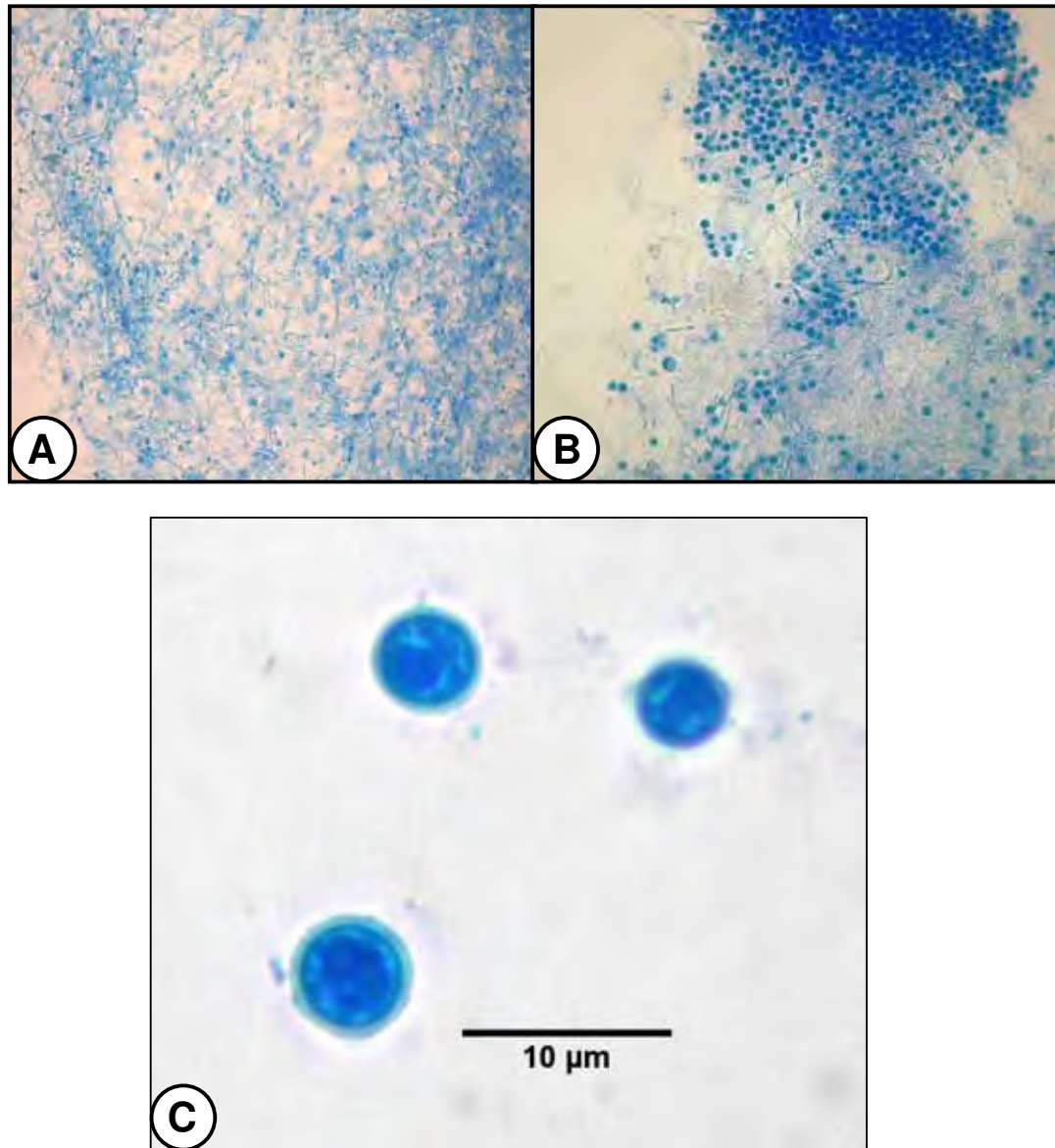


Figura 1: Cronologia do processo de isolamento dos clamidósporos. **(A)** Produção, fase micelial com abundante produção de clamidósporos após 36h de incubação a 32°C (200x); **(B)** Isolamento, suspensão de clamidósporos separados do micélio (400x); **(C)** Purificação, clamidósporos livres de fragmentos miceliais após centrifugação com Percoll a 95% em sacarose 0,25M (1500x). ,

Tabela 1: Produção, purificação, porcentagem de recuperação e viabilidade de clamidósporos em 10 amostras de cultivo do Pb.

Amostra*	Clamidósporos produzidos [#] (x10 ⁶)	Clamidósporos purificados (x10 ⁶)	Recuperação (%)	Viabilidade (%)
1	9	6,7	74,4	85
2	11	9	81,8	92
3	12	9,2	76,7	83
4	14	11,1	79,3	86
5	15	13,7	91,3	90
6	15	12,4	82,7	85
7	17	12,7	74,7	90
8	19	14,2	74,7	88
9	23	20,5	89,9	73
10	26	19,8	76,1	77
Média	16,1	12,9	80,1	85

*Frascos de cultura após incubação de 36h a 32 °C; [#]Por frasco de cultura

FASE II: Infectividade dos Clamidósporos

1. Considerações gerais

Padronizada a obtenção dos clamidósporos, um novo lote de frascos de cultura foi preparado para obtenção da suspensão a ser utilizada para infecção intranasal. Os clamidósporos apresentaram viabilidade de 90% e foram utilizados para infecção no mesmo dia de sua separação, uma vez que demonstraram perda de viabilidade após 24 horas (dados não demonstrados). A contaminação do inóculo com fragmentos de micélio inviáveis foi de 8%.

Os inóculos foram realizados sem dificuldades, e, em todo o período experimental, os animais não apresentaram intercorrências, sempre demonstrando aspecto saudável, com pelagem e ingestão de água e ração normais.

2. Quantificação de fungos

Os valores de UFC em pulmão, fígado e baço nos diferentes períodos de estudo estão expressos na Tabela 2.

Todos os camundongos apresentaram cultura pulmonar positiva, e o número de UFC nos pulmões diminuiu significativamente ao longo dos períodos estudados ($p < 0,001$) (Figura 2). No grupo eutanasiado após 24 horas, não observou-se disseminação extrapulmonar.

Disseminação para baço e fígado foi observada no decorrer da 1ª até a 4ª semana de infecção (Tabela 2). Nestes períodos, 100% dos animais tiveram cultura positiva de baço e 83,3% de fígado. Similarmente ao pulmão, a infecção

nestes órgãos regrediu significativamente ao longo das semanas pós-infecção (Figura 2).

Apenas na 2ª semana de infecção, a recuperação de fungos no pulmão foi significativamente maior do que no baço ($p < 0,05$), enquanto que, no fígado a recuperação foi significativamente menor que nos pulmões e baço em todos os períodos ($p < 0,05$).

Tabela 2: Unidades formadoras de colônia por grama de tecido (LogUFC/g) nos diferentes órgãos e períodos pós-infecção intranasal de camundongos com 1×10^6 clamidósporos.

Períodos pós-infecção	n° animais	LogUFC/g		
		Pulmão	Baço	Fígado
24h	3	4,8 (4,7 – 4,9)	0	0
S1	10	4,3 (4,1 – 4,4) _{a,d}	3,3 (3,0 – 3,5) _{a,d}	1,7 (1,5 – 2,0) _{a,e}
S2	10	3,7 (3,5 – 3,8) _{a,d}	2,8 (2,4 – 2,8) _{b,e}	1,5 (1,0 – 1,9) _{a,f}
S4	10	2,6 (2,4 – 2,8) _{b,d}	2,2 (2,0 – 2,5) _{c,d}	1,3 (0,8 – 1,5) _{b,e}

h, horas; S1, 1ª semana; S2, 2ª semana; S4, 4ª semana

Valores expressos em Mediana ($P_{25} - P_{75}$); Teste de Kruskal-Wallis:

a,b,c: representam diferenças entre períodos

d,e,f: representam diferenças entre órgãos

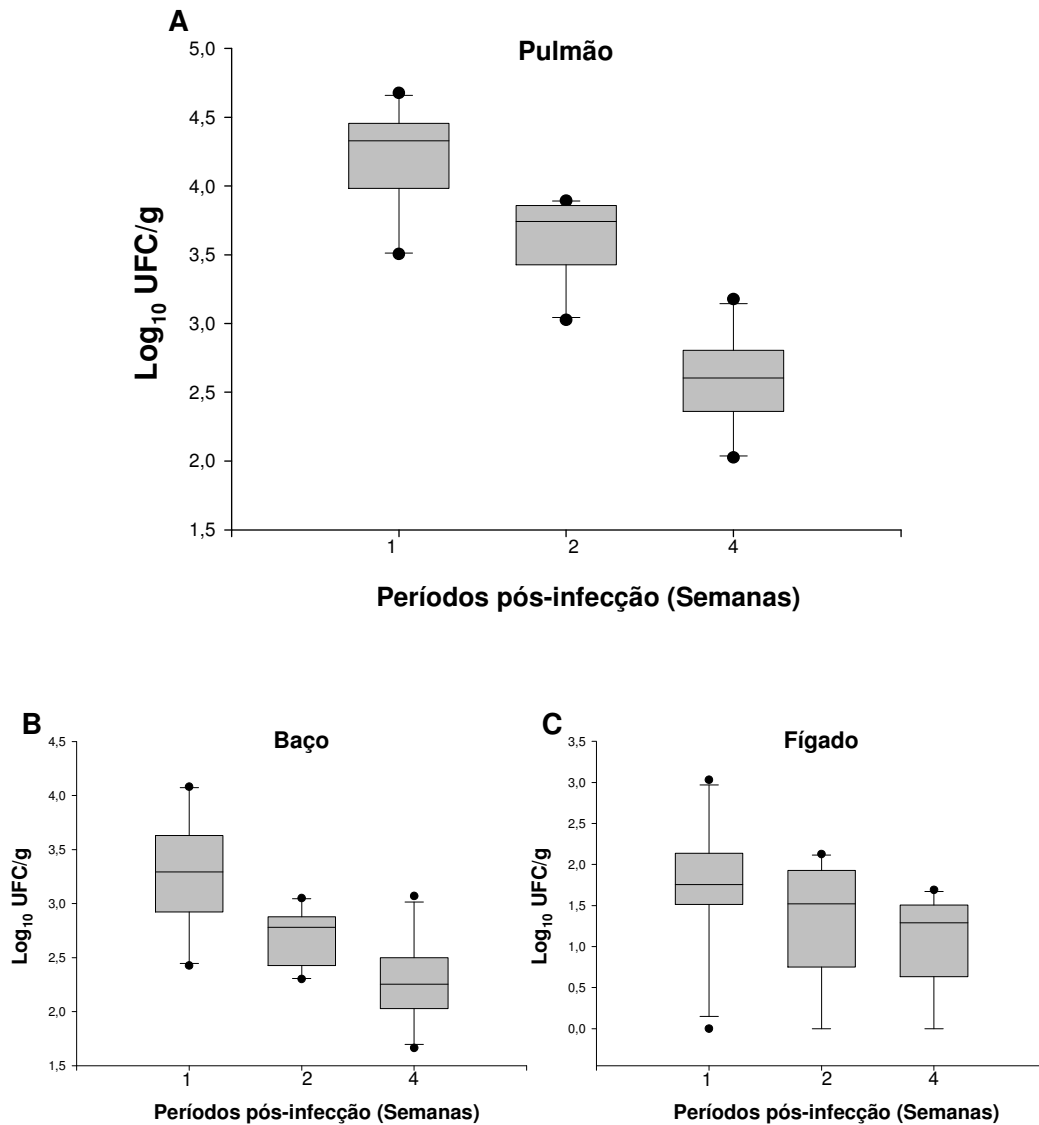


Figura 2: *Box plot* do processo infeccioso em camundongos inoculados por via intranasal com 1×10^6 clamidósporos. UFC/g de tecido expressa em Log_{10} . Cada *box* representa os valores 25-75% com mediana expressa na linha interna; a barra de erros representa os valores 10% e 90% e os círculos correspondem aos *outliers*. S1=1ª semana, S2=2ª semana e S4=4ª semana. Estatística: **(A)** Pulmão, S1=S2>S4, $p < 0,001$; **(B)** Baço, S1>S2>S4, $p < 0,001$; e **(C)** Fígado, S2=S1>S4, $p < 0,05$.

3. Análise Histopatológica

◆ Pulmões

Morfologicamente, após 24h, nos 3 animais estudados havia múltiplos focos broncopneumônicos associados aos fungos (Figura 3). Muitos bronquíolos e alvéolos correspondentes estavam preenchidos por inúmeras leveduras, por vezes com exoesporulação (Figura 4) associados a intenso exsudato neutrofílico (Figura 3).

Na 1ª semana, 100% dos animais estudados apresentavam pneumonite específica, acometendo em média 70% do parênquima amostrado no corte histológico. A inflamação neste período caracterizava-se por pequenos granulomas epitelióides frouxos ou em organização (Figura 5), presentes em alvéolos justa-broquiolares, ou difusos no parênquima pulmonar, conferindo padrão miliar à infecção; os granulomas acometiam pequenos grupos de alvéolos, e continham poucos fungos e neutrófilos (Figura 5). Além dos granulomas, observaram-se, nos alvéolos adjacentes aos focos granulomatosos, acúmulos de macrófagos isolados ou formando pequenos granulomas, por vezes com Pb fagocitado (Figura 6), caracterizando o aspecto de “alveolite macrofágica” [24].

Com 2 semanas, 90% dos animais apresentavam pneumonite específica, acometendo em média 30% do parênquima amostrado no corte histológico. Os granulomas eram epitelióides, em diferentes fases de formação e organização (Figura 7), contendo maior número de fungos (Figura 8) e de linfócitos que no período precedente. O padrão miliar ainda estava presente. A alveolite macrofágica ainda era conspícua, porém em menor intensidade.

Na 4ª semana de infecção, 90% dos animais apresentaram pneumonite específica. O processo inflamatório era bem menos intenso, acometendo em média apenas 1% do parênquima amostrado no corte histológico. Observaram-se apenas pequenos granulomas esparsos em resolução (Figura 9), comprometendo poucos alvéolos, contendo raros fungos íntegros ou em fragmentação (Figuras 9 e 10). A presença de neutrófilos e linfócitos foi menor, sendo o infiltrado linfóide praticamente restrito à mucosa bronquial.

- ◆ **Baço:** No baço foram encontradas lesões na 1ª (100%), 2ª (70%) e 4ª (70%) semanas de infecção. Entretanto, os granulomas eram inconspícuos, de difícil visualização, sendo as lesões identificadas praticamente pela presença do fungo (Figura 11)

 - ◆ **Fígado:** No fígado foram encontrados lesões na 1ª (100%), 2ª (90%) e 4ª (50%) semanas de infecção. As lesões eram esparsas e caracterizadas por granulomas epitelióides pequenos, por vezes contendo fungos (Figura 12).
-
-

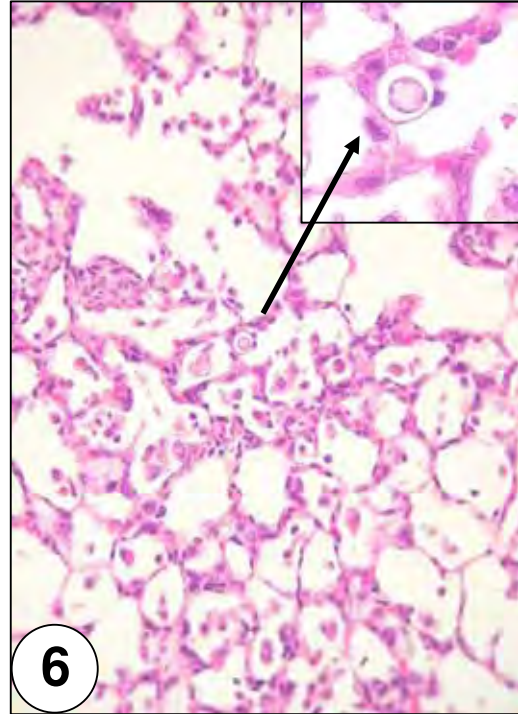
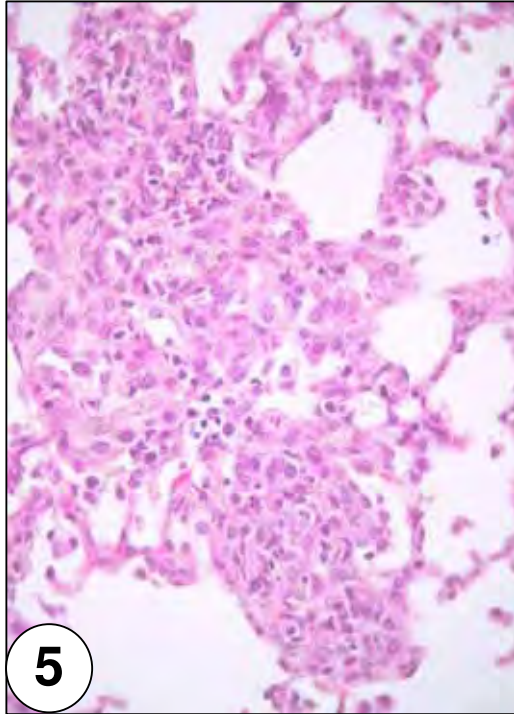
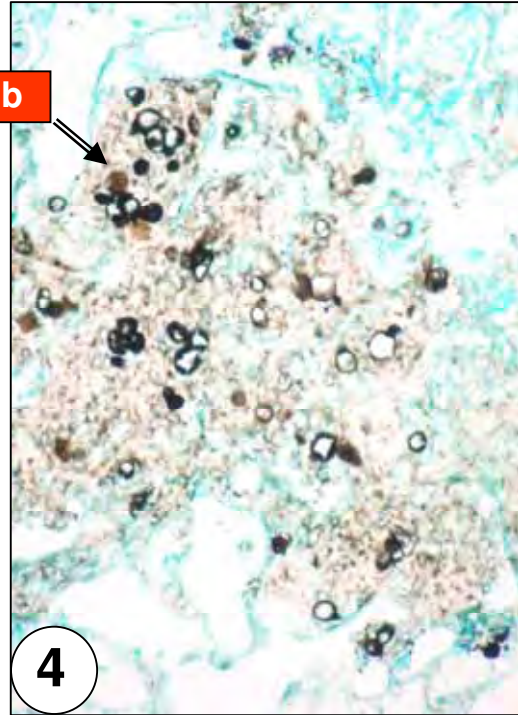
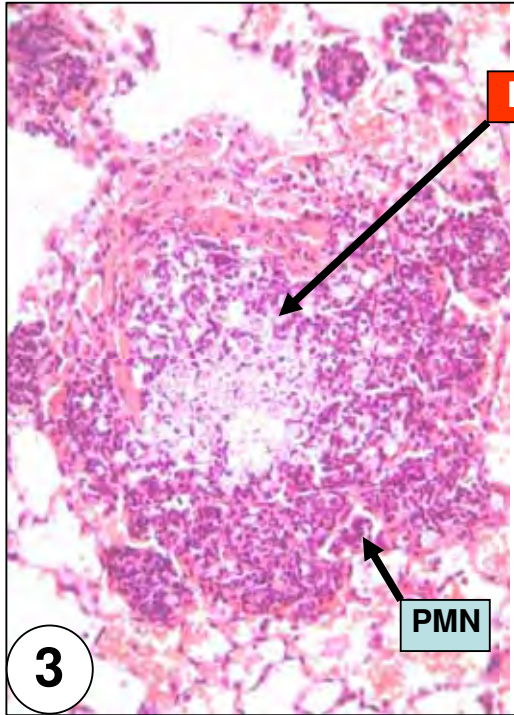
LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 3 (24h): Foco broncopneumônico com grande quantidade de Pb centralmente, margeados por intenso exsudato neutrofílico (PMN) (HE - Aumento original 400x).

Figura 4 (24h): Coloração por Gomori-Grocott da Figura 3 realçando a presença de Pb no foco pneumônico. Levedura em multiesporulação (seta)(Aumento original 400 x).

Figura 5 (1ª Semana): Granulomas epitelióides preenchendo poucos alvéolos, com escassos neutrófilos e linfócitos de permeio. (HE - Aumento original 400x).

Figura 6 (1ª Semana): Alveolite macrofágica. Os alvéolos são preenchidos parcialmente por pequenos agregados de macrófagos ou macrófagos isolados, por vezes com fungos fagocitados (quadrado em destaque. Aumento 600x), (HE - Aumento original 400x).



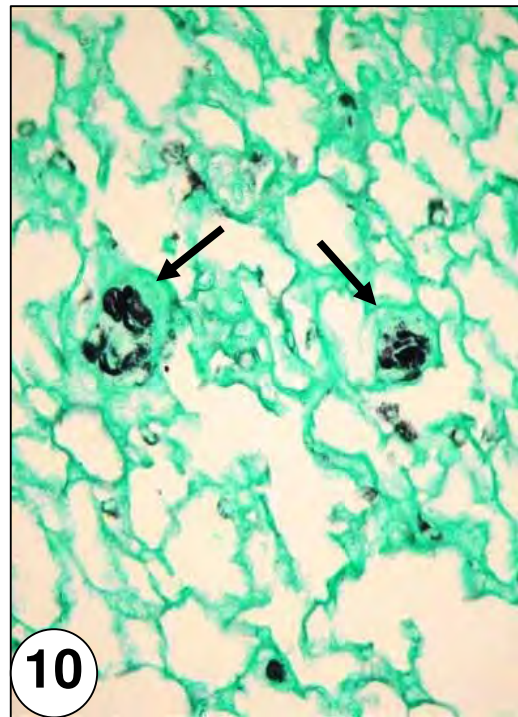
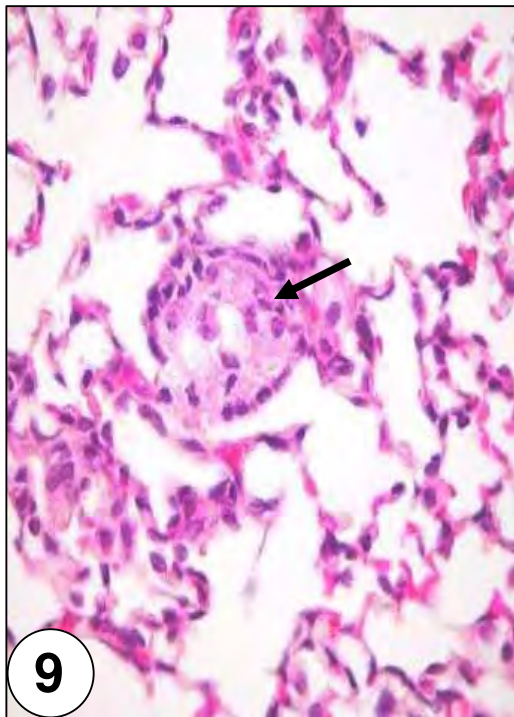
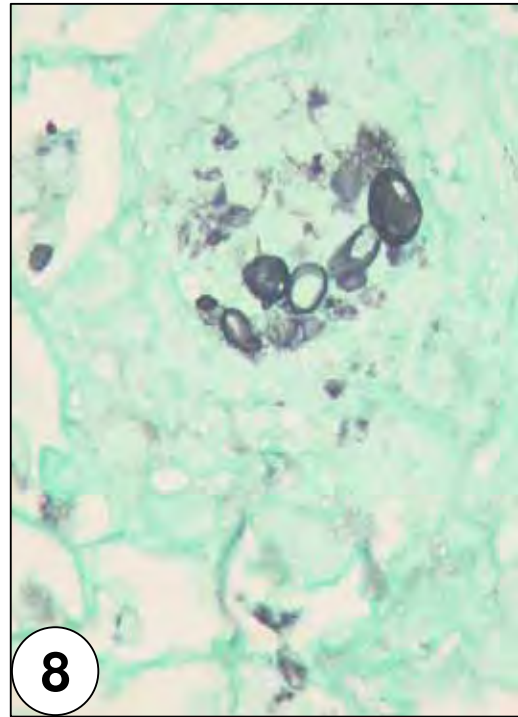
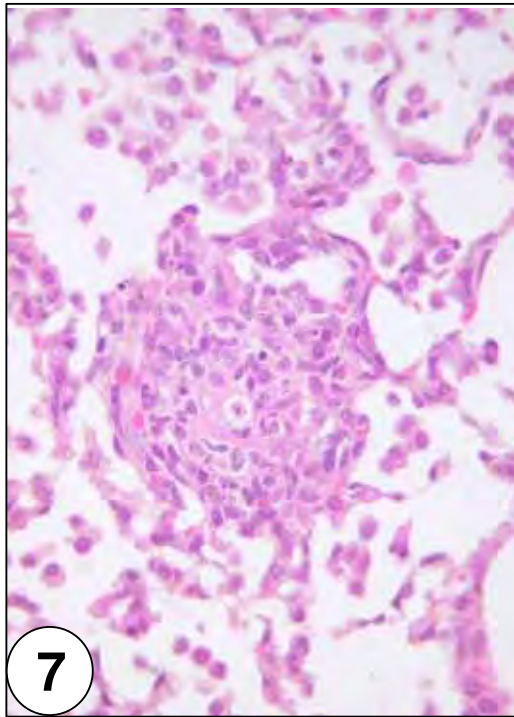
LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 7 (2ª Semana): Granuloma epitelióide pequeno, compacto e bem demarcado, contendo fungo no seu interior (HE - Aumento original 400x).

Figura 8 (2ª Semana): Granuloma corado por Gomori-Grocott demonstrando várias leveduras no seu interior (HE - Aumento original 400x).

Figura 9 (4ª Semana): Micro granuloma de aspecto regressivo, aparentemente contendo restos de levedura no seu interior (seta) (HE - Aumento original 400x).

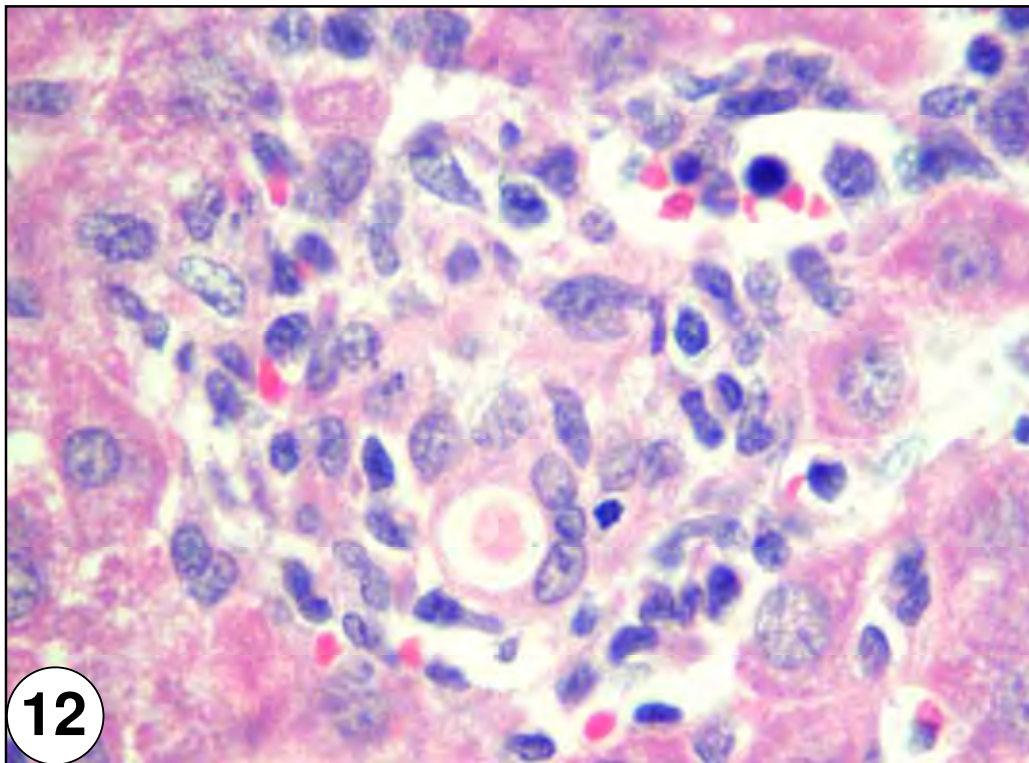
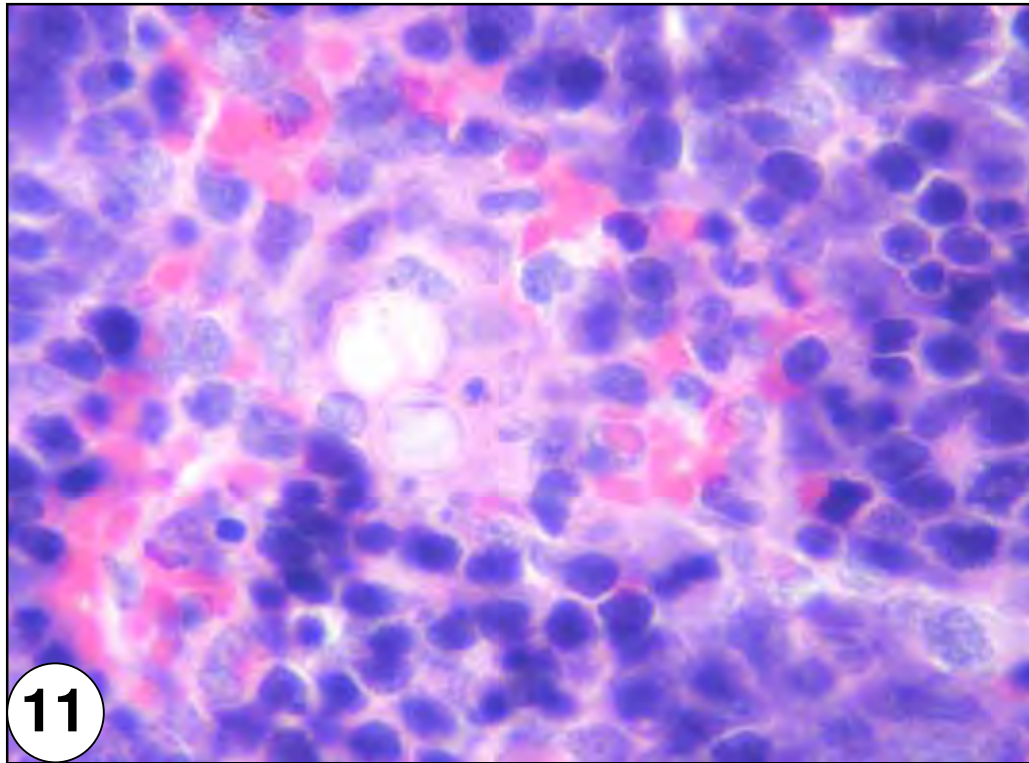
Figura 10 (4ª Semana): Granuloma corado por Gomori-Grocott demonstrando fungos fragmentados (setas) (Gomori-Grocott - Aumento original 400 x).



LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 11 (1ª Semana): BAÇO - Micro granuloma envolvendo levedura. As margens do granuloma se confundem com o parênquima esplênico (HE - Aumento original 400x).

Figura 12 (1ª Semana): FÍGADO – Pequeno granuloma epitelióide, observando levedura fagocitada por célula gigante (HE - Aumento original 400x).



4. Correlação dos parâmetros estudados nos diferentes períodos de infecção

Tabela 3: Correlação entre os parâmetros analisados em pulmão, fígado e baço de animais infectados por via intranasal com 1×10^6 clamidósporos do Pb e estudados nos períodos de 24h, 1, 2, 3 semanas de infecção

Períodos de estudo	INFLAMAÇÃO						
	PADRÃO		ÁREA (% DO FRAGMENTO)		UFC ³		
	Pulmão	Fígado / Baço	Pulmão	Fígado/Baço	Pulmão	Fígado	Baço
24 h	Focos broncopneumonia Predomínio de neutrófilos	-	40	NR ²	4,8	0	0
S1 ¹	Granuloma miliar frouxo Alveolite macrofágica Linfócitos discreto	Granulomas pequenos esparso	70	NR	4,3	1,7	3,3
S2	Granuloma miliar compacto Alveolite macrofágica Linfócitos moderado	Granulomas pequenos esparso	30	NR	3,7	1,5	2,8
S4	Granuloma diminuto esparso Lesões regressivas Acúmulo linfóide peribrônquico	Granulomas diminutos esparso	1	NR	2,6	1,3	2,2

¹S = semana; ²NR = não realizado; ³UFC = Unidades Formadoras de Colônias/g de tecido. Os valores expressam a mediana dos logaritmos das UFC em cada órgão e período. Animais por período: 24h (n=3); S1, S2 e S4 (n=10).

DISCUSSÃO

No presente trabalho objetivamos padronizar a produção, o isolamento e a purificação de clamidósporos do Pb, e estudar o poder infectante destas partículas em modelo experimental murino. Motivou-nos este estudo trabalhos sugerindo que clamidósporos do Pb podem ser considerados propágulos infectantes da PCM [5, 7] e, também, não haver na literatura trabalho relatando o isolamento de clamidósporos do Pb e o conseqüente estudo do seu potencial infectante.

A produção de clamidósporos por fungos filamentosos ocorre em resposta a fatores deletérios como escassez de nutrientes, variações de temperatura e oxigenação [24]. Portanto, ao estudar *in vitro* as características do crescimento fúngico, deve-se considerar três condições ou fatores importantes: a) O meio de cultura (sólido, semi-sólido, ou líquido); b) A composição do meio de cultura (rico ou pobre em nutrientes) e c) As condições ambientais adequadas para o crescimento ou desenvolvimento do microrganismo em estudo.

Em geral, para a produção *in vitro* de clamidósporos, por diferentes fungos, tem-se utilizado meio de cultura sólido, agar [5, 7, 25-27]. Neste meio, as hifas em crescimento aderem-se firmemente à superfície ou penetram no agar, e, por conseguinte os clamidósporos produzidos também ficam imersos no agar. Ao tentar separar hifas e clamidósporos, verificamos que este substrato dificulta a separação, por ficar muito aderido ao fungo. O mesmo problema permaneceu quando cultivamos o Pb em meio semi-sólido (agar-água), como utilizado por Restrepo *et al.* [11] para o isolamento de artroconídeos do Pb. Assim, passamos a utilizar meio de cultura líquido (caldo

batata) para cultura do Pb, com resultados muito satisfatórios, ou seja, grande produção de clamidósporos e facilidade em isolá-los.

Outro fator importante, considerado no presente trabalho, para a produção de clamidósporos foi o acréscimo de nutrientes ao meio de cultura. É descrito que em meios de cultura ricos em nutrientes a formação de clamidósporos é detectada ao longo do processo de crescimento micelial [6], principalmente após duas semanas de cultivo, enquanto que, sob privação de nutrientes este processo inicia-se de maneira precoce após 7 dias de cultivo [7]. Ambas as condições de cultivo resultam na formação anacrônica de clamidósporos com tamanhos variando de 3 a 20 μm [5-7, 28]. Assim como nos meios enriquecidos, o caldo batata enriquecido, não estimulou a produção de clamidósporos durante os 14 dias de cultura a 25 °C. Entretanto após incubação a 32 °C por 36h, observou-se abundante formação destes propágulos, em média, menores que 7 μm . A presença de nutrientes e o crescimento ativo das hifas durante o período de cultura sugerem que o único fator de estresse capaz de justificar a esporogênese foi à elevação de temperatura.

Para liberação dos clamidósporos utilizamos o estresse mecânico por agitação magnética e pulsos de ultra-som. Sabe-se que, no ambiente saprofítico, a liberação dos clamidósporos produzidos por diferentes espécies fúngicas ocorre via ruptura da membrana celular ou fragmentação mecânica das hifas, induzida por enzimas líticas, choques ou intempéries [29]. O estresse mecânico utilizado no presente trabalho, embora artificial, assemelha-se à fragmentação mecânica que as hifas de Pb podem sofrer quando presentes no solo. Dias *et al.* [30] demonstrou que a utilização de ultra-som pode produzir lesões e conseqüente perda de viabilidade em leveduras de Pb. Contudo, em

nosso estudo, este procedimento pouco afetou a viabilidade dos clamidósporos, uma vez que a viabilidade média, das partículas obtidas, foi de 85%. A quebra do micélio em pequenos fragmentos não viáveis e a ausência de alterações na morfologia dos clamidósporos são indícios de que estas estruturas apresentam resistência a condições adversas.

Um problema inesperado no processo de padronização para obtenção dos clamidósporos foi obter a cepa adequada do Pb que produzisse grande quantidade de clamidósporos. Após várias tentativas, com diferentes cepas, a que melhor produziu clamidósporos foi à cepa Bt83. É interessante registrar que esta cepa mostrou-se altamente virulenta, em trabalho experimental no qual a infecção foi induzida por leveduras [31].

Para purificação dos clamidósporos aplicamos a técnica descrita por Del *et al.* [20] que possibilitou a obtenção de elevado número destes conídeos, com mínima contaminação por fragmentos miceliais. Estas partículas demonstraram ser menos densas que o gradiente de Percoll a 95%, permitindo estimar sua densidade inferior a $1.162 \pm 0,07$. É necessário destacar que testamos outros métodos para purificação dos clamidósporos, como o recomendado por Fabry *et al.* [25] e Vidotto *et al.* [32] para *Candida albicans*, porém nenhuma destas técnicas provou ser satisfatória ao propósito deste estudo.

Para determinar seu potencial infectante, os clamidósporos purificados foram inoculados em camundongos suíços por via intranasal. Esta linhagem de camundongos é proveniente do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu e sendo utilizada há anos por vários pesquisadores no estudo da PCM. Em trabalhos no qual infectamos, com leveduras, estes camundongos por via intratraqueal [33-35], verificamos que esta linhagem de camundongos é

resistente ao Pb e a infecção pulmonar cursa com pouca disseminação sistêmica. Assim, julgamos que a utilização destes animais seria adequada para testar a infectividade dos clamidósporos.

A via intranasal foi utilizada por simular a via inalatória de infecção da PCM no homem. Para utilizar esta via é importante obter partículas com diâmetro máximo de 7 μm , que possibilitam atingir os alvéolos e, assim, estabelecer a infecção. Partículas maiores tendem a ficar retidas nas vias aéreas superiores, brônquios e bronquíolos. De fato, os clamidósporos purificados tinham em média 7 μm de diâmetro, e uma grande porcentagem do inóculo chegou aos bronquíolos respiratórios e alvéolos, como observado nos animais estudados 24 h após infecção.

A infecção intranasal foi utilizada por vários pesquisadores no estudo da PCM experimental, e tenta reproduzir a provável via de infecção paracoccidiodomicótica no homem [36]. Em experimento semelhante ao presente estudo, McEwen *et al.* [12] inocularam artroconídeos, por via intranasal, em camundongos BALB/c e observaram infecção pulmonar qualitativamente semelhante, porém de maior intensidade que o observado neste trabalho. Os autores demonstraram que os artroconídeos têm poder infectante, com formação de inflamação granulomatosas e fibrose [37]. Neste trabalho, o processo inflamatório inicial envolve principalmente macrófagos e células polimorfonucleares, padrão inflamatório similar ao desencadeado pelos clamidósporos após deposição no parênquima pulmonar.

A disseminação extrapulmonar é rara em modelos de PCM experimental inoculados por via intranasal [36]. Bedoya, *et al.* [38], utilizando leveduras como inóculo, verificaram disseminação, em baixa intensidade, para fígado, rins,

baço e linfonodos, na primeira semana de infecção, enquanto que McEwen *et al.* [12] utilizando artroconídeos como inóculo, observou disseminação para baço e fígado após 4 e 12 semanas respectivamente. Em contraste a estes estudos, nossos resultados demonstraram o envolvimento precoce de baço e fígado. A disseminação para estes órgãos foi precoce (1^a. semana de infecção) e intensa sugerindo que os clamidósporos possuem propriedades que facilitam ou exacerbam sua disseminação linfo-hematogênica. Trabalhos posteriores devem ser realizados para se conhecer os aspectos envolvidos nas fases iniciais da infecção e os fatores determinantes da disseminação precoce deste conídeos.

A pequena contaminação do inóculo com fragmentos miceliais, aparentemente não influenciou no desenvolvimento da infecção, uma vez que estas estruturas não foram detectadas no parênquima pulmonar dos animais eutanasiados 24h pós-infecção.

Histopatologicamente, o processo inflamatório pulmonar inicial, com 24h, se caracterizou por múltiplos focos broncopneumônicos, mal delimitados, contendo muitas leveduras e neutrófilos. Não foram observadas hifas e os fungos eram grandes, alguns em aparente gemulação. Estes aspectos sugerem que a transformação dos clamidósporos em leveduras tenha ocorrido em período menor que 24h. Estes dados são semelhantes aos de McEwen *et al.* [12], que observaram a transformação dos artroconídeos em leveduras, 18h pós-infecção intranasal. Na 1^a e 2^a semanas de infecção dois padrões inflamatórios foram observados: granulomas e alveolite macrofágica. Os granulomas eram pequenos, em diferentes fases de organização e distribuídos difusamente pelo pulmão em padrão miliar. Este padrão pode ser indicativo de

disseminação hematogênica do fungo, oriundos de focos pulmonares ou extrapulmonares (como baço e fígado). Na 2ª semana de infecção os granulomas eram mais circunscritos e compactos, contendo mais células epitelióides, poucos linfócitos na periferia e fungos no seu interior em maior número que na 1ª semana. Este aspecto pode estar relacionado à presença de imunidade celular, como demonstrado em trabalhos prévios [34, 39]. O padrão inflamatório tipo alveolite macrofágica, que foi mais intenso na 2ª semana de infecção foi descrito por Defaveri *et al.* [33], em pulmões de camundongos infectados com leveduras do Pb. Em trabalho posterior [34], os mesmos autores, demonstraram que este padrão inflamatório é expressão da resposta de hipersensibilidade retardada pulmonar frente ao fungo e seu antígenos, constituindo-se em mecanismo local de defesa. Este quadro foi denominado de pneumonite de hipersensibilidade.

A infecção foi decrescente, tendendo à resolução, como demonstrado pela grande diminuição do processo inflamatório, caracterizado por micro granulomas esparsos no pulmão, raros no fígado e não visualizados no baço. Corroborando estes achados, o número de fungos recuperados em cada órgão diminuiu significativamente na 4ª semana de infecção. Estes dados reforçam a constatação por trabalhos prévios [33-35, 40] que os camundongos suíços utilizados neste experimento são bastante resistentes à infecção pelo Pb.

Conhecer o papel exercido por este conídeo é de grande importância para o entendimento da ecologia e epidemiologia do Pb. Análises ultraestruturais reforçam a hipótese de que estas partículas podem ser infectantes, uma vez que, a presença de um ou mais núcleos e numerosas mitocôndrias são indicativos de potencial para desenvolvimento autônomo [7].

Neste trabalho nós demonstramos que os clamidósporos do Pb podem ser facilmente produzidos e isolados quando cultivados em caldo batata enriquecido. Estes conídeos são altamente infectantes e se disseminam precocemente depois de inoculados. Considerando as condições *in vitro*, relativamente simples, de produção e isolamento e as condições ambientais observadas em nossa região endêmica de PCM, como grande umidade e aumentos bruscos na temperatura [13], julgamos que os clamidósporos devem desempenhar um importante papel na infecção e desenvolvimento da Paracoccidiodomicose no homem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lacaz CS. *Paracoccidioides brasiliensis: morphology, evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994: 13-25.
 2. Restrepo A. A reappraisal of the microscopical appearance of the mycelial phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 1970; 8(2): 141-4.
 3. Carbonell LM, Rodriguez J. Transformation of Mycelial and Yeast Forms of *Paracoccidioides Brasiliensis* in Cultures and in Experimental Inoculations. *J Bacteriol* 1965; 90: 504-10.
 4. Carbonell LM. Ultrastructure of dimorphic transformation in *paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 1969; 100(2): 1076-82.
 5. Miyaji M, Sano A, Sharmin S, Kamei K, Nishimura K. The role of chlamydospores of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2003; 44(2): 133-8.
 6. San-Blas F. Ultrastructure of spore formation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1986; 24(3): 203-10.
 7. Franco M, Sano A, Kera K, *et al*. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1989; 31(3): 151-7.
 8. Bustamante-Simon B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M, Restrepo-Moreno A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 1985; 23(6): 407-14.
 9. Restrepo BI, McEwen JG, Salazar ME, Restrepo A. Morphological development of the conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *J Med Vet Mycol* 1986; 24(4): 337-9.
 10. Queiroz-Telles F. *Paracoccidioides brasiliensis Ultrastructural Findings*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994: 27-47.
 11. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Patino MM. A technique to collect and dislodge conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *J Med Vet Mycol* 1986; 24(3): 247-50.
-
-

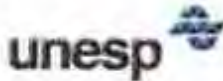
12. McEwen JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 1987; 25(3): 165-75.
 13. Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, *et al.* Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *Int J Epidemiol* 2009; 38(6): 1642-9.
 14. Ramos-e-Silva M, Saraiva LdES. Paracoccidioidomycosis. *Dermatologic Clinics* 2008; 26(2): 257-269.
 15. Ferreira MS. Paracoccidioidomycosis. *Paediatric Respiratory Reviews* 2009; 10(4): 161-165.
 16. Sorensen KN, Clemons KV, Steven DA. Murine models of blastomycosis, coccidioidomycosis, and histoplasmosis. *Mycopathologia* 1999; 146: 53-65.
 17. Blotta M, Mamoni R, Oliveira S, *et al.* Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(3): 390-394.
 18. Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 2001; 39(3): 233-41.
 19. Restrepo A, Jimenez BE. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol* 1980; 12(2): 279-81.
 20. Del PJM, Restrepo A, Garcia LF, Cano LE. Separation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia through Percoll gradients. *Medical Mycology* 2004; 42(4): 349-53.
 21. Calich VLG, Purchio A, Paula CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia* 1979; 66(3): 175-177.
 22. Defaveri J, Graybill JR. Immunohistopathology of murine pulmonary histoplasmosis during normal and hypersensitive conditions. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144(6): 1366-72.
 23. Castaneda E, Brummer E, Perlman AM, McEwen JG, Stevens DA. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. *J Med Vet Mycol* 1988; 26(6): 351-8.
 24. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 2010; 36(1): 1-53.
-

25. Fabry W, Schmid EN, Schraps M, Ansorg R. Isolation and purification of chlamyospores of *Candida albicans*. *Medical Mycology* 2003; 41(1): 53-58.
 26. Lin X, Heitman J. Chlamyospore Formation during Hyphal Growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 2005; 4(10): 1746-1754.
 27. Staib F, Arasteh K. Chlamyospore formation on Staib agar. Observations made before *Candida dubliniensis* was described. *Mycoses* 2001; 44(1-2): 23-7.
 28. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6(2): 89-117.
 29. Elliot MA, Talbot NJ. Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7(6): 594-601.
 30. Dias MF, Mesquita J, Rodrigues N, Filgueira AL, De Souza W. Viability of yeast form cells of *Paracoccidioides brasiliensis* after sonication. *Med Mycol* 2004; 42(1): 43-9.
 31. Kurokawa CS, Lopes CR, Sugizaki MF, *et al.* Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2005; 47(5): 257-62.
 32. Vidotto V, Bruatto M, Gallo MG. Simple method for separating the chlamydoconidia of *Candida albicans* from its mycelium. *Mycopathologia* 1988; 103(1): 29-33.
 33. Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Franco MF. Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in mice: morphology and correlation of lesions with humoral and cellular immune response. *Mycopathologia* 1982; 77(1): 3-11.
 34. Defaveri J, Coelho KI, Rezkallah-Iwasso MT, Franco M. Hypersensitivity pneumonitis to *Paracoccidioides brasiliensis* antigens in mice. *J Med Vet Mycol* 1989; 27(2): 93-104.
 35. Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Franco MF. Pulmonary paracoccidioidomycosis in immunized mice. *Mycopathologia* 1992; 119(1): 1-9.
 36. Coelho KI, Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Peracoli MTS. *Experimental Paracoccidioidomycosis*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994: 87-102.
-

-
-
37. Naranjo TW, Lopera DE, Diaz-Granados LR, *et al.* Histopathologic and immunologic effects of the itraconazole treatment in a murine model of chronic pulmonary paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* 2010; 12(14-15): 1153-62.
 38. Bedoya V, McEwen JG, Tabares AM, Jaramillo FU, Restrepo A. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a histopathological study of the experimental murine infection. *Mycopathologia* 1986; 94(3): 133-44.
 39. Defaveri J, Tamanini J, Tonolli L, Franco M. Skin and pulmonary models using coated bentonite particles for the study of the inflammation evoked by *Paracoccidioides brasiliensis* antigens in previously immunized mice. *Sabouraudia* 1984; 22(6): 477-86.
 40. Defaveri J, Martin LC, Franco M. Histological and ultrastructural study of the inflammation evoked by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in previously immunized mice. *Mycopathologia* 1989; 105(1): 53-8.
-
-

ANEXO





Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Júnior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (Doc14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

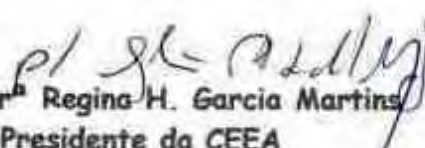


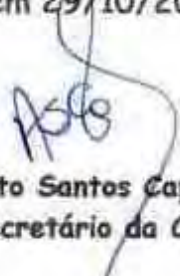
Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 771 sobre o projeto de pesquisa "Clamidósporos do paracoccidioides brasiliensis: Isolamento e estudo da infectividade em modelo experimental murino", que será conduzido por Igor Otávio Minatel, orientado pela Prof^a Dr^a Denise Fécchio, com a participação do Prof. Dr. Júlio Defaveri, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "camundongo", são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a sanidade dos mesmo.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 29/10/2009.


Prof^a Dr^a Regina H. Garcia Martins
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA