

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Gabriel Capella Machado**

**Espécies crípticas em *Paracoccidioides brasiliensis*:  
Diferenciação antigênica e de resposta a fatores estressantes.**

**Orientador:** Prof. Dr. Eduardo Bagagli

Departamento de Microbiologia e Imunologia - IBB - UNESP

Botucatu

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Gabriel Capella Machado**

**Espécies crípticas em *Paracoccidioides brasiliensis*:  
Diferenciação antigênica e de resposta a fatores estressantes.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas, AC: Genética como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Eduardo Bagagli

Departamento de Microbiologia e Imunologia - IBB - UNESP

Botucatu

2011

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

Machado, Gabriel Capella.

Espécies crípticas em *Paracoccidoides brasiliensis* : diferenciação antigênica e de resposta a fatores estressantes / Gabriel Capella Machado. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Eduardo Bagagli

Capes: 20202008

1. Genética. 2. *Paracoccidoides brasiliensis*. 3. Sorologia.

Palavras-chave: Agentes estressantes; Espécies crípticas; *Paracoccidoides brasiliensis*; Sorologia.

Aos meus pais, Aguinaldo e Suzete, por todo amor, carinho e cuidado a mim dispensados. Por todo esforço que fizeram para que eu chegasse até aqui, este trabalho é tão meu quanto deles.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Bagagli pela acolhida e confiança em mim depositada. Por sempre valorizar cada progresso, cada resultado, cada ideia nova, cada passo dado. Pelo estímulo e ajuda nos momentos difíceis e por cada ensinamento passado.

À minha família. Ao meu irmão Victor, às minhas avós Mavil e Theresa, ao meu avô Aguinaldo, à minha tia Sirlene e Nair, aos meus tios José e Humberto, às minhas primas Luísa e Luiza. Por todo amor, por todos os bons momentos, pelos valores transmitidos. Em especial ao meu avô José por assistir orgulhoso meus passos de onde quer que esteja.

À minha namorada, Yasmin, pelo seu amor, pelo carinho, pelos momentos especiais e únicos vividos. Por ter sido meu porto seguro em Botucatu nos momentos mais difíceis e minha alegria nos mais felizes.

À Dra. Raquel Cordeiro Theodoro, ao Severino Assis da Graça Macoris, à Prof. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco e ao Marcus de Mello Teixeira pela amizade e pelas inúmeras ideias, ensinamentos, sugestões e lições que sempre foram bem recebidas e estão guardadas.

Ao Thales Domingos Arantes, pela amizade, apoio e a valiosa ajuda nas imunodifusões realizadas.

Aos outros amigos de laboratório Tâmara, Ariane, Juliana Rizzo, Juliana Giacobino, Tarsila, Mariana, Virgínia e Sandra Olbrich pela grande amizade criada, pelos momentos de descontração e por fazerem do nosso laboratório um ambiente produtivo, fácil de trabalhar, sem intrigas e invejas.

Aos meus amigos de república Raphael, Bruno, Vinícius, Alexandre, João Augusto, Felipe, Iberê, Paulo, Lucas, Guilherme, Anderson e Victor pela grande amizade, por todos os bons momentos, pelo apoio nos momentos ruins e pelos ensinamentos que a convivência podem proporcionar.

Aos meus amigos Henrique, Natália, Ivelise e Mariana pela amizade essencial. Mesmo sem o mesmo contato da época de graduação, sei que posso sempre contar com todos.

Ao Dr. Rinaldo Pôncio Mendes por ceder os soros da região de Botucatu utilizados neste trabalho e por disponibilizar a estrutura de seu laboratório para realizar as imunodifusões.

À Dra. Daniela Moris de Oliveira pelo auxílio na realização e interpretação das imunodifusões.

À Dra. Adriana Pardini Vicentini e à sua aluna Luciana Franciscone pela disponibilidade, por ceder os soros da Região Centro-Oeste utilizados neste trabalho e realização de imunodifusões.

À Prof. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini e à suas alunas Julhiany Silva e Roberta Peres por cederem alguns protocolos e sugestões.

À Prof. Dra. Luzia Aparecida Trinca pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelo auxílio prestado quando necessário.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

Resumo.....	6
Abstract.....	8
1. Introdução.....	10
1.1 O fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e a paracoccidioidomicose.....	10
1.2 Variabilidade genética e espécies crípticas em <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ..	12
1.3 Variação antigênica e seus significados no diagnóstico sorológico.....	14
1.4 Variabilidade em <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> em relação a outros fatores....	16
1.4.1 Fatores estressantes.....	17
2. Objetivos.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. Materiais e Métodos.....	20
3.1 Isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	20
3.2 Produção de antígenos.....	20
3.2.1 Preparo de antígeno somático.....	20
3.2.2 Preparo de antígeno filtrado de cultura.....	22
3.2.3 SDS-PAGE.....	22
3.2.4 Testes de Imunodifusão .....	23
3.3 Análise da relação dS/dN para o exon 2 da <i>PbGP43</i> .....	24
3.4 Testes de resposta a agentes estressantes.....	24
3.4.1 Cloreto de sódio.....	24
3.4.2 pH.....	25
3.4.3 Análise estatística.....	26
4. Resultados e Discussão.....	27
4.1 Produção de antígenos, SDS-PAGE e testes de imunodifusão.....	27
4.1.1 Antígeno somático.....	27
4.1.2 Antígeno filtrado de cultura.....	30
4.2 Análise da relação dS/dN para o exon 2 da <i>PbGP43</i> .....	40

4.3 Resposta a agentes estressantes.....	44
4.3.1 Cloreto de sódio.....	44
4.3.2 pH .....	55
5. Conclusões .....	57
6. Referências bibliográficas.....	58



## RESUMO

O fungo termodimórfico *Paraccoccidiodes brasiliensis*, em sua fase leveduriforme, é o agente etiológico de uma das mais importantes micoses sistêmicas da América Latina, a paracoccidioidomicose. A doença pode ser fatal em sua forma aguda, além de gerar, na forma crônica, lesões principalmente de ordem dermatológica e pulmonar. O fato de *P. brasiliensis* ser considerado uma única entidade biológica vem sendo questionado pelos recentes achados de filogenia molecular. Atualmente acredita-se que *P. brasiliensis* seja um complexo de quatro espécies crípticas, S1, PS2, PS3 e *P. lutzii*, sendo esta última a mais distante filogeneticamente. É possível que o fato esteja interferindo em aspectos relacionados à doença, como, por exemplo, a positividade do diagnóstico sorológico. Além disso, tal especiação pode significar diferenças na biologia do fungo, em aspectos como sua morfologia, fisiologia e ocupação de nichos ecológicos.

A primeira frente deste trabalho visou produzir e caracterizar antígenos a partir de cepas pertencentes às diferentes espécies de *P. brasiliensis*, e avaliar o desempenho das mesmas em testes de imunodifusão (ID) contra pacientes das diferentes regiões do Brasil. Melhores resultados foram obtidos com o antígeno produzido por filtrado de cultura de um isolado pertencente ao grupo PS3, o qual apresentou altas taxas do antígeno imunodominante, a glicoproteína gp43, detectável por SDS-PAGE, e apresentou boa positividade nas IDs quando cruzados com soros de pacientes da região de Botucatu, reagindo inclusive com alguns soros falso-negativos para o antígeno considerado padrão, produzido pela cepa B-339. Entretanto, este antígeno, bem como outros aqui avaliados, não foi capaz de apresentar desempenho satisfatório frente a soros de pacientes da Região Centro-Oeste, justamente os que apresentam maiores taxas de negatividade, provavelmente por serem infectados por *P. lutzii*. A análise *in silico* do exon 2 do gene codificador da gp43 indicou que este gene está sofrendo seleção purificadora tanto no grupo *P. brasiliensis* (genótipos S1, PS2 e PS3), quanto em *P. lutzii*; indicou também uma maior taxa de mutações não-sinônimas e conseqüente maior variabilidade da molécula em *P. lutzii*, o que poderia gerar respostas mais variáveis a este antígeno nos pacientes infectados por este genótipo.

A segunda frente do trabalho procurou avaliar a resposta das diferentes espécies em relação aos fatores estressantes, como concentrações salinas crescentes e pH ácido, relacionados aos ambientes saprobiótico e de parasitismo do fungo, respectivamente. Embora os isolados da espécie *P. lutzii* parecem ser mais afetados pelo estresse salino do que os de *P. brasiliensis*, não foi possível diferenciar entre estas duas espécies por este fator, devido uma intensa variação entre os isolados, mesmo os pertencentes à mesma espécie. Em relação à acidificação do substrato, observou-se também um intensa variação intra-específica, com alguns isolados suportando e se desenvolvendo em valores de pH considerados bem baixos, como 3,8, o que pode ser uma característica importante na adaptação do fungo aos seus nichos e possível sobrevivência no trato gastrointestinal de mamíferos.

## ABSTRACT

The thermo-dimorphic fungus *Paraccoccidiodes brasiliensis* is the causative agent of paracoccidioidomycosis, one of the most important systemic mycosis in Latin America. The disease can be fatal in its acute form, besides causing important lesions especially in lungs and skin when occurs in its chronic form. The fact that *P. brasiliensis* is considered a single biological entity has been challenged by the recent findings in molecular phylogenetics. Currently, it has been observed that *P. brasiliensis* is a complex of four cryptic species, S1, PS2, PS3 and Pb01-like, which is the most distantly related, being proposed as new formal species, *P. lutzii*. It is possible that these facts are interfering with the host/pathogen interactions, as well as with the results of serological diagnosis. Furthermore, this speciation could reflect differences in the biology of the fungus, especially on their morphology, physiology and occupation of ecological niches.

The first approach of this work was to produce and characterize antigens from strains belonging to different species of *P. brasiliensis*, and evaluate their performance in immunodiffusion tests (ID) against sera of patients from different regions of Brazil. The better results were obtained with the antigen produced by culture filtrate of an isolate belonging to the PS3, AgEpm83, which showed high positivity rates in IDs, against sera of patients from Botucatu. This antigen, in addition, presented high levels of the glycoprotein gp43, the immunodominant component, detectable by SDS-PAGE. However, this antigen, as well as other here evaluated, was unable to provide satisfactory performance against the sera of patients from the Brazilian Midwest Region, probably because they are infected with *P. lutzii* isolates. The *in silico* analysis of exon2 of the gene that encodes gp43 indicated that this gene is under purifying selection both in *P. brasiliensis* group (genotypes S1, PS2 and PS3) and in *P. lutzii*. The analysis also indicated a higher rate of non-synonymous mutations and consequently higher variability of this antigen in *P. lutzii*, which could contribute to a variable response to this antigen in patients infected by this genotype.

The second approach of the study was to evaluate the response of different species in the presence of two stressing factors: increased salt concentrations and acid pH, related to the saprobiotic and parasitism phases of the fungus, respectively. Although *P. lutzii* isolates seem to be more affected by salt stress than *P. brasiliensis* ones, it was not possible

to differentiate these two species by this factor, because it was occurred a high variation among isolates belonging to the same species. Concerning the response to the substrate acidification, an intense intra-specific variation was also observed, with some isolates supporting very low pH, such as 3.8. This fact can be an important feature in the adaptation of the fungus to its ecological niches and surviving in the mammals' gastrointestinal tract.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e a paracoccidioidomicose

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* pertence ao filo *Ascomycota*, embora sua fase teleomórfica sexuada não tenha sido ainda observada (UNTEREINER et al., 2004). Os ascomicetos são caracterizados pela presença do asco, estrutura resultante da reprodução sexuada. Muitas espécies pertencentes a este grupo estão presentes no cotidiano da população de diversas formas, incluindo a produção de alimentos e de medicamentos. Por outro lado, o Filo também contém espécies causadoras de doenças em humanos e outros organismos, entre elas *Aspergillus flavus* e *Candida albicans*. *P. brasiliensis* é o fungo causador da paracoccidioidomicose (PCM), uma das mais importantes micoses sistêmicas da América Latina sendo endêmica do México até a Argentina (BRUMMER et al., 1993). Como a PCM não é uma doença de notificação compulsória, é difícil precisar sua real prevalência. Apesar disso, sabe-se que a maioria dos infectados é do sexo masculino e trabalhadores rurais do Brasil, Colômbia e Venezuela. Em regiões altamente endêmicas, a incidência estimada anual da PCM é de 1 a 3 casos em 100.000 habitantes (WANKE e LONDERO, 1994). Segundo Coutinho et al. (2002), a taxa média de mortalidade anual no Brasil no período de 1980 a 1995 foi de 1,45 por milhão de habitantes. No estado do Paraná, no período de 1980 a 1998, a mortalidade média anual foi ainda maior chegando a 3,48 por milhão de habitantes (BITTENCOURT et al., 2005). A importância da PCM é evidenciada pelo fato de ser a quinta maior causa de mortalidade entre doenças infecciosas crônicas e a maior entre as micoses sistêmicas.

Este patógeno tem como característica o termodimorfismo, sendo encontradas duas formas de vida. À temperatura ambiente (18 à 23°C), o fungo apresenta-se na forma miceliana, enquanto no hospedeiro, à 37°C, na forma de levedura (LACAZ et al., 1994).

A principal característica morfológica da levedura de *P. brasiliensis* é a presença de brotamentos periféricos à célula-mãe, gerando uma estrutura semelhante a uma roda-de-leme. Macroscopicamente, as colônias leveduriformes são ovaladas ou alongadas, enrugadas e de cor creme. Já as colônias micelianas são brancas, pequenas, irregulares e dotadas de um micélio aéreo. Suas hifas são delgadas e septadas, podendo apresentar

esporos de resistência ambiental denominados clamidósporos intercalares (FRANCO et al., 1989; LACAZ et al., 2002).

Na forma miceliana, *P. brasiliensis* vive saprobioticamente no solo. Nesta forma, o fungo produz propágulos como os arthroconídios ou aleuroconídeos, que em temperatura adequada dão origem às células leveduriformes (LACAZ et al., 2002). Provavelmente, a infecção do fungo pelos humanos se dá pela inalação desses propágulos, como já comprovado em modelos animais (McEWEN et al., 1987). É possível que outras portas de entrada para o fungo sejam a pele lesionada e mucosa do trato gastrointestinal (PALMEIRO et al., 2005). O fungo também já foi detectado e isolado de cães (RICCI et al., 2004; FARIAS et al., 2005) e tatus *Dasyus novemcinctus* (NAIFF et al. 1986; BAGAGLI et al., 1998; BAGAGLI et al., 2003), sendo esses últimos considerados reservatórios da espécie.

Os fatores que determinam a evolução da infecção são principalmente a virulência do fungo, a quantidade de esporos inalados e a integridade do hospedeiro (PALMEIRO et al., 2005), podendo gerar a forma sintomática da PCM. A infecção primária por *P. brasiliensis* se dá no pulmão, onde são gerados granulomas a fim de impedir a disseminação do patógeno (ROMANI, 1997; FRANCO et al., 1994). A manifestação da doença pode se dar na forma aguda em crianças ou jovens de ambos os sexos ou na forma crônica, geralmente em adultos do sexo masculino (RESTREPO et al., 1984). Esta forma da doença é caracterizada por um longo período de latência e formação de nódulos fibróticos nos tecidos, principalmente o pulmonar, causando problemas no funcionamento do órgão. Já na forma aguda da doença, a evolução é rápida e pode afetar o funcionamento da medula óssea e o sistema reticuloendolial, podendo ser fatal (FRANCO et al., 1987).

Quando ocorre a disseminação do fungo no organismo, podem surgir lesões nas mucosas, pele, linfonodo, glândulas adrenais, baço e fígado. As lesões mais frequentes acontecem nos lábios, soalho da boca, língua, faringe e bochechas. O paciente pode ainda se queixar de insônia, debilidade, inapetência, disfagia, dispnéia, tosse, hemoptise, febre, perda de peso, prurido e ardor (PALMEIRO et al., 2005).

O diagnóstico de certeza da paracoccidioidomicose é a demonstração direta do fungo. Entretanto, muitas vezes o estado físico e clínico do paciente impede a coleta de material biológico necessário para tal procedimento (FERREIRA-DA-CRUZ et al., 1990).

Dessa forma, as técnicas de pesquisa de anticorpos e antígenos têm importante papel no diagnóstico da paracoccidioidomicose (FRANCO et al., 1994), sendo largamente utilizadas no diagnóstico de rotina. Além disso, os exames sorológicos demandam menor tempo que exames de cultura e histopatológico (LACAZ, 2002) e podem ser utilizados para monitorar a infecção durante o tratamento (SALINA et al., 1998).

O método imunológico empregado na rotina dos laboratórios clínicos há meio século (FERRI, 1961) é a imunodifusão dupla por ser uma técnica de baixo custo operacional, prática, e de sensibilidade relativamente alta. Além disso, a técnica permite o monitoramento da doença e a eficácia do tratamento, através do acompanhamento da diminuição dos títulos de anticorpos específicos (ELIAS-COSTA et al., 2000; BLOTTA e CAMARGO, 1993; MENDES-GIANNINI et al., 1990).

O tratamento da PCM apresenta uma série de dificuldades e mesmo quando curados, os pacientes podem apresentar sequelas dermatológicas e de ordem respiratória, agravando o impacto social da doença (FRANCO et al., 1994).

## **1.2 Variabilidade genética e espécies crípticas em *Paracoccidioides brasiliensis***

O agente etiológico da PCM foi observado pela primeira vez por Adolfo Lutz, em 1908, a espécie descrita inicialmente como *Zymonema brasiliensis*, por Alfonso Splendore, em 1912, mais tarde renomeado como *P. brasiliensis* por Floriano de Almeida, em 1930, e permanecendo assim como uma única entidade biológica, fato que vem sendo agora questionado, devido os recentes achados de filogenia molecular. A diferenciação de espécies dentro do reino *Fungi* é dificultada pelo fato de algumas vezes diferentes espécies filogenéticas não apresentarem caracteres morfológicos que as diferenciem. Desta forma, estudos utilizando ferramentas genéticas tornam-se essenciais para a diferenciação dentro deste grupo.

A partir de 1995, iniciaram-se estudos de variabilidade genética de *P. brasiliensis* com o uso de RAPD (SOARES et al., 1995; CALCAGNO et al., 1998; MOLINARI-MADLUN et al., 1999; HAHN et al., 2002; HAHN et al., 2003), RFLP (NINO-VEGA et al., 2000), cariotipagem (MONTTOYA et al., 1997; CANO et al., 1998; MONTTOYA et al., 1999) e microssatélites (NASCIMENTO et al., 2004). Todos esses trabalhos demonstraram

que há uma grande variabilidade genética entre diferentes isolados desse fungo e alguns sugerem que os grupos geneticamente isolados tenham diferenças em relação à virulência (MOLINARI-MADLUN et al., 1999), resistência a drogas (HAHN et al., 2003) e correlação com origem geográfica (CALCAGNO et al., 1998; NINO-VEGA et al., 2000).

Além de observarem uma extensa variabilidade genética dentre os isolados do patógeno, através de análises de polimorfismos de seqüências gênicas, Matute et al. (2006) estabeleceram ainda que existem pelo menos 3 espécies crípticas em *P. brasiliensis* tendo ocorrido dois eventos de especiação. Dessas 3 espécies, uma é considerada parafilética (S1) e as outras duas monofiléticas (PS2 e PS3). S1 (contendo isolados do Brasil, Argentina, Peru, Paraguai e Venezuela) e PS2 (isolados do Brasil e Venezuela) ocorrem dentro de uma mesma área geográfica, sendo consideradas espécies simpátricas, enquanto PS3 está restrita ao território colombiano.

Recentemente, Carrero et al. (2008), ao analisarem árvores filogenéticas de genes codificadores de proteínas, propuseram a existência de uma quarta espécie constituída por isolados (Pb01 e IFM 54648) que não podem ser agrupados com nenhuma das outras 3 espécies. Os autores postulam ainda que os ramos que separam estes isolados são maiores que os que isolam as três espécies crípticas já conhecidas, ou seja, esta espécie é muito divergente quando comparada às demais. O isolado Pb01 também foi analisado por Theodoro et al. (2008a) em relação ao intein PRP8 e em comparação com outros isolados. Como tal isolado não parecia se agrupar a nenhum dos grupos pré-existentes, tal fato corroborou a existência de uma nova espécie. Por ser o Pb01 alvo de estudos há vários anos e de grande importância filogenética, o grupo de isolados semelhantes a ele vinha sendo denominado *Pb01-like*.

Teixeira et al.(2009) identificaram 17 novos isolados *Pb01-like*, sendo todos eles da Região Centro-Oeste brasileira. Estes autores sugerem que o evento de especiação entre *Pb01-like* e as espécies S1, PS2 e PS3 ocorreu por volta de 32 milhões de anos atrás. Além disso, os autores discutem a necessidade de uma descrição formal de pelo menos uma nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides*, onde o clado *Pb01-like* seria denominado *P. lutzii* em homenagem ao médico micologista Adolfo Lutz que descreveu morfologicamente *P. brasiliensis*. Salgado-Salazar et al. (2010) analisaram genes mitocondriais e apoiaram a descrição formal de uma segunda espécie a ser denominada *P. lutzii*. Entretanto, os autores



não concordam em definir os grupos S1, PS2 e PS3 como espécies diferentes. Para tanto, é argumentado que a distância genética que separa os três grupos é pequena se comparada com a que separa *P. lutzii* destas. O fato de S1 ser um grupo parafilético, tendo alguns dos seus isolados agrupados com cepas dos outros 2 grupos, também dificultaria o reconhecimento dos mesmos como espécie. Portanto, a especiação entre S1, PS2 e PS3 não obedece aos critérios de reconhecimento de espécie filogenética por eles utilizados. Por tais motivos, é sugerido que apenas *P. lutzii* seja uma espécie diferente e os outros grupos sejam considerados variantes geográficas.

O fato é que realmente ocorreu especiação dentro do gênero *Paracoccidioides* e que a espécie *P. lutzii* está em vias de ser descrita formalmente (Teixeira et al., *in press*). Por tais motivos, o grupo *Pb01-like*, já é denominado neste texto como *P. lutzii*. Entretanto, os outros grupos (S1, PS2 e PS3) também são tratados como diferentes espécies crípticas em razão das publicações anteriores que evidenciam o fato.

### **1.3 Variação antigênica e seus significados no diagnóstico sorológico**

A glicoproteína gp43, de peso molecular de 43 kDa, é o antígeno imunodominante em *P. brasiliensis*. Acreditava-se que a gp43 fosse um fator de virulência, provavelmente possuindo propriedades proteolíticas sobre o colágeno, a elastina e a caseína (MENDES-GIANNINI et al., 1990a). Entretanto, essa função proteolítica da gp43 não foi confirmada e estudos mais recentes indicam que essa molécula exerce o papel de adesão a laminina (VICENTINI et al., 1994; GESZTESI et al., 1996; MENDES-GIANNINI et al., 2006). Pacientes acometidos com forma severa da PCM apresentam altas doses de anticorpos anti-gp43, que tendem a diminuir com o tratamento da doença (BLOTTA e CAMARGO, 1993; MENDES-GIANNINI et al., 1990b).

Um correto entendimento da dimensão da variabilidade do gene da gp43, em *P. brasiliensis* e sua estrutura populacional, em particular sobre o número de espécies existentes e sua distribuição, é importante não apenas em seus aspectos acadêmicos, mas também aplicados. Estes fatos podem ser relevantes na interação do patógeno com o hospedeiro, na determinação das diferentes manifestações clínicas da doença, resposta aos

tratamentos e também interferir fortemente nos resultados sorológicos para o diagnóstico da doença.

Há relatos que sugerem que a gp43 tem grande importância imunológica em alguns isolados, porém em outras cepas seu efeito imunológico pode não ser tão determinante. Ao analisar os antígenos produzidos a partir dos isolados B-339 e 550B, Batista Jr. et al (2010) perceberam que o primeiro isolado produzia altas taxas da gp43, com uma banda bastante evidente no SDS-PAGE realizado. Em contrapartida, essa banda é inexistente no filtrado de 550B, enquanto uma banda de 60kDa é a mais evidente. É importante lembrar que B-339 é pertencente à espécie S1, enquanto o 550B é oriundo da Região Centro-Oeste, onde ocorre, segundo Teixeira et al. (2009), principalmente a espécie *P. lutzii*. Além disso, um número importante de casos confirmados de PCM, originários principalmente dessa região do Brasil, apresentam sorologia negativa (Dra. Adriana Vicentini, Instituto Adolfo Lutz; Dr. Bodo Wanke, Instituto Oswaldo Cruz, comunicação pessoal). Um outro dado muito interessante refere-se ao paciente infectado com o isolado IFM 54648, o qual comprovou-se também pertencer ao grupo *P. lutzii*. Este paciente, no entanto, é proveniente do estado do Paraná e menciona também ter morado no Município de Botucatu (TAKAYAMA et al., 2009). A forma clínica apresentada é a crônica multi-focal (forma adulta crônica) e sua sorologia avaliada em 5 diferentes amostras, por imunodifusão, apresentaram-se todas negativas frente ao antígeno considerado padrão, produzida pelo isolado B-339. O motivo da ocorrência de diagnósticos falso-negativos nestes pacientes muito provavelmente está relacionado ao fato de que as espécies normalmente empregadas na produção de antígenos para os testes sorológicos pertencem principalmente ao grupo S1.

Além do nível de expressão ser variável, a gp43 possui diferentes isoformas (PUCCIA et al., 1986; MOURA-CAMPOS et al., 1995). Essas isoformas provavelmente estão relacionadas à grande variabilidade de seu gene, estudada por Moraes et al. (2000). As diferentes espécies crípticas possuem sítios polimórficos únicos (SNPs) característicos nesse gene, evidenciando uma variação inter-específica, que pode ser empregada para o reconhecimento das espécies (THEODORO, 2010).

Matute et al. (2008) ao compararem o gene da gp43 de 2 isolados *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb01) com um ancestral hipotético comum observaram que o mesmo encontra-se sob um processo de seleção positiva. Em outras palavras, o gene da gp43 estaria sofrendo

uma pressão evolutiva a fim de aumentar sua diversidade através de um número maior de mutações não sinônimas em relação às sinônimas. Os autores também observaram o aumento de diversidade em outros genes considerados importantes na infecção, enquanto que genes com outras funções apresentaram reação oposta, ou seja, maior número de mutações sinônimas. Tal fato levou, portanto, os autores acreditarem que o aumento de variabilidade em genes “de virulência” seria um mecanismo de escape à resposta imune do hospedeiro. Neste sentido, parece ser particularmente interessante analisar se os dois grupos (complexos *P. brasiliensis* e *P. lutzii*) estão sofrendo o mesmo tipo de pressão evolutiva em relação ao gene da gp43, principalmente para melhor avaliar o papel da glicoproteína gp43 na interação com o hospedeiro, já comprovada, como dito anteriormente, antígeno imunodominante no grupo *P. brasiliensis*, porém ainda não observada no grupo *P. lutzii*.

#### **1.4 Variabilidade em *P. brasiliensis* em relação a outros fatores**

Apesar da grande variabilidade genética encontrada entre as espécies crípticas de *P. brasiliensis*, ainda não é claro como esses diferentes grupos diferem em características como virulência, potencial em gerar resposta imune no hospedeiro e patogenicidade da PCM, bem como diversas outras características biológicas, como fisiologia, morfologia e mesmo aspectos ecológicos.

Ao estudar a dinâmica da infecção causada por isolados S1 e PS2 em ratos B10. Carvalho et al. (2005) verificaram que a espécie críptica PS2 causa uma resposta imune diferenciada no hospedeiro, do tipo Th1, o que previne a progressão da PCM, podendo este grupo ser considerado menos virulento. Entretanto, isolados deste grupo apresentaram-se bastante virulentos em outros modelos experimentais, como em Hamster pela via intratesticular (HEBELER-BARBOSA et al, 2003) e camundongos suíços “outbreds” (KUROKAWA et al., 2005).

Algumas diferenças morfológicas e biológicas entre as espécies crípticas de *P. brasiliensis* começam a ser elucidadas. Theodoro et al. (2005 e 2008b) observaram que PS2 tende a apresentar células leveduriformes mais alongadas e transição micélio-levedura mais lenta que S1. Além disso, Terçarioli et al. (2007) observou que a espécie críptica S1 produz maior quantidade de conídias que PS2. É provável que esta seja a causa de observarmos um

número maior de infecções por S1 em regiões que ambas espécies co-existem simpatricamente (BAGAGLI et al., 2008).

Paniago et al. (2003) observaram que a proporção entre casos agudos/subagudos e crônicos da PCM varia de acordo com a região estudada. Em seu estudo realizado no estado de Mato Grosso do Sul a porcentagem da ocorrência de casos agudos/subagudos foi de 15,4%, caracterizando perfil semelhante aos dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (VALLE et al., 1993). Porém, esta ocorrência relativa foi maior que as observadas em outros países sul-americanos (RODRÍGUEZ e PIÑATE, 1966; GIRALDO et al., 1976; CONTI-DÍAZ e CALLEGARI, 1979; RONQUILLO, 1983) e nos estado do Rio Grande do Sul (LONDERO e RAMOS, 1990) e menor do que nos estados de Goiás (BARBOSA, 1968), Minas Gerais, Maranhão e Pará (VERAS, 1995). Embora a correta distribuição geográfica das diferentes espécies crípticas do *P. brasiliensis* ainda não seja totalmente conhecida, tais dados sugerem não somente uma regionalização de diferentes perfis da PCM, como também dão indícios que as diferentes espécies crípticas presentes nas regiões estudadas possam ser responsáveis por diferenças na forma de manifestação da doença.

#### **1.4.1 Fatores estressantes**

Diferenças nas respostas a alguns fatores ambientais, potencialmente estressantes ao patógeno, podem ser consideradas ótimos marcadores fisiológicos entre espécies, especialmente quando esses agentes estão relacionados ao habitat e ao nicho ecológico ocupados pelos organismos em questão. Este aspecto vem sendo observado em *Coccidioides immitis* e *C. posadasii*, cujos estudos sobre diferenciação das espécies com métodos moleculares serviram de exemplo para o que vem sendo feito mais recentemente com o *P. brasiliensis*. Após a diferenciação das duas espécies pelas técnicas moleculares pode-se observar, por exemplo, que a espécie *C. posadasii* apresenta um crescimento significativamente menor do que a espécie *C. immitis* quando cultivado em meios com altas concentrações de cloreto de sódio (FISCHER et al., 2002). Cordeiro et al. (2006) analisaram as taxas de crescimento de isolados do gênero *Coccidioides* da região nordeste do Brasil, em diferentes níveis de pH, NaCl e temperatura e na presença de alguns aminoácidos. O estudo permitiu um importante avanço na compreensão da ecologia de

*Coccidioides* spp. uma vez que os resultados obtidos nos experimentos *in vitro* foram correlacionados com o habitat do gênero na fase vegetativa. No entanto, estes autores não correlacionam seus dados com a espécie de *Coccidioides* local, provavelmente *C. posadasii*.

Da mesma forma que o ambiente saprobiótico, o “ambiente hospedeiro” também apresenta importantes fatores de estresse ao patógeno, particularmente aqueles representados pela resposta imune do hospedeiro, como a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO, e níveis de pH (McEWEN et al., 1984; CARMO et al., 2006; MOREIRA et al, 2008). Kamei et al. (1992) relacionaram o nível de síntese protéica de *Histoplasma capsulatum* com mecanismos de defesa dos organismos infectados por esse patógeno. Os agentes estressantes utilizados foram calor (40°), pH 4 e 3 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que agem mimetizando respectivamente o aumento da temperatura em infecções, o meio ácido dentro do fagolisossomo e produtos tóxicos liberados pelo hospedeiro. Foi observado um aumento no nível de produção de proteínas constitutivas nessas situações de estresse, fato que foi relacionado ao aumento de virulência. Além disso, existem relatos de recuperação do *P. brasiliensis* nas fezes, após passagem pelo trato gastrointestinal de hamsters e camundongos (Dra. Ayako Sano, não publicado) a despeito do pH ácido estomacal, dentre outros fatores. Tal fato não é observado em *C. immitis* e *C. posadasii* (Dr. Karl Clemons, informação pessoal). Enquanto *P. brasiliensis* se desenvolve em solos com características mais ácidas, *C. immitis* e *C. posadasii* apresentam como habitat o solo alcalino.

É importante frisar que estudos relacionados a agentes estressantes em *P. brasiliensis* devem levar em consideração fatores inerentes ao ambiente saprobiótico e ao hospedeiro, uma vez que parte do ciclo de vida é parasitária e outra parte é de vida livre.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Contribuir para uma maior diferenciação das espécies que compõe o complexo *P. brasiliensis*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o perfil de antígenos produzidos a partir de isolados das diferentes espécies e sua eficiência em testes de imunodifusão com soros de pacientes provenientes da área endêmica de Botucatu e da região Centro-Oeste do Brasil;
- Analisar o perfil de seleção para o gene *PbGP43*, com base na razão entre substituições sinônimas e não sinônimas, para o complexo *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.
- Comparar as espécies crípticas de *P. brasiliensis* em relação às respostas a alguns fatores estressantes, de forma a fornecer informações dos perfis de adaptação aos diferentes habitats (saprobiótico e do hospedeiro).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Isolados de *Paracoccidioides brasiliensis***

Foram utilizados isolados representativos das 4 espécies crípticas (*P. lutzii*, S1, PS2 e PS3) para as diversas análises do presente trabalho. Esses isolados são mantidos no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. As formas leveduriformes são subcultivadas em meio GPYA (glicose 4%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e ágar 1%) a cada 15 dias e as miceliais a cada 3 meses no meio comercial Mycosel<sup>®</sup>. A descrição de cada isolado, bem como para qual experimento cada um foi utilizado é apresentada na Tabela 1.

#### **3.2 Produção de antígenos**

##### **3.2.1 Preparo de antígeno somático**

O preparo de antígenos de *P. brasiliensis* foi realizado segundo Franco et al. (1996), com modificações. Os isolados foram cultivados em tubos contendo GPYA e incubados a 37°C por 7-10 dias. A seguir, foram transferidas cerca de quatro alçadas de leveduras para frascos Erlenmeyers contendo 200ml de GPY caldo e mantidos sob agitação contínua a 150 rpm a 37°C durante 7 dias. Após esse período foi adicionado 0,5g/l de timerosal a fim de se promover a inativação do patógeno. A cultura foi mantida a 4°C por 18 horas e posteriormente submetida a três centrifugações (4000rpm) cada uma seguida de lavagem com salina 0,85% estéril. Após a última centrifugação, a massa fúngica foi ressuspensa em volume igual de salina contendo, como inibidor de proteases, 1 tablete de Complete Mini (Roche) para cada 10 ml e mantida por 24 horas em geladeira sob agitação constante com pérolas de vidro. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 10000rpm por 40 minutos. O sobrenadante foi acondicionado em sacos de diálise (Sigma) previamente umedecidos com água destilada. Os sacos de diálise foram colocados em um recipiente com água destilada, que deverá ser trocada duas vezes por dia durante três dias. Os antígenos

foram acondicionados em frascos tipo penicilina (cerca de 15ml em cada frasco) e mantidos a -20°C até o momento da liofilização. Cerca de 4 horas antes da liofilização os frascos foram mantidos a -70°C e a seguir colocados em liofilizador sob temperatura constante de -35°C por 5 dias. Os antígenos liofilizados foram mantidos a -20°C.

Tabela 1. Descrição dos isolados que foram utilizados nos experimentos realizados.

<i>Isolado</i>	<i>Espécie críptica</i>	<i>Procedência</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>Amostra</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>P</i>
Pb18	S1	São Paulo/SP	Humano	Pus ganglionar		X	X
Bt60	S1	Manduri/SP	Humano	Escarro	X	X	X
T9B1	S1	Botucatu/SP	Tatu	Baço	X	X	
T3B6	S1	Pratânia/SP	Tatu	Baço		X	X
T4B17	S1	Manduri/SP	Tatu	Baço		X	X
T8F3	S1	Botucatu/SP	Tatu	Fígado	X		
T1F1	S1	Pratânia/SP	Tatu	Fígado	X		
Pb265	S1	São Paulo	Humano	?	X		X
Pb262	PS2	Uberlândia/MG	-	Ração Bonzo		X	
Pb02	PS2	Caracas/VEN	Humano	?		X	
Bt84	PS2	Botucatu/SP	Humano	Escarro		X	
Pbdog	PS2	Curitiba/PR	Cão	Linfonodo		X	
T10B1	PS2	Botucatu/SP	Tatu	Baço	X	X	X
EPM77	PS3	Colômbia	Humano	?		X	
EPM83	PS3	Colômbia	Humano	?	X	X	X
Pb01	<i>P. lutzii</i>	Goiânia/GO	Humano	?	X	X	X
EE	<i>P. lutzii</i>	Cuiabá/MT	Humano	?	X	X	X
JAL	<i>P. lutzii</i>	Cuiabá/MT	Humano	?		X	X
Pb8334	<i>P. lutzii</i>	Goiânia/GO	Humano	?	X	X	X
Pb66	<i>P. lutzii</i>	Goiânia/GO	Humano	?	X		X

A: isolados utilizados para produção de antígenos;

S: isolados submetidos a testes em meios com diferentes concentrações de sal;

P: isolados submetidos a testes em meios com diferentes valores de pH.



### 3.2.2 Preparo de antígeno filtrado de cultura

As formas leveduriformes (10 tubos bem forrados), com 5 dias de crescimento em meio de Fava Netto foram inoculadas em 500ml de meio STA (dextrose 2%, neopeptona 1%, tiamina 0,018%, asparagina 0,036%) e incubadas a 35°C por 15 dias, em estufa agitadora (150rpm). Após este período, as células foram tratadas com timerosal na concentração final de 0,2 g/L e incubadas nas mesmas condições durante 4 dias. Posteriormente, foi realizada filtração com papel de filtro. Os antígenos foram concentrados utilizando-se sacos de diálise previamente umedecidos e cobertos com polietilenoglicol até atingirem 10% do volume inicial. Em seguida, acondicionadas nos mesmos sacos de diálise, as amostras foram dialisadas contra PBS durante 3 dias, a 4°C trocando-se o tampão uma vez por dia. Após o período, as amostras foram aliqüotadas em 1,0ml, liofilizadas e mantidas a -20°C. Para o uso em imunodifusão e SDS-PAGE as aliqüotas foram ressuspendidas em 20µl.

### 3.2.3 SDS-PAGE

A confecção dos géis e demais reagentes para o SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) foram realizadas de acordo com o descrito por Laemmli (1970), com gel de separação a 10%. O marcador molecular utilizado foi o PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas). As corridas eletroforéticas em gel de poliacrilamida foram realizada empregando-se o sistema de mini-gel da Hoefer (Hoefer Inc., San Francisco, USA). Os tempos de corrida foram de cerca de 2 horas a 110V e 93mA.

Após as corridas, os géis foram corados por 30 minutos sob agitação constante com Coomassie Blue (Coomassie Blue 0,1%, metanol 45%, ácido acético glacial 10%) e a seguir o excesso de corante foi retirado em solução descorante (ácido acético glacial 10%, metanol 10%) por um período de 18 horas (*overnight*). Os géis foram fotografados com máquina digital Sony CyberShot 5.1 Mega *pixels* para documentação da imagem.

### 3.2.4 Testes de Imunodifusão

Alguns dos testes de imunodifusão em gel de ágar para o diagnóstico da PCM foram realizados no Instituto Adolfo Lutz/SP, o qual é referência para este diagnóstico sorológico de PCM e também dispõe de uma coleção de soros (soroteca) de pacientes de diferentes regiões do Brasil (VICENTINI-MOREIRA, 2008), segundo protocolo descrito por Ouchterlony (1947), com algumas modificações. Outros testes foram realizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu em laboratório sob responsabilidade do Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes e que possui numerosos soros de pacientes provindos da região endêmica de Botucatu. Além disso, algumas análises foram realizadas no próprio Laboratório de Biologia de Fungos, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu.

Num procedimento geral, lâminas de vidro, com 26 x 76 mm, foram lavadas em um becker de 1000ml contendo água e detergente neutro, ficando de molho por 30 minutos e, após esse período, levadas ao fogo até a fervura. A água do Becker foi trocada e levada ao fogo novamente até a fervura. O procedimento foi repetido até que todo detergente ser removido das lâminas. A secagem foi realizada em estufa a 60°C. Após estarem completamente secas, as lâminas de vidro permaneceram em solução de álcool-éter (50% v/v). A seguir, essas lâminas foram limpas com gaze embebida em álcool 70%, segurando-se sempre pelas extremidades. As lâminas foram pré-forradas com 1,0ml de solução de ágar a 1%, previamente fundido, seguido por secagem a 60°C por 24 horas. As lâminas foram, então, forradas com 3,0ml da solução de ágar citrato (ágar purificado 1%, cloreto de sódio 0,9%, citrato de sódio 0,4%, glicina ou ácido aminoacético 7,5%, thimerosal (mertiolato) 0,01%) previamente fundido. O ágar citrato foi solidificado em temperatura ambiente, e colocado em câmara úmida (placa de Petri contendo algodão embebido em água destilada). Após as lâminas serem furadas, 10µl de antígeno ou soro foram colocados nos poços e as mesmas foram incubadas em câmara úmida por 48 horas. Após esse período, as lâminas permaneceram em solução 0,5% de citrato de sódio por 45 minutos e em solução salina por 18 horas. Os poços foram então cobertos com o ágar citrato e secados por 8 horas à 60°C com o auxílio de papel de filtro. A coloração foi realizada por 10 minutos com solução 0,4% de amido de Schwartz e 10% de ácido acético glacial (Faculdade de Medicina de

Botucatu) ou Comassie-Blue (Instituto Adolfo Lutz). A descoloração foi realizada em duas rodadas, cada uma de 10 minutos, com solução 5% de ácido acético glacial.

### **3.3 Análise da relação dS/dN para o exon 2 da PbGP43**

Foram empregadas sequências do exon 2 da PbGP43 depositadas no GenBank. Os haplótipos do grupo *P. lutzii* (EU870212 - EU870214; EU870217; EU870218; EU870220; EU870221; EU870226 - EU870228) foram depositados por Teixeira et al. (2009), enquanto os haplótipos pertencentes às outras espécies crípticas (DQ003724; DQ003741; DQ003744; DQ003746; DQ003748 - DQ003750; DQ003771 - DQ003773; DQ003781) foram depositados por Matute et al. (2006). As sequências foram alinhadas no software Mega4 e suas taxas de substituições sinônimas e não-sinônimas (dS/dN) foram calculadas no web site Syn-Scan (GONZALES et al., 2002), par a par (excluindo regiões do alinhamento que descaracterizavam a sequência de aminoácidos já deduzida), de acordo com o método de Nei-Gojobori (NEI e GOJOBORI., 1986), e depois obtido um valor médio de dS/dN.

### **3.4 Testes de resposta a agentes estressantes**

#### **3.4.1 Cloreto de sódio**

Por ser o cloreto de sódio um fator estressante relacionado ao ambiente saprobiótico, a fase micelial foi empregada nas comparações sobre o efeito salino no crescimento das diferentes espécies crípticas de *P. brasiliensis*. Para realizar tal comparação, teve-se como base o método utilizado por Fisher et al. (2002), porém com modificações. Inicialmente, cada isolado foi cultivado em meio comercial composto por extrato de batata, dextrose e ágar (BDA). Após 30 dias, porções de 3mm de diâmetro foram retiradas das margens da colônia e cultivadas em meios com a mesma constituição, exceto pela adição de concentrações de 34mM (0,2%), 68mM (0,4%), 136mM (0,8%), 170mM (1,0%) e 272mM (1,6%) de cloreto de sódio, além do grupo controle, sem adição de cloreto de sódio. Cada isolado contou com 4 repetições em cada uma das 6 diferentes

concentrações de sal. Essas colônias foram mantidas a 25°C e, após 20 e 30 dias, os diâmetros das colônias foram medidos e submetidos a análises estatísticas.

### 3.4.2 pH

Pretendia-se avaliar o possível efeito estressante de pH baixo sobre o crescimento de leveduras, mimetizando as condições ácidas dentro do fagolisossomo. Para tal, 0,066g de crescimento leveduriforme em 100µl de salina com viabilidade maior que 90% (determinada pelo método de azul-algodão) foram inoculadas em tubos tipo falcon de 15ml, contendo 10ml de meio GPY líquido, em pH 6,4 e 3,8, em quatro repetições para cada condição de pH. Os tubos inoculados foram incubados a 36°C em estufa com agitação orbital de 150 rotações por minuto, por 15 dias quando então foram estimados crescimento e viabilidade pelo método colorimétrico de XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenil)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide). Para tanto, os tubos serão centrifugados em microcentrífuga refrigerada Eppendorff (Modelo 58010R), com rotor “swing-out” a 3000rpm por 5 minutos na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 10ml de PBS. Tal procedimento foi realizado por duas vezes, a fim de garantir que as leveduras estariam ressuspensas apenas em PBS, totalmente livre de meio de cultura. Posteriormente foram adicionados a cada tubo 125µl de XTT (1mg/ml) e 10µl de menadiona (1mM). As amostras, então, retornaram à estufa, nas mesmas condições por 24h. Após o período, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido e sua absorbância obtida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 492nm. Quanto maior esse valor obtido, maior é o número de leveduras viáveis na amostra. O índice de inibição de crescimento será expresso pela razão entre a absorbância obtida em amostras de pH 3,8 sobre o pH 6,4 com inóculo do mesmo isolado.

### **3.4.3 Análise estatística**

Análises de variância foram realizadas, utilizando-se dos dados de diâmetros de colônias (experimento com sal) e com os índices de inibição de crescimento (experimento com pH ácido), seguidas de teste Tukey ou Duncan para valores de F significativos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Produção de antígenos, SDS-PAGE e testes de imunodifusão

#### 4.1.1 Antígeno somático

Produziu-se antígeno somático de dois isolados da espécie *Paracoccidioides lutzii* (Pb01 e EE), dois do grupo S1 (T8F3 e T1F1) e um do grupo PS2 (T10B1), segundo metodologia proposta por Franco et al. (1996), com modificações. Foi realizada uma SDS-PAGE com produtos protéicos dos isolados Pb01 e EE, observando-se maior quantidade de bandas protéicas no isolado EE (Figura 1). Por sua vez, o extrato protéico de Pb01, não apresentou banda referente à gp43, fato que o excluiu das análises posteriores, uma vez que tal glicoproteína é importante para o imunodiagnóstico (BLOTTA e CAMARGO, 1993).

A reatividade das preparações antigênicas frente aos anticorpos policlonais espécie-específico e a ausência desta com anticorpos policlonais antiantígeno de *Histoplasma capsulatum* e de *Aspergillus fumigatus* demonstram a especificidade do restante das preparações antigênicas produzidas.

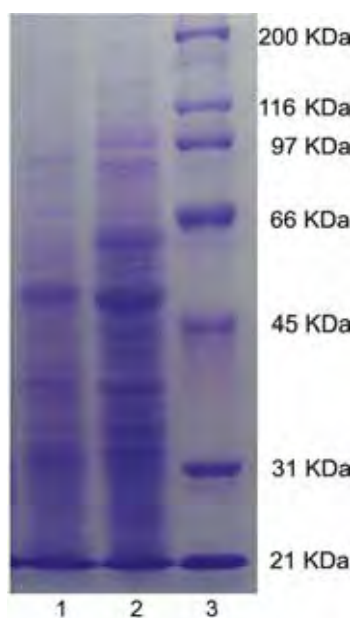


Figura 1. SDS-PAGE com antígeno somático de isolados *P. lutzii*. Poço 1 – extração a partir do isolado Pb01; poço 2 – extração a partir do isolado EE; poço 3 – marcador de peso molecular.

Além disso, estas preparações antigênicas foram avaliadas frente a dez (10) amostras de soro de pacientes provenientes do Estado de São Paulo e que apresentaram reatividade para *P. brasiliensis* frente ao filtrado de cultura obtido do isolado B-339 (antígeno de referência e pertencente ao grupo S1). Tais testes, assim como os subsequentes, foram realizados no Instituto Adolfo Lutz/SP, o qual é referência para este diagnóstico sorológico de PCM e também dispõe de uma coleção de soros de pacientes de diferentes regiões do Brasil (VICENTINI-MOREIRA, 2008).

Verificamos que o percentual de reatividade para os antígenos AgEE, AgT10B1, AgT8F3 e AgT1F1 foi de 80% (8/10), 60% (6/10) 100% (10/10) e 80% (8/10), respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de positividade de diferentes antígenos somáticos frente a soros de pacientes do estado de São Paulo com resultados positivos em imunodifusão utilizando-se o antígeno padrão.

<i>Antígeno</i>	<i>Positividade</i>
Ag EE	80% (8/10)
Ag T10B1	60% (8/10)
Ag T8F3	100% (10/10)
Ag T1F1	80% (8/10)

A análise das quatro preparações antigênicas frente a dez amostras soros de pacientes sabidamente reagentes para *P. brasiliensis* pela prova de ID frente ao AgB-339, demonstra que o AgT8F3 apresenta melhor “performance”, visto que conferiu 100% de sensibilidade ao ensaio de ID. Tal resultado já podia ser esperado, já que a grande maioria dos pacientes do Estado de São Paulo é infectada por isolados da mesma espécie críptica, S1. O outro isolado presente nas análises pertencente à mesma espécie críptica, o T1F1 também apresentou preparação antigênica com alta taxa de reatividade, 80%, o mesmo valor também apresentado com o isolado EE, pertencente à espécie *P. lutzii*. A preparação antigênica obtida a partir da cultura de células leveduriformes do isolado T10B1 não conferiu percentual de sensibilidade satisfatório ao ensaio de ID. Existem 2 possibilidades que podem explicar tal fato. A primeira diz respeito às condições em que foi obtido/produzido (meio de cultura, protocolo de obtenção, tempo de cultivo, etc). Tal procedimento pode não ser adequado para realização de testes de imunodifusão, já que

como no processo ocorre ruptura celular, provavelmente estariam presentes na preparação enzimas proteolíticas. Outra possibilidade pode ser o fato do isolado T10B1 pertencer à espécie PS2 que mesmo ocorrendo no Estado de São Paulo, é bem menos frequente que a espécie S1 (BAGAGLI et al., 2008).

Os antígenos dos isolados EE, T10B1, T8F3 e T1F1, assim como o antígeno de referência, obtido do isolado B-339 foram então submetidos a testes de imunodifusão em gel de ágar frente a 134 amostras de soro de pacientes dos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Estes pacientes estão realizando apenas exames preventivos e não estão obrigatoriamente infectados.

Dessas amostras, 22 (16%) apresentaram reatividade quando avaliadas frente ao AgB-339. Ao serem testadas com AgEE, AgT10B1, AgT8F3 e AgT1F1, essas 22 amostras positivas apresentaram percentual de reatividade de 32% (7/22), 45% (10/22), 59% (13/22) e 55% (12/22), respectivamente. Nas análises dos 112 soros que não apresentaram reatividade com AgB-339, verificou-se que os antígenos AgEE e AgT1F1 apresentaram reatividade de 2% (2/112) e AgT10B1 e AgT8F3 de 2,6% (3/112). Os resultados referentes às 134 amostras de soro da Região Centro-Oeste são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Taxa de positividade de diferentes antígenos somáticos frente a soros de pacientes da região Centro-Oeste.

<i>Antígeno</i>	<i>Positividade com soros reativos para AgB-339</i>	<i>Positividade com soros não-reativos para AgB-339</i>	<i>Positividade total</i>
Ag EE	32% (7/22)	2% (2/112)	7% (9/134)
Ag T10B1	45% (10/22)	2,6% (3/112)	10% (13/134)
Ag T8F3	59% (13/22)	2,6% (3/112)	12% (16/134)
Ag T1F1	55% (12/22)	2% (2/112)	10% (14/134)

Deve-se destacar que o AgEE apresentou 98% de concordância ao antígeno de referência quando empregado para avaliar amostras de soro não reagentes para *P. brasiliensis*. Apenas 2 amostras negativas para o AgB-339 apresentaram positividade para o AgEE. Esperava-se uma maior taxa de resultados positivos para tal antígeno, já que o isolado EE pertence à espécie *P. lutzii*, a mais prevalente na região Centro-Oeste brasileira. O baixo percentual de reconhecimento do AgEE, também frente a soros sabidamente reagentes, 32%, aumentam a possibilidade de que tal procedimento de extração de



antígenos somático não seria adequado para testes de imunodifusão. Porém, é importante lembrar que esses 134 soros são de pacientes suspeitos, não obrigatoriamente infectados de fato. Como nenhum antígeno apresentou alta positividade nas 112 amostras negativas para AgB-339, a possibilidade desses pacientes serem realmente negativos é grande. Entre as 22 amostras positivas para AgB-339, a maior taxa de concordância foi de AgT8F3 e AgT1F1, 59% e 55% respectivamente. Tais antígenos foram extraídos de isolados pertencentes à mesma espécie de B-339, S1.

A baixa positividade principalmente do antígeno do isolado EE, pertencente à espécie *P. lutzii*, evidenciou a necessidade da utilização de outros métodos de obtenção de antígenos, além da adição de outros isolados dessa espécie às análises.

#### **4.1.2 Antígeno filtrado de cultura**

Foram produzidos antígenos de 7 isolados de *P. brasiliensis* por esse método, sendo 3 da espécie S1 (Bt60, Pb265 e T9B1), 3 da espécie *P. lutzii* (Pb01, Pb8334 e Pb66) e 1 da espécie PS3 (Epm83).

Depois de liofilizados e ressuspendidos em 25µl de água Milli-Q, os antígenos foram submetidos a uma SDS-PAGE e a testes de imunodifusão com o soro não diluído de um paciente de Igaracú do Tietê/SP, região de Botucatu. Esse soro é sabidamente positivo e reage com o antígeno padrão AgB-339 em diluições de 1:512, sendo considerado então fortemente reativo.

A SDS-PAGE apresentou ausência de bandas protéicas para os antígenos produzidos a partir dos isolados Bt60 e T9B1. Já as outras cinco preparações antigênicas apresentaram bandas em diversas alturas e diferentes intensidades (Figura 2). Por ser um antígeno produzido sem ruptura celular, é natural que o número de bandas seja menor do que aquele apresentado na preparação do antígeno somático que conta com conteúdo citoplasmático.

Pode-se observar que o antígeno que produziu bandas mais intensas foi o AgEpm83, sendo a mais intensa delas referente a gp43, molécula importante para o diagnóstico sorológico (BLOTTA e CAMARGO, 1993). Além disso, a preparação apresenta outra banda bastante intensa na altura de 90kDa. Entre os antígenos produzidos por isolados *P.*

*lutzii*, AgPb01 e AgPb8334 também apresentaram banda na altura de 43kDa, porém com menor intensidade.

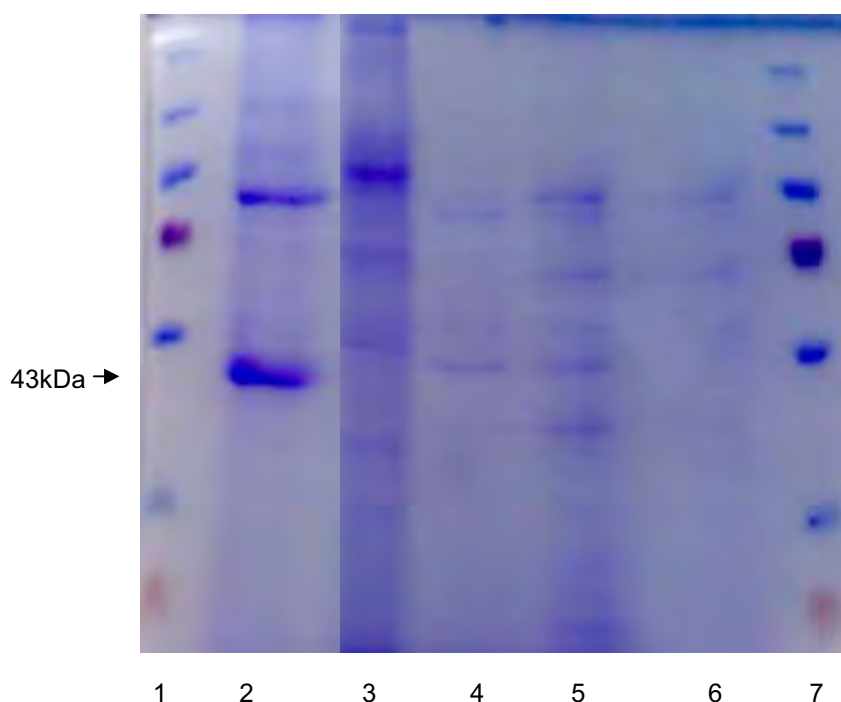


Figura 2. SDS-PAGE com antígeno filtrado de cultura de isolados *P. brasiliensis*. Poço 1 – marcador de peso molecular; poço 2 - AgEpm83; poço 3 – AgPb265; poço 4 – AgPb01; poço 5 – AgPb8334; poço 6 – AgPb66; poço 7 – marcador de peso molecular.

Berzaghi et al. (2005) observaram que nem todas as culturas de *P. brasiliensis* expressam gp43 e as que o fazem, produzem a molécula em níveis e formas variáveis. Sabe-se que o isolado 113, caracterizado nesse trabalho como produtor da molécula e já utilizado para produção de antígeno, em certo momento parou de excretar grandes doses da gp43, inviabilizando sua utilização como produtor de antígeno padrão (Prof. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, comunicação pessoal). Tal instabilidade na produção de frações antigênicas pelo mesmo isolado também foi observada por Franco et al. (1996). Berzaghi et al. (2005) atribuem tal fato a algum problema desconhecido no mecanismo de expressão da gp43. Apesar de se conhecer algumas sequências importantes para a expressão na região promotora da gp43, é possível sugerir que outros mecanismos também sejam responsáveis por uma expressão tão variável da molécula. Uma hipótese seria a inserção de elementos transponíveis tanto na região promotora como em sua matriz de leitura. Alguns elementos

genéticos com capacidade de transposição já foram detectados nas diversas espécies em *P. brasiliensis* (MARINI et al., 2010; LI et al., 2010). Tais acontecimentos, tanto na história evolutiva, quanto durante a manutenção de uma cepa em laboratório, impediriam a produção ou modificariam abruptamente a produção da gp43. Entretanto, tais elementos ainda não foram observados associados diretamente ao gene da gp43. Outra hipótese seria a interferência de processos pós transcricionais, como a excisão alternativa de introns. Além disso, já foi observado em *P. brasiliensis* sequências de aminoácidos, codificados por genes considerados parasitas, que são capazes de se autorremover mesmo após a tradução da proteína (THEODORO et al., 2008a). Se considerarmos, então, que até sua secreção, uma molécula pode estar sujeita a diversas alterações, um leque infinito de possibilidades nos é aberto para discutir a grande variabilidade na verificação de gp43 no filtrado de cultura.

Apesar da larga variedade entre os antígenos produzidos por diferentes isolados de *P. brasiliensis*, as preparações provenientes de cepas do grupo *P. lutzii* parecem ter algumas bandas em comum, na faixa compreendida entre 100 e 60 kDa. Tais frações antigênicas, além da gp43, podem ser importantes na resposta imune de pacientes infectados por esse grupo. Camargo et. al (1989) verificaram por immunoblotting que outras frações antigênicas que não a gp43 são reconhecidas por soros de parte dos pacientes.

Em relação aos testes de imunodifusão primeiramente as 7 preparações antigênicas foram cruzados com soro de paciente considerado controle positivo. Tal soro é positivo na titulação 1:512 e o paciente é proveniente de Igarapu do Tietê, região endêmica de Botucatu. Os resultados são apresentados na Figura 3. Apenas a preparação antigênica do isolados Epm83, que já havia apresentado a banda de 43kDa na SDS-PAGE, apresentou bandas bem evidentes indicando positividade, confirmando novamente a importância da gp43 no imunodiagnóstico. Além disso, AgPb66 e AgPb8334 apresentaram bandas de intensidade bem menor. AgPb01, AgPb265, AgBt60 e AgT9B1 apresentaram resultado negativo. Como estes dois últimos já não haviam apresentado bandas na SDS-PAGE, os mesmos foram excluídos das análises posteriores.

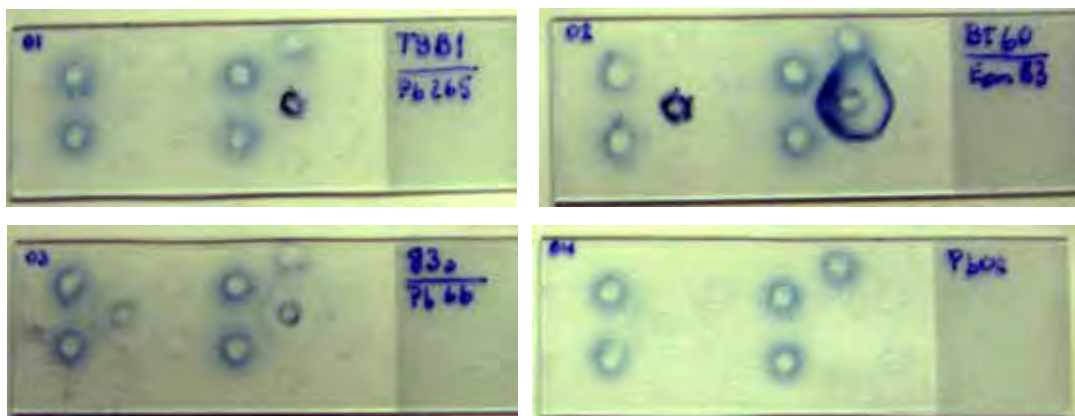


Figura 3. Imunodifusões realizadas com soro de paciente de Igarauçu do Tietê (controle positivo) e antígenos filtrado de cultura. Lâmina 1 - primeira roseta: AgT9B1; segunda roseta: AgPb265; Lâmina 2 – primeira roseta: AgBt60; segunda roseta: AgEpm83. Lâmina 3 – primeira roseta: AgPb8334; segunda roseta: AgPb66. Lâmina 4 – primeira roseta: AgPb01.

É curioso, entretanto, notar que o antígeno que apresentou bandas mais evidentes é proveniente de um isolado PS3 e o soro é de paciente provavelmente infectado por um isolado S1, já que ele é da região de Botucatu. Entretanto isolados PS3 são filogeneticamente próximos de isolados S1 (MATUTE et al., 2006; THEODORO et al., 2008a; SALGADO-SALAZAR et al., 2010), o que explicaria a reatividade apresentada quando utilizado o antígeno produzido pelo isolado Epm83, aliado ao fato de tal isolado secretar gp43.

As 5 preparações antigênicas que apresentaram bandas na SDS-PAGE e/ou reatividade com o controle positivo (AgPb265, AgEpm83, AgPb01, AgPb8334 e AgPb66) foram também submetidas a testes de imunodifusão com 9 soros de pacientes de histoplasmose para verificar se os antígenos apresentam reação cruzada com soros de pacientes desta micose. Nenhum dos antígenos positivou qualquer um dos soros.

Após os testes com o controle positivo e de reatividade cruzada, foram selecionadas 20 amostras de soros de pacientes na fase de pré-tratamento pertencentes ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu em laboratório sob responsabilidade do Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes. Tais pacientes são da região endêmica de Botucatu e 10 desses soros apresentam sorologia positiva com o antígeno padrão (AgB-339) e 10 são de pacientes confirmados por outros métodos, porém com sorologia negativa. Os resultados

são apresentados na Tabela 4. Entre os soros que reagem com o antígeno padrão, foram selecionadas amostras que o fazem nas diferentes diluições.

Tabela 4. Testes de imunodifusão com soros da região de Botucatu contra o antígeno padrão (AgB-339) e outros filtrados de cultura.

<i>Nº soro</i>	<i>AgB-339 (Título)</i>	<i>AgEpm83</i>	<i>AgPb265</i>	<i>AgPb01</i>	<i>AgPb8334</i>	<i>AgPb66</i>
10522	1/256	+	-	-	+	+
11773	1/512	+	-	-	+	+
12296	1/512	+	-	-	-	-
13066	1/16	+	-	-	+	+
13139	1/32	+	-	-	+	+
13236	1/32	+	-	-	+	+
13571	1/16	+	-	-	+	+
14029	1/512	+	-	-	-	-
14857	1/32	+	-	-	+	+
15178	1/265	+	-	-	+	+
8928	-	-	-	-	-	-
9240	-	-	-	-	-	-
10807	-	-	-	-	-	-
12081	-	-	-	-	-	-
12206	-	-	-	-	-	-
13306	-	-	-	-	-	-
14311	-	+	-	-	-	-
14368	-	-	-	-	-	-
14668	-	+	-	-	-	-
15142	-	+	-	-	-	-

AgPb265 e AgPb01, que já não haviam reagido com o controle positivo, apresentaram resultado negativo para estes 20 soros. Os antígenos AgPb8334 e AgPb66 obtiveram desempenho idêntico, positivando 8 dos 10 soros confirmados com o antígeno padrão (Figura 4) e apresentando resultado negativo para todos os 10 soros que também são negativos para o antígeno padrão. As 8 amostras de soro com resultado positivo foram concordantes para estes dois antígenos. Tal concordância pode ser devida ao fato de AgPb8334 e AgPb66 terem sido obtidos de isolados pertencentes à mesma espécie críptica, *P. lutzii*, além de apresentarem padrão eletroforético similar (Figura 2). Curiosamente, os dois soros que não apresentaram resultado positivo para esses antígenos reagem com o antígeno padrão na mais alta diluição empregada (1/512).

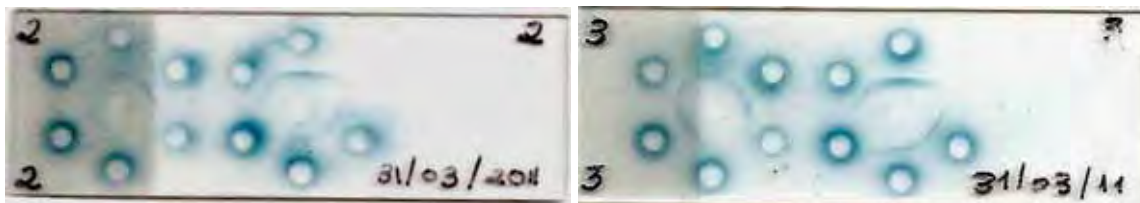


Figura 4. Imunodifusões realizadas com soros de paciente da região de Botucatu, positivos para o antígeno padrão, e antígenos filtrado de cultura. O controle positivo foi aplicado na roseta da esquerda, poço superior. Lâmina 2: AgPb66. Lâmina 3: AgPb8334.

O antígeno que obteve, novamente, os melhores resultados foi o AgEpm83 (Figura 5). Tal preparação confirmou os 10 resultados positivos obtidos com o antígeno padrão. Adicionalmente, das 10 amostras negativas com o AgB-339, 3 apresentaram sorologia positiva para o AgEpm83. Como pode ser observado, as bandas referentes a esses 3 soros são de intensidade fraca, porém tal resultado foi obtido em triplicata, e analisado por duas pessoas, permitindo afirmar que os 3 soros foram realmente reagentes para o AgEpm83. Levando-se em consideração tais resultados, e a alta secreção de gp43 observada (Figura 2) podemos sugerir o AgEpm83 como uma nova alternativa para testes de imunodifusão para os casos considerados negativos pelo antígeno padrão AgB-339, na região de Botucatu.

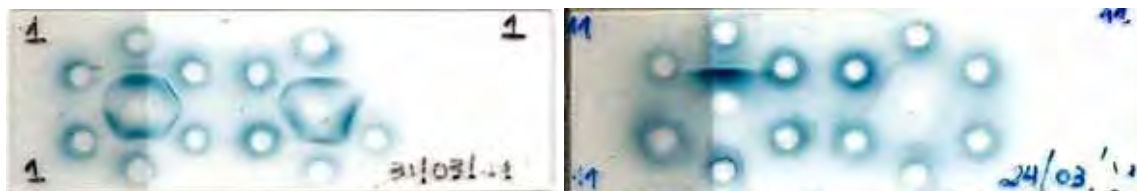


Figura 5. Imunodifusões realizadas com soros de paciente da região de Botucatu e AgEpm83 filtrado de cultura. O controle positivo foi aplicado na roseta da esquerda, poço superior. Lâmina 1: soros de pacientes reagentes para o antígeno padrão. Lâmina 11: soros de pacientes não-reagentes para o antígeno padrão.

Além disso, os resultados apresentados corroboram a informação de que a secreção de altas doses de gp43 é realmente importante para um isolado ser utilizado na produção de antígenos para emprego nos testes de imunodifusão (PUCCIA et. al, 1986), pelo menos em regiões onde a espécie S1, PS2 e PS3 é prevalente, já que em regiões onde ocorre *P. lutzii*, tal molécula não parece ter a mesma importância (BATISTA Jr. et. al, 2010). A

positividade de cada um dos antígenos com os soros da região de Botucatu são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Taxas de positividade apresentadas pelos antígenos filtrado de cultura em testes de imunodifusão com soros da região de Botucatu, reativos ou não com o antígeno padrão.

	Positividade				
	AgEpm83	AgPb265	AgPb01	AgPb8334	AgPb66
Soros reativos AgB339 (n=10)	(10/10) 100%	(0/10) 0%	(0/10) 0%	(8/10) 80%	(8/10) 80%
Soros não reativos AgB339 (n=10)	(3/10) 30%	(0/10) 0%	(0/10) 0%	(0/10) 0%	(0/10) 0%
Total (n=20)	(13/20) 65%	(0/20) 0%	(0/20) 0%	(8/20) 40%	(8/20) 40%

Além dos soros da região de Botucatu, as preparações antigênicas foram testadas contra 20 soros da região de Jundiaí, estado de São Paulo, sendo estes também 10 amostras confirmadas positivas pelo antígeno padrão e 10 amostras com resultados negativos para tal antígeno.

Mais uma vez, AgEpm83 apresentou resultado satisfatório, apresentando 45% de positividade total, contra 50% do antígeno padrão. Pode ser observado nas Tabela 6 e 7 que 3 das 10 amostras reativas com o AgB-339, apresentaram-se negativas frente ao AgEpm83. Entretanto, AgEpm83 foi capaz de positivar 2 amostras negativas para o antígeno padrão, confirmando a possibilidade da utilização do mesmo contra soros considerados negativos. Se somarmos a positividade das duas preparações, padrão e AgEpm83, teremos uma taxa de 60% de soros positivos para pelo menos um dos dois antígenos. Apesar de não ter sido obtida a positividade de todas as amostras, e considerando que o espaço amostral é positivado em 50% por AgB-339, o fato sugere que o diagnóstico com dois antígenos diferentes, no caso o padrão e o AgEpm83, ou um diagnóstico único, com um pool antigênico envolvendo os dois isolados, pode ser mais adequado para a avaliação dos soros. Tal fato, aliado aos resultados obtidos com os soros de Botucatu, sugere a aplicação de um diagnóstico sorológico conjunto entre AgEpm83 e AgB-339, para melhor avaliação de pacientes de regiões onde a espécie S1 é a responsável pela maioria das infecções.

Os antígenos produzidos a partir de isolados *P. lutzii*, AgPb01, AgPb8334 e AgPb66, apresentaram resultado semelhante positivando de 25% a 30% dos soros. Tal similaridade nos resultados reflete os perfis protéicos semelhantes das preparações

apresentados na SDS-PAGE. Curiosamente, mais da metade dessas amostras não era positivada pelo antígeno padrão (Tabela 7). Tal fato reforça a evidência que o diagnóstico seria mais adequado se realizado utilizando-se diferentes antígenos produzidos a partir de diferentes cepas, ou mesmo um pool antigênico.

Tabela 6. Testes de imunodifusão com soros da região de Jundiaí contra o antígeno padrão (AgB-339) e outros filtrados de cultura.

<i>Nº soro</i>	<i>AgB-339 (Título)</i>	<i>AgEpm83</i>	<i>AgPb265</i>	<i>AgPb01</i>	<i>AgPb8334</i>	<i>AgPb66</i>
J-771	1/4	-	-	-	-	-
J-773	1/4	+	-	-	-	-
J-1903	1/16	+	-	-	-	-
J-1906	1/16	+	+	-	-	-
J-1922	1/16	+	+	+	+	+
J-1926	1/8	+	-	-	-	-
J-4876	Puro	-	-	-	-	-
J-4877	1/16	+	-	-	-	+
J-6521	1/2	+	-	+	+	-
J-8889	1/2	-	-	-	-	+
J-753	-	-	-	-	-	-
J-767	-	-	-	-	-	-
J-1919	-	-	-	-	-	-
J-1927	-	-	-	-	-	-
J-8888	-	-	-	-	-	-
J-8891	-	-	-	+	+	+
J-8893	-	-	-	-	-	-
J-8897	-	+	-	+	+	+
J-98715	-	-	-	-	-	-
J-98717	-	+	-	+	+	+

Tabela 7. Taxas de positividade apresentadas pelos antígenos filtrado de cultura em testes de imunodifusão com soros da região de Jundiaí, reativos ou não com o antígeno padrão.

	Positividade				
	<i>AgEpm83</i>	<i>AgPb265</i>	<i>AgPb01</i>	<i>AgPb8334</i>	<i>AgPb66</i>
Soros reativos AgB339 (n=10)	(7/10) 70%	(2/10) 20%	(2/10) 20%	(2/10) 20%	(3/10) 30%
Soros não reativos AgB339 (n=10)	(2/10) 20%	(0/10) 0%	(3/10) 30%	(3/10) 30%	(3/10) 30%
Total (n=20)	(9/20) 45%	(2/20) 10%	(5/20) 25%	(5/20) 25%	(6/20) 30%



Adicionalmente, foram utilizados 31 soros de pacientes de paracoccidiodomicose da Região Centro-Oeste do Brasil, sendo 11 desses confirmados pelo antígeno padrão AgB-339 e os outros 20 apresentando resultado negativo com a mesma preparação. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

AgPb265 apresentou reatividade com 1 amostra de soro e AgPb01 não reagiu com nenhuma das amostras, evidenciando que tais isolados não são úteis para a produção de antígenos para o emprego em testes de imunodifusão.

AgEpm83, que havia apresentado resultados interessantes com os soros de pacientes do Estado de São Paulo, não repetiu o mesmo desempenho contra os soros da Região Centro-Oeste, evidenciando a dificuldade na obtenção de antígenos que positivem os soros de pacientes dessa região. Dos 11 soros com resultado positivo para o AgB-339, apenas 4 apresentaram reatividade com o antígeno produzido a partir do isolado Epm83. Das amostras negativas para o antígeno padrão, nenhuma foi positivada pelo AgEpm83.

AgPb8334 e AgPb66 apresentaram resultado semelhante ao AgEpm83 com 3 e 4 amostras positivas, respectivamente.

As taxas de positividade dos antígenos produzidos neste trabalho, com os soros da região Centro-Oeste, positivos e negativos para AgB-339, são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 8. Testes de imunodifusão com soros da Região Centro-Oeste brasileira contra o antígeno padrão (AgB-339) e outros filtrados de cultura.

<i>Nº soro</i>	<i>AgB-339 (Título)</i>	<i>AgEpm83</i>	<i>AgPb265</i>	<i>AgPb01</i>	<i>AgPb8334</i>	<i>AgPb66</i>
10528	1/32	-	-	-	-	-
12200	1/16	-	-	-	-	-
12768	1/32	+	+	-	+	+
12855	Puro	-	-	-	-	-
12856	1/8	+	-	-	+	+
12858	1/32	+	-	-	-	+
12966	Puro	-	-	-	-	-
13529	1/2	-	-	-	-	-
13532	1/16	+	-	-	+	+
14129	1/4	-	-	-	-	-
14131	1/4	-	-	-	-	-
3937/10	-	-	-	-	-	-
10700	-	-	-	-	-	-
10702	-	-	-	-	-	-
10703	-	-	-	-	-	-
10870	-	-	-	-	-	-
10871	-	-	-	-	-	-
10872	-	-	-	-	-	-
11009	-	-	-	-	-	-
12857	-	-	-	-	-	-
13525	-	-	-	-	-	-
13526	-	-	-	-	-	-
13533	-	-	-	-	-	-
13534	-	-	-	-	-	-
13941	-	-	-	-	-	-
14189	-	-	-	-	-	-
14241	-	-	-	-	-	-
14273	-	-	-	-	-	-
14277	-	-	-	-	-	-
29151/10	-	-	-	-	-	-
59954/08	-	-	-	-	-	-

Tabela 9. Taxas de positividade apresentadas pelos antígenos filtrado de cultura em testes de imunodifusão com soros da Região Centro-Oeste brasileira, reativos ou não com o antígeno padrão.

	Positividade				
	<i>AgEpm83</i>	<i>AgPb265</i>	<i>AgPb01</i>	<i>AgPb8334</i>	<i>AgPb66</i>
Soros reativos AgB339 (n=11)	(4/11) 36%	(1/11) 9%	(0/11) 0%	(3/11) 27%	(4/11) 36%
Soros não reativos AgB339 (n=20)	(0/20) 0%	(0/20) 0%	(0/20) 0%	(0/20) 0%	(0/20) 0%
Total	(4/31) 13%	(1/31) 3%	(0/31) 0%	(3/31) 10%	(4/31) 13%

## 4.2 Análise da relação dS/dN para o exon 2 do PbGP43

As análises de padrão de mutação no exon 2 do gene PbGP43 obtidas para os grupos *P. lutzii* e *P. brasiliensis* são apresentadas nas Tabelas 10 e 11, respectivamente. Como podemos observar, tanto *P. brasiliensis* quanto *P. lutzii*, apresentaram valor médio da taxa dS/dN maior que 1. Tal fato significa que o exon 2 desse gene apresenta uma taxa maior de mutações sinônimas do que não-sinônimas dentro de cada grupo, tendendo portanto, a manter uma sequência padrão de aminoácidos, o que é conhecido como seleção purificadora (NEI e KUMAR, 2000).

Ao realizar análises com os isolados Pb18 (*P. brasiliensis*) e Pb01 (*P. lutzii*), Matute et al. (2008) observaram que a mesma região gênica encontra-se sob seleção positiva, ou seja, sofre pressão evolutiva para o aumento da diversidade na sequência de aminoácidos, o que pode parecer, inicialmente, contraditório ao que foi observado neste presente trabalho. Entretanto, os autores compararam a sequência dos dois isolados com um ancestral hipotético comum aos mesmos dois isolados e a um isolado de *Histoplasma capsulatum*, o que aumentou a variabilidade entre as amostras, e conseqüentemente o número de mutações não-sinônimas na análise. Suas conclusões de que o gene estaria sob seleção positiva, aumentando a variabilidade protéica, só faz sentido por que outros genes foram analisados nas mesmas condições e apresentaram menor taxa de mutações não-sinônimas. Portanto, pode-se dizer que as taxas de mutações sinônimas e não-sinônimas são sempre valores relativos e só podem ser analisados no sentido da comparação entre duas ou mais regiões gênicas ou mesmo entre grupos geneticamente distintos. Dessa forma, o presente trabalho visou comparar as taxas médias de dS/dN dos grupos *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, e não analisá-las separadamente com a finalidade de determinar se a seleção é positiva ou purificadora.

As análises realizadas com haplótipos do grupo *P. brasiliensis* resultaram numa taxa média de dS/dN de 1,52 (Tabela 11). Para o grupo *P. lutzii* essa taxa é de 1,13 (Tabela 10). Isso significa que a sequência de aminoácidos codificada pelo gene PbGP43 dentro do grupo *P. brasiliensis* é mais conservada, enquanto em *P. lutzii* é mais variada. Matute et al. (2008) também observaram uma taxa maior de mutações não-sinônimas em *P. lutzii*. Se relacionarmos esse fato com outros dados deste trabalho, assim como outros encontrados na

literatura, podemos realizar as seguintes considerações. Em primeiro, que o aumento da variabilidade da gp43 dentro de *P. lutzii* pode estar associado a uma mudança ou perda de função da glicoproteína dentro desse grupo, já que no filtrado de cultura dos seus isolados ela é observada em pouca ou nenhuma quantidade por Batista Jr. et al. (2010) e pelo presente trabalho (Figura 2). Por essa hipótese, a gp43 em *P. lutzii* não teria função no processo de infecção, ou essa importância seria reduzida, e nem exerceria seu papel de antígeno imunodominante. Entretanto essa hipótese é duvidosa, pois a taxa de mutações não-sinônimas, apesar de ser maior que no grupo *P. brasiliensis*, não é tão elevada ao ponto de afirmar que o gene encontra-se evolutivamente à deriva e a glicoproteína degenerada. Porém, poderia ser o início do processo, com a gp43 perdendo sua função aos poucos em *P. lutzii*. Em segundo, que, como já foi exposto anteriormente, os soros de pacientes da Região Centro-Oeste brasileira, infectados em sua maioria por isolados *P. lutzii*, têm maior dificuldade de reconhecer antígenos ricos em gp43, do que pacientes infectados com S1, PS2 e PS3 (*P. brasiliensis*) (BATISTA Jr. et al, 2010). O fato pode estar relacionado a esta maior variabilidade da gp43 dentro de *P. lutzii*. Por esta hipótese, os pacientes do Centro-Oeste estariam sendo sensibilizados por formas variadas da gp43 e seus soros não seriam reativos às formas mais conservadas de gp43 expressas por isolados do grupo *P. brasiliensis*. Ao contrário da hipótese anterior, por esta visão, a gp43 teria importância também na infecção por isolados *P. lutzii*, e sua variabilidade, além de se apresentar como uma dificuldade ao diagnóstico sorológico, seria um mecanismo de escape ao hospedeiro. Tal afirmação corroboraria os dados de Matute et al. (2008) que sugeriram que o aumento de variabilidade em genes de virulência seria importante para escapar da resposta imune do hospedeiro.

Tabela 10. Padrão de mutações observados na região do exon 2 do PbGP43 nos haplótipos do grupo *P. lutzii*.

<i>Seq 1</i>	<i>Seq 2</i>	<i>Sd</i>	<i>Nd</i>	<i>S</i>	<i>N</i>	<i>ps</i>	<i>pn</i>	<i>ds</i>	<i>dn</i>	<i>ds/dn</i>
01	7455	0.00	2.00	96.50	326.50	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
01	84	0.00	1.00	96.67	326.33	0.00	0.00	-0.00	0.00	NA
01	6810	0.00	3.00	96.50	326.50	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
01	717	0.00	2.00	96.50	326.50	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
01	3171	0.00	2.00	96.50	326.50	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
01	189	1.00	1.00	96.17	326.83	0.01	0.00	0.01	0.00	3.42
01	218	0.00	2.00	96.67	326.33	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
01	133	12.75	37.25	96.67	326.33	0.13	0.11	0.15	0.12	1.17
01	769	9.62	39.38	97.17	325.83	0.10	0.12	0.11	0.13	0.81
7455	84	0.00	1.00	96.83	326.17	0.00	0.00	-0.00	0.00	NA
7455	6810	0.00	1.00	96.67	326.33	0.00	0.00	-0.00	0.00	NA
7455	717	0.00	0.00	96.67	326.33	0.00	0.00	-0.00	-0.00	NA
7455	3171	0.00	2.00	96.67	326.33	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
7455	189	1.00	3.00	96.33	326.67	0.01	0.01	0.01	0.01	1.13
7455	218	0.00	2.00	96.83	326.17	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
7455	133	12.75	37.25	96.83	326.17	0.13	0.11	0.14	0.12	1.17
7455	769	9.62	39.38	97.33	325.67	0.10	0.12	0.11	0.13	0.80
84	6810	0.00	2.00	96.83	326.17	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
84	717	0.00	1.00	96.83	326.17	0.00	0.00	-0.00	0.00	NA
84	3171	0.00	1.00	96.83	326.17	0.00	0.00	-0.00	0.00	NA
84	189	1.00	2.00	96.50	326.50	0.01	0.01	0.01	0.01	1.70
84	218	0.00	1.00	97.00	326.00	0.00	0.00	-0.00	0.00	NA
84	133	12.75	36.25	97.00	326.00	0.13	0.11	0.14	0.12	1.20
84	769	9.62	38.38	97.50	325.50	0.10	0.12	0.11	0.13	0.83
6810	717	0.00	1.00	96.67	326.33	0.00	0.00	-0.00	0.00	NA
6810	3171	0.00	3.00	96.67	326.33	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
6810	189	1.00	4.00	96.33	326.67	0.01	0.01	0.01	0.01	0.85
6810	218	0.00	3.00	96.83	326.17	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
6810	133	12.75	38.25	96.83	326.17	0.13	0.12	0.14	0.13	1.14
6810	769	9.62	40.38	97.33	325.67	0.10	0.12	0.11	0.14	0.78
717	3171	0.00	2.00	96.67	326.33	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
717	189	1.00	3.00	96.33	326.67	0.01	0.01	0.01	0.01	1.13
717	218	0.00	2.00	96.83	326.17	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
717	133	12.75	37.25	96.83	326.17	0.13	0.11	0.14	0.12	1.17
717	769	9.62	39.38	97.33	325.67	0.10	0.12	0.11	0.13	0.80
3171	189	1.00	3.00	96.33	326.67	0.01	0.01	0.01	0.01	1.13
3171	218	0.00	2.00	96.83	326.17	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
3171	133	12.75	37.25	96.83	326.17	0.13	0.11	0.14	0.12	1.17
3171	769	9.62	39.38	97.33	325.67	0.10	0.12	0.11	0.13	0.80
189	218	1.00	3.00	96.50	326.50	0.01	0.01	0.01	0.01	1.13
189	133	11.75	37.25	96.50	326.50	0.12	0.11	0.13	0.12	1.07
189	769	10.62	39.38	97.00	326.00	0.11	0.12	0.12	0.13	0.90
218	133	12.75	37.25	97.00	326.00	0.13	0.11	0.14	0.12	1.17
218	769	9.38	39.62	97.50	325.50	0.10	0.12	0.10	0.13	0.77
133	769	3.00	11.00	97.50	325.50	0.03	0.03	0.03	0.03	0.91
Mean		4.19	15.09	96.80	326.20	0.04	0.05	0.05	0.05	1.13

**Sd** = número de mutações sinônimas observadas; **Nd** = número de mutações não-sinônimas observadas; **S** = número de substituições sinônimas potenciais; **N** = número de substituições não-sinônimas potenciais; **ps** = proporção de mutações sinônimas observadas (*Sd/S*); **pn** = proporção de mutações não-sinônimas observadas (*Nd/N*); **ds** = correção de Jukes-Cantor para múltiplos valores de *ps*; **dn** = correção de Jukes-Cantor para múltiplos valores de *pn*; **ds/dn** = taxa de mutações sinônimas sobre mutações não-sinônimas.

Tabela 11. Padrão de mutações observados na região do exon 2 do PbGP43 nos haplótipos do grupo *P. brasiliensis*.

<i>Seq 1</i>	<i>Seq 2</i>	<i>Sd</i>	<i>Nd</i>	<i>S</i>	<i>N</i>	<i>ps</i>	<i>pn</i>	<i>ds</i>	<i>dn</i>	<i>ds/dn</i>
A4	V3	1.00	5.00	97.83	325.17	0.01	0.02	0.01	0.02	0.66
A4	V2	2.00	11.00	97.83	325.17	0.02	0.03	0.02	0.03	0.60
A4	V1	2.00	5.00	97.83	325.17	0.02	0.02	0.02	0.02	1.33
A4	C1	0.00	4.00	97.83	325.17	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
A4	B26	1.00	10.00	97.83	325.17	0.01	0.03	0.01	0.03	0.33
A4	B25	0.00	1.00	98.00	325.00	0.00	0.00	-0.00	0.00	NA
A4	B23	2.00	11.00	97.50	325.50	0.02	0.03	0.02	0.03	0.60
A4	B21	0.00	3.00	97.83	325.17	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
A4	B18	0.00	5.00	97.83	325.17	0.00	0.02	-0.00	0.02	NA
A4	B1	1.00	1.00	98.00	325.00	0.01	0.00	0.01	0.00	3.33
V3	V2	3.00	8.00	97.33	325.67	0.03	0.02	0.03	0.02	1.26
V3	V1	1.00	0.00	97.33	325.67	0.01	0.00	0.01	-0.00	NA
V3	C1	1.00	1.00	97.33	325.67	0.01	0.00	0.01	0.00	3.36
V3	B26	2.00	7.00	97.33	325.67	0.02	0.02	0.02	0.02	0.96
V3	B25	1.00	4.00	97.50	325.50	0.01	0.01	0.01	0.01	0.83
V3	B23	3.00	8.00	97.00	326.00	0.03	0.02	0.03	0.02	1.27
V3	B21	1.00	2.00	97.33	325.67	0.01	0.01	0.01	0.01	1.68
V3	B18	1.00	2.00	97.33	325.67	0.01	0.01	0.01	0.01	1.68
V3	B1	2.00	4.00	97.50	325.50	0.02	0.01	0.02	0.01	1.68
V2	V1	4.00	8.00	97.33	325.67	0.04	0.02	0.04	0.02	1.69
V2	C1	2.00	7.00	97.33	325.67	0.02	0.02	0.02	0.02	0.96
V2	B26	1.00	1.00	97.33	325.67	0.01	0.00	0.01	0.00	3.36
V2	B25	2.00	10.00	97.50	325.50	0.02	0.03	0.02	0.03	0.66
V2	B23	0.00	1.00	97.00	326.00	0.00	0.00	-0.00	0.00	NA
V2	B21	2.00	8.00	97.33	325.67	0.02	0.02	0.02	0.02	0.83
V2	B18	2.00	8.00	97.33	325.67	0.02	0.02	0.02	0.02	0.83
V2	B1	3.00	10.00	97.50	325.50	0.03	0.03	0.03	0.03	1.00
V1	C1	2.00	1.00	97.33	325.67	0.02	0.00	0.02	0.00	6.77
V1	B26	3.00	7.00	97.33	325.67	0.03	0.02	0.03	0.02	1.44
V1	B25	2.00	4.00	97.50	325.50	0.02	0.01	0.02	0.01	1.68
V1	B23	4.00	8.00	97.00	326.00	0.04	0.02	0.04	0.02	1.70
V1	B21	2.00	2.00	97.33	325.67	0.02	0.01	0.02	0.01	3.38
V1	B18	2.00	2.00	97.33	325.67	0.02	0.01	0.02	0.01	3.38
V1	B1	3.00	4.00	97.50	325.50	0.03	0.01	0.03	0.01	2.54
C1	B26	1.00	6.00	97.33	325.67	0.01	0.02	0.01	0.02	0.55
C1	B25	0.00	3.00	97.50	325.50	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
C1	B23	2.00	7.00	97.00	326.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.96
C1	B21	0.00	1.00	97.33	325.67	0.00	0.00	-0.00	0.00	NA
C1	B18	0.00	1.00	97.33	325.67	0.00	0.00	-0.00	0.00	NA
C1	B1	1.00	3.00	97.50	325.50	0.01	0.01	0.01	0.01	1.11
B26	B25	1.00	9.00	97.50	325.50	0.01	0.03	0.01	0.03	0.37
B26	B23	1.00	1.00	97.00	326.00	0.01	0.00	0.01	0.00	3.38
B26	B21	1.00	7.00	97.33	325.67	0.01	0.02	0.01	0.02	0.47
B26	B18	1.00	7.00	97.33	325.67	0.01	0.02	0.01	0.02	0.47
B26	B1	2.00	9.00	97.50	325.50	0.02	0.03	0.02	0.03	0.74
B25	B23	2.00	10.00	97.17	325.83	0.02	0.03	0.02	0.03	0.67
B25	B21	0.00	2.00	97.50	325.50	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
B25	B18	0.00	4.00	97.50	325.50	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
B25	B1	1.00	0.00	97.67	325.33	0.01	0.00	0.01	-0.00	NA
B23	B21	2.00	8.00	97.00	326.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.84
B23	B18	2.00	8.00	97.00	326.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.84
B23	B1	3.00	10.00	97.17	325.83	0.03	0.03	0.03	0.03	1.01
B21	B18	0.00	2.00	97.33	325.67	0.00	0.01	-0.00	0.01	NA
B21	B1	1.00	2.00	97.50	325.50	0.01	0.01	0.01	0.01	1.67
B18	B1	1.00	4.00	97.50	325.50	0.01	0.01	0.01	0.01	0.83
Média		1.45	5.04	97.42	325.58	0.01	0.02	0.02	0.02	<b>1.52</b>

**Sd** = número de mutações sinônimas observadas; **Nd** = número de mutações não-sinônimas observadas; **S** = número de substituições sinônimas potenciais; **N** = número de substituições não-sinônimas potenciais; **ps** = proporção de mutações sinônimas observadas (*Sd/S*); **pn** = proporção de mutações não-sinônimas observadas (*Nd/N*); **ds** = correção de Jukes-Cantor para múltiplos valores de *ps*; **dn** = correção de Jukes-Cantor para múltiplos valores de *pn*; **ds/dn** = taxa de mutações sinônimas sobre mutações não-sinônimas.

## 4.3 Resposta a agentes estressantes

### 4.3.1 Cloreto de sódio

Os resultados referentes ao crescimento após 20 dias das colônias de *P. brasiliensis* em meios com diferentes concentrações de sal estão expostos nas Tabelas 12, 13, 14 e 15. Cada tabela corresponde aos resultados de isolados de uma das 4 espécies crípticas. Já o crescimento após 30 dias é apresentado nas tabelas 16, 17, 18, 19. Cada isolado foi exposto a 6 concentrações diferentes de sal e em cada concentração a 4 repetições. As placas com as colônias de *P. brasiliensis* que apresentaram qualquer tipo de contaminação foram descartadas. Por esse motivo, em algumas condições apresentam-se apenas 3 e não 4 repetições.

Como se pode observar, os isolados não tiveram seu comportamento muito afetado pelo acréscimo de 10 dias ao tempo inicial de 20 dias de crescimento. Obviamente o tamanho das colônias tornou-se maior, porém as diferenças proporcionais entre as concentrações de sal foram mantidas. Por tal motivo, as comparações terão seu foco no crescimento apresentado no 20º dia de crescimento, entretanto sem esquecer que elas não teriam grandes diferenças se fossem realizadas no 30º.

De modo geral, podemos observar uma tendência de diminuição do crescimento micelial à medida que a concentração salina aumenta no meio. A maioria dos isolados já apresenta notável diminuição de crescimento quando comparados os crescimentos nos meios com concentração 0% e 1,0% de sal (Tabela 20). Quando a concentração salina atinge 1,6% praticamente todos os isolados têm seu crescimento bastante afetado, com boa parte deles tendo redução de crescimento maior que 50%. A análise de variância realizada indica que existe diferença estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações de sal, o que confirma o fato de que *P. brasiliensis* é sensível ao aumento da concentração de sal utilizada neste estudo.

Tabela 12. Diâmetro das colônias de isolados da espécie críptica S1 após 20 dias de crescimento em meio BDA com adição de diferentes percentuais de NaCl.

<i>Isolado</i>	<i>Adição de NaCl</i>	<i>Repetições (cm)</i>				<i>Média (cm)</i>
Bt60	0,0%	1,3	1,4	1,5	1,4	1,40
	0,2%	1,5	1,5	1,3	-	1,43
	0,4%	1,4	1,5	1,3	-	1,40
	0,8%	1,6	1,4	1,3	-	1,43
	1,0%	1,4	1,5	1,4	1,3	1,40
	1,6%	0,6	0,7	0,7	0,6	0,65
T9B1	0,0%	2,0	2,0	1,8	-	1,93
	0,2%	1,8	1,5	1,5	1,8	1,65
	0,4%	1,6	1,6	1,7	1,4	1,58
	0,8%	1,5	1,4	1,4	1,2	1,38
	1,0%	1,0	0,9	1,0	1,1	1,00
	1,6%	0,7	0,7	0,8	0,7	0,73
T3B6	0,0%	2,0	2,1	1,2	2,1	1,85
	0,2%	2,0	2,0	1,7	2,0	1,93
	0,4%	2,0	1,9	1,8	1,9	1,90
	0,8%	1,5	1,5	1,4	1,7	1,53
	1,0%	1,0	1,0	1,1	-	1,03
	1,6%	0,7	0,7	0,7	0,7	0,70
Pb18	0,0%	0,7	0,6	0,8	0,7	0,70
	0,2%	0,8	0,8	0,7	0,8	0,78
	0,4%	0,9	0,7	0,7	0,9	0,80
	0,8%	0,8	0,8	0,8	0,7	0,78
	1,0%	0,8	0,9	0,9	0,9	0,88
	1,6%	0,8	0,8	0,7	0,8	0,78
T4B17	0,0%	1,4	1,5	1,4	1,5	1,45
	0,2%	1,5	1,5	1,4	1,3	1,43
	0,4%	1,6	1,6	1,6	1,5	1,58
	0,8%	1,6	1,4	1,5	1,3	1,45
	1,0%	1,4	1,4	1,3	1,4	1,38
	1,6%	0,5	0,4	1,7	-	0,53



Tabela 13. Diâmetro das colônias de isolados da espécie críptica PS2 após 20 dias de crescimento em meio BDA com adição de diferentes percentuais de NaCl.

<i>Isolado</i>	<i>% NaCl</i>	<i>Repetições (cm)</i>				<i>Média (cm)</i>
Pb262	0,0%	1,3	1,5	1,6	-	1,47
	0,2%	1,8	1,4	1,4	1,4	1,50
	0,4%	1,5	1,3	1,5	1,5	1,45
	0,8%	1,3	1,5	1,3	-	1,37
	1,0%	1,3	1,2	1,2	-	1,23
	1,6%	0,8	0,7	0,8	0,6	0,73
Bt84	0,0%	2,1	2,1	1,9	-	2,03
	0,2%	2,2	2,0	1,9	2,1	2,05
	0,4%	0,9	1,0	1,1	1,8	1,20
	0,8%	1,2	1,8	1,5	1,1	1,40
	1,0%	0,7	1,2	1,2	1,1	1,05
	1,6%	0,9	0,7	0,8	-	0,80
T10B1	0,0%	2,9	3,2	3,1	-	3,07
	0,2%	2,8	2,6	2,9	2,6	2,73
	0,4%	3,0	3,0	2,9	3,0	2,98
	0,8%	1,5	2,4	2,0	-	1,97
	1,0%	1,2	1,0	1,2	-	1,13
	1,6%	0,5	0,5	0,4	0,5	0,48
Pb02	0,0%	0,9	0,8	0,8	0,7	0,80
	0,2%	0,8	0,8	0,9	0,9	0,85
	0,4%	0,8	0,8	0,6	0,7	0,73
	0,8%	0,6	0,9	0,8	0,7	0,75
	1,0%	-	-	-	-	-
	1,6%	-	-	-	-	-
Pbdog	0,0%	0,7	0,7	0,7	0,8	0,73
	0,2%	0,7	0,7	0,6	0,6	0,65
	0,4%	0,7	0,5	0,6	0,8	0,65
	0,8%	0,5	0,6	0,6	0,5	0,55
	1,0%	0,8	0,7	0,9	0,8	0,80
	1,6%	0,7	0,8	0,8	0,7	0,75

Tabela 14. Diâmetro das colônias de isolados da espécie críptica PS3 após 20 dias de crescimento em meio BDA com adição de diferentes percentuais de NaCl.

<i>Isolado</i>	<i>% NaCl</i>	<i>Repetições (cm)</i>				<i>Média (cm)</i>
Epm77	0,0%	1,8	1,5	1,9	-	1,73
	0,2%	2,0	1,6	2,0	-	1,87
	0,4%	2,0	1,7	1,7	1,7	1,78
	0,8%	1,5	1,5	1,6	1,5	1,53
	1,0%	-	-	-	-	-
	1,6%	-	-	-	-	-
Epm83	0,0%	1,5	1,6	1,4	1,4	1,48
	0,2%	1,5	1,3	1,3	1,5	1,40
	0,4%	1,2	1,5	2,0	1,4	1,53
	0,8%	1,7	1,3	2,2	-	1,73
	1,0%	1,6	1,4	1,6	1,3	1,48
	1,6%	0,8	0,8	0,9	1,0	0,88

Tabela 15. Diâmetro das colônias de isolados da espécie críptica *P. lutzii* após 20 dias de crescimento em meio BDA com adição de diferentes percentuais de NaCl.

<i>Isolado</i>	<i>% NaCl</i>	<i>Repetições (cm)</i>				<i>Média (cm)</i>
PbEE	0,0%	1,6	1,4	1,3	1,5	1,45
	0,2%	1,4	1,7	1,5	-	1,53
	0,4%	1,3	1,3	1,3	1,4	1,33
	0,8%	0,7	0,8	0,7	0,7	0,73
	1,0%	0,6	0,7	0,8	0,7	0,70
	1,6%	0,7	0,5	0,5	0,6	0,58
PbJAL	0,0%	1,1	1,1	1,4	1,5	1,28
	0,2%	1,2	1,4	1,2	0,9	1,18
	0,4%	1,3	1,3	1,1	1,4	1,28
	0,8%	1,2	0,9	1,1	1,0	1,05
	1,0%	0,9	0,9	1,0	1,0	0,95
	1,6%	0,8	0,9	0,9	0,8	0,85
Pb8334	0,0%	0,8	0,7	1,0	1,0	0,88
	0,2%	0,8	0,6	1,1	0,9	0,85
	0,4%	0,7	0,7	0,6	0,8	0,70
	0,8%	0,8	0,8	0,8	-	0,80
	1,0%	0,7	0,6	0,8	-	0,70
	1,6%	0,8	0,6	0,6	0,7	0,68
Pb01	0,0%	1,0	1,0	0,9	0,8	0,93
	0,2%	0,8	1,0	0,9	0,9	0,90
	0,4%	0,8	0,8	0,8	-	0,80
	0,8%	0,8	0,8	0,8	-	0,80
	1,0%	0,5	0,9	0,8	-	0,73
	1,6%	0,7	0,8	0,9	0,8	0,80

Tabela 16. Diâmetro das colônias de isolados da espécie críptica S1 após 30 dias de crescimento em meio BDA com adição de diferentes percentuais de NaCl.

<i>Isolado</i>	<i>Adição de NaCl</i>	<i>Repetições (cm)</i>				<i>Média (cm)</i>
Bt60	0,0%	2,4	2,3	2,5	2,3	2,38
	0,2%	2,5	1,9	2,6	-	2,33
	0,4%	2,4	2,3	2,1	-	2,27
	0,8%	2,3	2,1	2,4	-	2,27
	1,0%	1,9	2,0	1,9	2,1	1,98
	1,6%	0,8	0,7	0,8	0,8	0,78
T9B1	0,0%	2,9	2,9	2,9	-	2,90
	0,2%	2,8	2,6	2,7	2,4	2,63
	0,4%	2,3	2,8	2,6	2,8	2,63
	0,8%	2,2	1,9	2,2	2,3	2,15
	1,0%	1,6	1,6	1,7	1,8	1,68
	1,6%	0,9	1,0	0,9	1,2	1,00
T3B6	0,0%	3,5	3,6	3,7	3,8	3,65
	0,2%	3,7	3,5	3,6	3,4	3,55
	0,4%	3,5	3,6	3,1	3,2	3,35
	0,8%	2,5	2,5	2,8	2,5	2,58
	1,0%	1,8	1,9	2,0	-	1,90
	1,6%	1,0	1,1	1,0	1,2	1,08
Pb18	0,0%	1,0	1,1	0,8	1,0	0,98
	0,2%	1,2	1,1	1,1	1,3	1,18
	0,4%	1,1	1,3	1,1	1,2	1,18
	0,8%	0,9	1,2	1,3	1,1	1,13
	1,0%	1,1	1,0	1,2	1,2	1,13
	1,6%	1,0	1,0	1,0	0,9	0,98
T4B17	0,0%	2,2	2,1	1,9	2,0	2,05
	0,2%	2,1	2,1	2,0	2,0	2,05
	0,4%	2,2	2,3	2,1	2,2	2,20
	0,8%	2,0	2,1	2,1	2,3	2,13
	1,0%	2,0	1,8	1,9	-	1,90
	1,6%	0,5	0,7	1,1	-	0,77

Tabela 17. Diâmetro das colônias de isolados da espécie críptica PS2 após 30 dias de crescimento em meio BDA com adição de diferentes percentuais de NaCl.

<i>Isolado</i>	<i>% NaCl</i>	<i>Repetições (cm)</i>				<i>Média (cm)</i>
Pb262	0,0%	2,3	2,0	2,4	-	2,23
	0,2%	2,4	2,2	2,5	2,5	2,40
	0,4%	2,1	2,4	2,2	-	2,23
	0,8%	2,3	2,1	2,1	-	2,16
	1,0%	1,8	1,9	1,7	-	1,80
	1,6%	1,2	0,9	1,3	1,2	1,15
Bt84	0,0%	2,9	3,4	3,3	-	3,20
	0,2%	3,8	3,5	3,2	3,5	3,48
	0,4%	1,4	2,1	1,4	1,3	1,55
	0,8%	2,7	1,7	1,4	2,8	2,15
	1,0%	1,8	1,3	1,5	1,7	1,58
	1,6%	1,0	0,9	0,9	-	0,93
T10B1	0,0%	4,2	4,6	5,2	-	4,67
	0,2%	4,2	4,7	4,3	4,6	4,45
	0,4%	4,8	4,7	5,1	5,0	4,90
	0,8%	3,9	3,2	3,3	-	3,47
	1,0%	1,9	1,9	1,7	-	1,83
	1,6%	0,7	0,8	0,7	0,9	0,78
Pb02	0,0%	1,1	0,9	1,0	0,8	0,95
	0,2%	1,1	0,9	0,9	1,2	1,03
	0,4%	1,0	1,1	0,6	1,1	0,95
	0,8%	1,2	1,0	0,9	0,9	1,00
	1,0%	-	-	-	-	-
	1,6%	-	-	-	-	-
Pbdog	0,0%	0,8	1,1	1,0	0,9	0,95
	0,2%	0,9	0,9	0,9	0,7	0,85
	0,4%	1,0	0,9	0,7	1,0	0,90
	0,8%	0,7	0,7	0,9	0,8	0,78
	1,0%	1,0	0,8	1,0	0,9	0,93
	1,6%	1,2	1,0	0,8	0,9	0,98

Tabela 18. Diâmetro das colônias de isolados da espécie críptica PS3 após 30 dias de crescimento em meio BDA com adição de diferentes percentuais de NaCl.

<i>Isolado</i>	<i>% NaCl</i>	<i>Repetições (cm)</i>				<i>Média (cm)</i>
Epm77	0,0%	2,8	3,1	2,6	-	2,83
	0,2%	3,4	2,7	3,2	-	3,10
	0,4%	3,0	2,7	2,7	2,9	2,83
	0,8%	2,5	2,4	2,8	2,2	2,48
	1,0%	-	-	-	-	-
	1,6%	-	-	-	-	-
Epm83	0,0%	1,8	1,8	1,5	1,6	1,68
	0,2%	1,7	1,8	1,7	1,6	1,70
	0,4%	2,8	1,8	1,3	1,5	1,85
	0,8%	2,1	3,1	1,5	-	2,23
	1,0%	2,0	2,3	2,4	2,1	2,20
	1,6%	1,1	1,3	1,9	1,3	1,40

Tabela 19. Diâmetro das colônias de isolados da espécie críptica *P. lutzii* após 30 dias de crescimento em meio BDA com adição de diferentes percentuais de NaCl.

<i>Isolado</i>	<i>% NaCl</i>	<i>Repetições (cm)</i>				<i>Média (cm)</i>
PbEE	0,0%	2,3	2,2	2,0	2,0	2,13
	0,2%	2,5	2,3	2,3	-	2,37
	0,4%	2,1	2,2	2,1	2,1	2,13
	0,8%	1,1	1,3	1,0	1,1	1,13
	1,0%	0,9	0,8	0,9	-	0,87
	1,6%	0,7	0,8	0,7	0,8	0,75
PbJAL	0,0%	2,1	2,5	2,3	2,5	2,35
	0,2%	2,3	2,6	2,5	2,5	2,48
	0,4%	2,8	2,2	3,0	2,2	2,55
	0,8%	1,7	2,2	2,0	1,9	1,95
	1,0%	1,1	1,2	1,2	1,1	1,15
	1,6%	1,0	1,1	1,2	1,0	1,08
Pb8334	0,0%	1,5	1,4	1,6	1,8	1,58
	0,2%	1,9	1,5	1,9	1,7	1,75
	0,4%	1,3	1,3	1,4	1,7	1,43
	0,8%	1,3	1,5	1,4	-	1,40
	1,0%	1,5	1,0	1,3	-	1,27
	1,6%	1,2	1,1	1,3	1,4	1,25
Pb01	0,0%	1,2	1,1	1,2	1,4	1,58
	0,2%	1,4	1,2	1,0	1,2	1,75
	0,4%	1,0	1,0	1,1	-	1,43
	0,8%	1,1	1,3	1,0	-	1,40
	1,0%	1,1	1,0	0,7	-	1,27
	1,6%	0,8	1,0	1,1	1,0	1,25

Tabela 20. Efeito no crescimento dos isolados de *P. brasiliensis* em meio BDA com adição de 1% de NaCl em comparação com o controle, sem adição de sal.

<i>Espécie críptica</i>	<i>Isolado</i>	<i>Efeito</i>
S1	Bt60	0%
	T9B1	-48%
	T3B6	-44%
	Pb18	+26%
	T4B17	-5%
PS2	Pb262	-17%
	Bt84	-48%
	T10B1	-63%
	Pbdog	+9%
PS3	Epm83	0%
<i>P. lutzii</i>	PbEE	-52%
	PbJAL	-26%
	Pb8334	-21%
	Pb01	-22%

Analisando individualmente cada espécie podemos observar que na concentração salina de 1,0% todos os isolados *P. lutzii* têm seu crescimento fortemente afetados, sendo que a diminuição de crescimento em todos seus 4 isolados atinge níveis maiores ou iguais a 20% (Tabela 20). É importante notar que esta espécie é a mais afetada pelo estresse salino já que uma diminuição de crescimento maior ou igual a 20% ocorre apenas em 2 dos 5 isolados S1 e 2 dos 4 isolados PS2. O único isolado pertencente à espécie PS3 submetido a essa concentração de sal, Epm83, não sofreu diminuição de crescimento.

A espécie S1 apresenta isolados com comportamento bastante variável em relação à resposta ao estresse salino. Ao mesmo tempo em que os isolados Pb18, Bt60 e T4B17 não sofrem diminuição de crescimento em concentrações intermediárias de sal, os isolados T3B6 e T9B1 já apresentam queda brusca de crescimento nessas concentrações, principalmente o T9B1 que reduz seu crescimento em cerca de 15% já na concentração relativamente baixa de 0,2% de sal. Aliás, é o único isolado que apresenta tal diminuição de crescimento nessa concentração. No outro extremo temos o Pb18, que não é afetado nem na maior dose salina de 1,6%. Em concentrações intermediárias seu crescimento é até estimulado pelo aumento da concentração salina. Importante ressaltar que este isolado é o mais empregado como “modelo” nos diversos estudos da PCM e o mesmo vem sendo mantido em laboratório há mais de 80 anos (HEBELER-BARBOSA et al., 2003). A



possibilidade de surgimento de variantes genéticas em cepas de *P. brasiliensis* mantidas em laboratório por bastante tempo, já foi sugerida por Macoris et al. (2006). Uma hipótese para esta alta resistência do Pb18 ao estresse salino poderia estar relacionada a uma possível desativação de mecanismos de resposta ao estresse nesta cepa. Alguns mecanismos de resposta ao estresse envolvem a ativação de alguns genes, ao mesmo tempo em que diminuem a expressão de outros (KAMEI et al., 1992), podendo levar também a uma diminuição do crescimento e divisão celular, mecanismos estes que poderiam estar “desligados” na cepa Pb18, em função da sua longa permanência em meios de cultivo, em condições controladas.

Da mesma forma que S1, PS2 e PS3 também parecem ter comportamento bastante variável sendo que PS2 parece ter tendência a ser um pouco mais sensível às concentrações intermediárias de sal e PS3 a ser um pouco mais resistente (Tabela 20). Como realizamos essas análises com apenas 2 isolados de PS3, é difícil inferirmos qualquer coisa sobre a espécie colombiana. Entretanto chama atenção sua resistência ao sal em concentrações intermediárias, principalmente do isolado Epm83 que só sofre diminuição de crescimento na concentração de 1,6%.

De uma forma geral, podemos inferir que existe grande variação do grau de resistência ao estresse salino entre os isolados, sendo que pela análise de variância existe efeito de interação entre concentrações salinas e diferentes isolados. Entretanto, por existir grande variação dentro das espécies crípticas não é tão simples afirmar que determinada espécie tem um padrão diferente de todos os isolados das outras espécies. A resposta diferencial em relação às concentrações de sal parece estar muito mais em nível de isolado do que em nível de espécie. Entretanto o fato da espécie *P. lutzii* apresentar crescimento mais afetado pelas concentrações intermediárias de sal, principalmente a 1%, onde outras espécies não são tão afetadas, não deve ser desprezado. Tal observação pode ser um indício de que os isolados *P. lutzii*, pertencentes à Região Centro-Oeste brasileira, sejam, no geral, os mais afetados por determinadas concentrações salinas.

### 4.3.2 pH

Os valores de absorvância obtidos em espectrofotômetro após ensaio de XTT e referentes ao crescimento leveduriforme de *P. brasiliensis* em meios pH 3,8 e 6,4 estão apresentados na Tabela 21. As médias desses valores foram obtidas entre as repetições e uma razão entre os resultados com pH 3,8 e pH 6,4 foi obtida para cada isolado, onde o primeiro é o denominador e o segundo o denominador. Resultados mais próximos de 0 mostram que o isolado sofre déficit maior de crescimento e viabilidade em substrato com pH ácido. Resultados mais próximos de 1 demonstram uma maior adaptação do isolado a meios ácidos. Surpreendentemente, obtivemos em alguns poucos isolados resultados maior que 1, o que, teoricamente, significaria um aumento de crescimento e viabilidade em meios acidificados.

Como podemos observar através desses valores, a resposta ao pH ácido é bastante variável dentro de *P. brasiliensis*. Em alguns isolados (Bt60 e EE) essa razão foi superior a 1,4, demonstrando que esses isolados têm maior taxa de multiplicação e/ou viabilidade em pH 3,8. Por outro lado, algumas cepas foram fortemente afetadas em meio ácido. É o caso do Pb66 que apresentou uma razão de 0,34. Outros isolados apresentaram valores muito próximos de 1, demonstrando indiferença à acidificação do meio. Existem relatos de recuperação de leveduras viáveis após passagem pelo trato gastrointestinal de roedores (Dra. Ayako Sano, não publicado), além do isolamento de *P. brasiliensis* a partir de fezes de pingüins (GUEZELLE, 1989). Desta forma, os dados do presente trabalho corroboram tais fatos, já que foi demonstrado que algumas cepas podem manter sua viabilidade em valores de pHs relativamente baixos, semelhantes aos encontrados em determinadas regiões do trato gastrointestinal.

Apesar de existirem mais isolados sendo afetados negativamente pelo pH ácido, através do experimento não é possível afirmar que há diferença estatisticamente significativa entre os 2 valores de pH testados. Os valores obtidos através de análise de variância não nos permitem inferir que o *P. brasiliensis*, no geral, é afetado nessas condições utilizadas, provavelmente devido a um coeficiente de variação relativamente alto, ou seja, ocorrência de variação dentre repetições e dentre isolados pertencentes à mesma espécie. O aumento do número de isolados utilizados poderia ser uma medida

importante para termos a confirmação se há ou não uma tendência na diminuição do *fitness* em cepas de *P. brasiliensis* em pH abaixo de 4.

Como a variação intraespecífica é bastante grande não podemos também afirmar que existe uma tendência de uma ou outra espécie críptica ser mais adaptada em ambientes ácidos. Assim como o experimento envolvendo concentrações diferentes de sal, as variações além de ocorrer entre as espécies ocorrem principalmente entre as cepas. O fato de essas cepas serem mantidas há certo tempo em laboratório, subcultivadas sistematicamente em condições teoricamente ideais, da mesma forma que para a resposta ao estresse salino, pode influenciar também nesse tipo de ensaio, fazendo as mesmas perderem suas características selvagens.

Tabela 21 – Absorbâncias em espectrofotômetro após crescimento de isolados de *P. brasiliensis* por 15 dias em meios com diferentes valores de pH e subsequente ensaio com XTT.

<i>Espécie</i>	<i>Isolado</i>	<i>pH</i>	<i>Repetições</i>				<i>Média</i>	<i>Razão</i>
S1	T3B6	3,8	0,107	0,084	0,123	0,175	0,122	0,608
		6,4	0,220	0,265	0,177	0,142	0,201	
	Pb18	3,8	0,163	0,276	0,079	0,216	0,184	0,689
		6,4	0,208	0,311	0,300	0,246	0,266	
	Bt60	3,8	0,127	0,150	0,066	0,183	0,132	1,453
		6,4	0,089	0,039	0,088	0,146	0,091	
	Pb265	3,8	0,195	0,185	0,210	0,212	0,201	1,138
		6,4	0,184	0,158	0,161	0,202	0,176	
	T4B17	3,8	0,467	0,595	0,609	0,585	0,564	0,964
		6,4	0,614	0,528	0,628	0,570	0,585	
PS2	T10B1	3,8	0,591	0,533	0,474	0,609	0,552	0,986
		6,4	0,420	0,641	0,678	0,500	0,560	
PS3	Epm83	3,8	0,156	0,111	0,275	0,272	0,204	0,991
		6,4	0,124	0,237	0,240	0,220	0,205	
<i>P. lutzii</i>	Pb66	3,8	0,007	0,110	0,020	0,016	0,038	0,344
		6,4	0,124	0,237	0,240	0,220	0,111	
	Pb8334	3,8	0,127	0,108	0,009	0,063	0,077	0,843
		6,4	0,162	0,037	0,102	0,063	0,091	
	PbEE	3,8	0,203	0,311	0,273	0,217	0,251	1,416
		6,4	0,188	0,302	0,050	0,169	0,177	
	PbJAL	3,8	0,444	0,585	0,550	0,615	0,549	0,862
		6,4	0,649	0,645	0,713	0,537	0,636	
	Pb01	3,8	0,589	0,532	0,615	0,639	0,594	0,971
		6,4	0,661	0,531	0,704	0,550	0,612	

## 5. CONCLUSÕES

- O emprego do antígeno filtrado de cultura AgEpm83, do grupo PS3, associado ao antígeno padrão, pode ser útil para reduzir taxas de negatividade em testes de imunodifusão apresentadas por soros de pacientes de paracoccidioidomicose nas regiões onde S1, semelhante à PS3, é a espécie críptica prevalente;
- Nenhuma das preparações antigênicas foi capaz de apresentar resultados semelhantes ou superiores ao antígeno padrão em testes com pacientes da Região Centro-Oeste;
- Confirmou-se a dificuldade para a produção de antígenos a serem utilizados em imunodifusões com soros de pacientes da Região Centro-Oeste;
- Uma maior taxa de mutações não-sinônimas no gene da gp43, com conseqüente maior diversidade desta molécula em *P. lutzii*, poderia estar contribuindo para uma maior dificuldade no reconhecimento deste antígeno por soros de pacientes infectados.
- Isolados *P. lutzii* parecem ter, no geral, seu crescimento mais afetado em concentrações crescentes de sal que as outras espécies crípticas. Porém, a variação da resposta a esse tipo de estresse parece estar acontecendo mais em nível de isolado do que de grupos genéticos;
- Não foi possível estabelecer uma relação entre espécies crípticas de *P. brasiliensis* e alteração de crescimento e viabilidade em meios acidificados, nas condições utilizadas neste trabalho. Novamente, foi observado que a variabilidade acontece muito mais entre isolados do que entre espécies;
- Alguns isolados são capazes de suportarem baixos valores de pH, o que poderia ser importante uma característica importante na adaptação do fungo aos seus nichos ecológicos e possível sobrevivência no trato gastrointestinal de mamíferos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **An. Fac. Med. São Paulo**, v.5, p.125-41, 1930.

BAGAGLI, E., SANO, A., COELHO, K. I. R., ALQUATI, S., MIYAJI, M., CAMARGO, Z. P., GOMES, G., FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in na endemic área of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. & Hyg.** v.58, p.505-12, 1998.

BAGAGLI, E., FRANCO, M., BOSCO, S. M. G., HEBELER-BARBOSA, F., TRINCA, L. A., MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillo (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med. Mycol.** v.41, p. 217-23, 2003.

BAGAGLI, E., THEODORO, R. C., BOSCO, S. M. G., McEWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathol.**, v.165, n.4-5, p.197-207, 2008.

BARBOSA, W. **Blastomicose sul-americana. Contribuição ao seu estudo no Estado de Goiás.** Goiânia, 1968. Tese (Livre Docência) Universidade Federal de Goiás.

BATISTA Jr, J., CAMARGO, Z. P., FERNANDES, G. F., VICENTINI, A. P., FONTES, C. J. F., HAHN, R. C. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? **Mycoses**, v.53(2), p.176-80, 2010.

---

\*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

BERZAGHI, R., SILVA, S. H., CAMARGO, Z. P. Variable gp43 secretion by *Paracoccidioides brasiliensis* clones obtained by two different culture methods. *J. Clin Microbiol.* v.43, p.491-3, 2005.

BITTENCOURT, J. I. M., OLIVEIRA, R. M., COUTINHO, Z. F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Cad. Saude Publica**, v.21(6), p. 1856-64, 2005.

BLOTTA, M. H. S. L., CAMARGO, Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.** v.31, p.671-6, 1993.

BRUMER, E., CASTANEDA, E., RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical microbiology reviews**, v.6, n.2, p.89-117, 1993.

CALCAGNO, A. M., NINO-VEGA, G., SAN-BLAS, F., SAN-BLAS, G. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.36(6), p.1733-6, 1998.

CAMARGO, Z. P., UNTERKIRCHER, C., TRAVASSOS, LR. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. **J. Med. Vet. Mycol.** v.27(6), p.407-12, 1989.

CANO, M. I. N., CISALPINO, P. S., GALINDO, I., RAMIREZ, J. L., MORTARA, R. A., SILVEIRA, J. F. Eletrophortic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.742-7, 1998.

CARMO J. P., DIAS-MELICIO L. A., CALVI S. A., PERAÇOLI M. T. S., SOARES A. M. V. C. TNF- $\alpha$  activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – dependent mechanism. **Med. Mycol.**, v.44, p.363-8, 2006.

CARRERO, L. L., NIÑO-VEGA, G., TEIXEIRA, M. M., CARVALHO, M. J. A., SOARES, C. M. A., PEREIRA, M., JESUÍNO, R. S. A., McEWEEN, J. G., MENDOZA, L., TAYLOR, J. W., FELIPE, M. S., SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet. Biol.**, v.45(5), p.605-12, 2008.

CARVALHO, K. C., GANIKO, L., BATISTA, W. L., MORAIS, F. V., MARQUES, E. R., GOLDMAN, G. H., FRANCO, M. F. e PUCCIA, R. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype, **Microb. Infect.**, v. 7, p.55–65, 2005.

CONTI-DÍAZ, I. A., CALLEGARI, L. F. Paracoccidioidomycosis en Uruguay: su estado y problemática actuales. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.86, p.219-27, 1979.

CORDEIRO, R. A., BRILHANTE, R. S. N., ROCHA, M. F. G., FECHINE, M. A. B., CAMARA, L. M. C., CAMARGO, Z. P., SIDRIM, J. J. C. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from Northeast Brazil. **Med. Mycol.**, v.44, p.631-9, 2006.

COUTINHO, Z. F., SILVA, D., LAZÉRA, M., PETRI, V., OLIVEIRA, R.M., SABROZA, P.C., WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública**, v.18(5), p.1441-5, 2002.

ELIAS-COSTA, M. R., LACAZ, C. S., KAWASAKI, M., CAMARGO, Z. P. Convencional versus molecular diagnostic tests. **Med Mycol.** v.38(1), p.139-45, 2000.

FARIAS, M. R., WERNER, J., MURO, M. D., MARQUES, S. A., MARQUES, M. E. A., FRANCO, M. F., RIBEIRO, M. G., CUSTÓDIO, C. C., CONDAS, L. A. Z., BOSCO, S. M. G., BAGAGLI, E. Canine paracoccidioidomycosis: case report of generalizad lymphadenitis. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.47(14), p.64, 2005.

FERREIRA-CRUZ, M. F., FRANCESCONI-DO-VALE, A. C., ESPINERA, M. C., WAMKE, B., GALVÃO-CASTRO, B. O. Study of antibodies in paracoccidioidomycosis: follow-up of patients during and after treatment. **J. Med. Vet. Mycol.** v.28(2), p.151-7, 1990.

FERRI, R. G. Estudo imunoquímico de antígenos intracelulares. **Hospital**, v.58, 917-24, 1961.

FISHER, M.C., KOENIG, G.L., WHITE, T.J., TAYLOR, J.W. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. **Mycol.**, v.94 (1), p.73-84, 2002.

FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R. G., MENDES, R. P., MARQUES, S. A., DILLON, N. L., MOTTA, N. G. S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.20(2) p.129-32, 1987.

FRANCO, M., SANO, A., KERA, K., NISHIMURA, K., TAKEO, K., MIYAJI, M. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.31, p.151-7, 1989.

FRANCO, F., LACAZ, C. S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Estados Unidos da América, CRC Press, Inc., 1994.

FRANCO, M., BAGAGLI, E., CUNHA, M., CHAMA, L. G., FECCHIO, D. *Paracoccidioides brasiliensis* antigens batches from the same isolate show immunological and biochemical differences. **Mycopathol.**, v.135, p.13-9, 1996.

GESZTESI, J. L., PUCCIA, R., TRAVASSOS, L. R., VICENTINI, A. P., MORAES, J. Z., FRANCO, M. F., LOPES, J. D. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. **Hybridoma** v.15, p.415-22, 1996.



GIRALDO, R., RESTREPO, A., GUTIÉRREZ, F., ROBLEDO, M., LONDOÑO, F., HERNANDES, H., SIERRA, F., CALLE, G. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. **Mycopathol.**, v.58, p.63-70, 1976.

GONZALES, M., DUGAN, J., SHAFER, R. Synonymous-non-synonymous mutation rates between sequences containing ambiguous nucleotides (Syn-SCAN). **Bioinformatics**, v.18, p.886–7, 2002.

GUEZELLE, E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. de heces de pinguino de la Antártida. **Resúmenes IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis**, Caracas, Venezuela, 1989.

HAHN, R. C., FONT'S, C. J., BATISTA, R. D., HAMDAN, J. S. In vitro comparison of activities of terbinafine and itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.2828-31, 2002.

HAHN, R. C., MORATO CONCEIÇÃO, Y. T., SANTOS, N. L., FERREIRA, J. F., HAMDAN, J. S. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**, v.46, p.342-47, 2003.

HEBELER-BARBOSA, F., MONTENEGRO, M. R., BAGAGLI, E. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med. Mycol.**, v. 41, p.89–96, 2003.

KAMEI, K., BRUMMER, E., CLEMONS, K.V., STEVENS, D.A. Induction of stress protein synthesis in *Histoplasma capsulatum* by heat, low pH and hydrogen peroxide. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.30, p.385-93, 1992.

KUROKAWA, C. S., LOPES, C. R., SUGIZAKI, M. F., KURAMAE, E. E., FRANCO, M. F., PERAÇOLI, M. T. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.47, p.257-62, 2005.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: Morphology; Evolutionary Cycle; Maintenance during Saprophytic Life; Biology, Virulence, Taxonomy. In: **Paracoccidioidomycosis** Eds: FRANCO, F., LACAZ, C. S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. Estados Unidos da América, CRC Press, Inc., p.13-25, 1994.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C., HEINS-VACCARI, E. M., MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**, São Paulo, Ed. Sarvier, 9 ed., 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-5, 1970.

LI, W., METIN, B., WHITE, T. C., HEITMAN, J. Organization and Evolutionary Trajectory of the Mating Type (MAT) Locus in Dermatophyte and Dimorphic Fungal Pathogens. **Eukariot. Cell**, v.9(1), p.46-58, 2010.

LONDERO, A. T., RAMOS, C. D. Paracoccidioidomicose: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. **J. Pneumol.**, v.16, p.129-32, 1990.

LUTZ, A. Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. **Bras. Med.**, v.22, p.121-4, 141-4, 1908.

MACORIS, S. A. G., SUGIZAKI, M. F., PERAÇOLI, M. T. S., BOSCO, S. M. G., HEBELER-BARBOSA F., SIMÕES, L. B., THEODORO, R. C., TRINCA, L. A., BAGAGLI, E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101(3), p.331-4, 2006.

MATUTE, D. R., McEWEN, J. G., MONTES, B. A, SAN-BLAS, G., BAGAGLI, E., RAUSCHER, J. T., RESTREPO, A., MORAIS, F., NINO-VEJA, G., TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol. Evol**, v.23, p.65-73, 2006.

MATUTE, D. R., QUESADA-OCAMPO, L. M., RAUSCHER, J. T., McEWEN, J. G. Evidence for positive selection in putative virulence factors within the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v.2(9), 2008.

MARINI, M. M., ZANFORLIN, T., SANTOS, P. C., BARROS, R. R. M., GUERRA, A. C. P., PUCCIA, R., FELIPE, M. S. S., BRIGIDO, M., SOARES, C. M. A., RUIZ, J. C., SILVEIRA, J. F., CISALPINO, P. S. Identification and characterization of *Tc1/mariner*-like DNA transposons in genomes of the pathogenic fungi of the *Paracoccidioides* species complex. **BCM Genomics**, v.11, p.130, 2010.

McEWEN, J. G., SUGAR, A. M., BRUMMER, E., RESTREPO, A., STEVENS, D. A. Toxic effect of products of oxidative metabolism on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Microbiol.**, v.18 p.423-8, 1984.

McEWEN, J.G., BEDOYA,V., PATINO, M.M., SALAZAR, M.E., RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.25, p.165-75, 1987.

MENDES-GIANINNI, M.J.S., MORAES, R.A., RICCI, T.A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.32, p.384-5, 1990a.

MENDES-GIANNINI, M. J. S., BUENO, J. P., SHIKANAIYASUDA, M. A., STOLF, A. M., MASUDA, A., AMATO NETO, V., FERREIRA, A. W. Antibody response to 43KDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.43, n.2, p.200-6, 1990b.

MENDES-GIANNINI, M. J., ANDREOTTI, P. F., VINCENZI, L. R., DA SILVA, J. L., LENZI, H. L., BENARD, G., ZANCOPE-OLIVEIRA, R., MATOS GUEDES, H. L., SOARES, C. P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v.8, p.1550–9, 2006.

MOLINARI-MADLUM, E. E. W. I., FELIPE, M. S. S., SOARES, C. M. A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Med. Mycol.**, v.37, p.269-76, 1999.

MONTOYA, A. E., ALVAREZ, A. L., MORENO, M. N., RESTREPO, A., McEWEN, J.G., Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*, **Med. Mycol.**, v.37, p.219–22, 1999.

MONTOYA, A. E., MORENO, M. N., RESTREPO, A., McEWEN, J. G., Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*, **Fungal Genet. Biol.**, v.21, p.223-7, 1997.

MORAIS, F.V., BARROA, T.F., FUKADA, M.K., CISALPINO, P.S., PUCCIA, R. Polymorphism in the Gene Coding for the Immunodominant Antigen gp43 from the Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.3960-6, 2000.

MOREIRA, A. P., DIAS-MELICIO, L. A., PERAÇOLI, M. T. S., CALVI, S. A., SOARES, A. M. V. C. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  activated murine peritoneal macrophages: evidence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO effector mechanisms. **Mycopathol.**, v.166, p.17-23, 2008.

MOURA-CAMPOS, M. C. R., GESZTESI, J. L., VINCENTINI, A. P., LOPES, J. D., CAMARGO, Z. P. Expression and isoforms of gp43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.33, p.223-7, 1995.

NAIFF, R. D., FERREIRA, L. C. P., BARRTE, T. V., NAIFF, M. F., ARIAS, J. R. Paracoccidioidomycose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo.** v.28, p.19-27, 1986.

NASCIMENTO, T., MARTINEZ, R., LOPES, A.R., BERNARDES, L.A.D., BARCO, C.P., GOLDMAN, M.H.S., TAYLOR, J.W., McEWEEN, J.G., NOBREGA, M.P., NOBREGA, F.G., GOLDMAN, G.H. Detection and selection of microsatellites in the genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as molecular markers for clinical and epidemiological studies. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.5007-14, 2004.

NEI, M., GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Mol. Biol. Evol.** v.3, p.418-26, 1986.

NEI, M., KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics.** New York, Oxford University Press, 2000.

NINO-VEGA, G. A., CALCAGNO, A. M., SAN-BLAS, G., SAN-BLAS, F., GOODAY, G. W., GOW, N. A. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.38, p.437-41, 2000.

OUCHTERLONY, O. **In vitro method for testing the toxic-producing capacity of diphtheria bacteria.** 8th Scandinavian Congress, 1947.

PALMEIRO, M., CHERUBINI, K., YURGEL, L. S., Paracoccidiodomicose – revisão de literatura. **Scientia Medica**, v.15(4), p.274-8, 2005.

PANIAGO, A.M., AGUIAR, J.I., AGUIAR, E.S., DA CUNHA, R.V., PEREIRA, G.R., LONDERO, A.T., WANKE, B. Paracoccidiodomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, p.455-9, 2003.

PUCCIA, R., SCHENKMAN, S., GORIN, P. A. J., TRAVASSOS, L. R., Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*. Identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, v.53, p.199–206, 1986.

RESTREPO, A., SALAZAR, M. E., CANO, L. E., STOVER, E. P., FELDMAN, D. & STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Implications for resistance of females to paracoccidiodomycosis. **Infection and Immunity**, v.46, p.346-53, 1984.

RICCI, G., MOTA, F. T., WAKAMATSU, A., SERAFIM, R. C., BORRA, R. C., FRANCO, M. Canine paracoccidiodomycosis. **Med. Mycol.** v.42, p.379-83, 2004.

RODRÍGUEZ, C., PIÑATE, F. M. La paracoccidiodosis brasiliensis en Venezuela. Estudio de 120 casos. Observaciones clínicas. **Gaceta Medica de Caracas**, v.64, p.101-39, 1966.

ROMANI, L. The T cell response against fungal infections. **Curr. Opin. Immunol.**, v.9, p.484-90, 1997.

RONQUILLO, T. E. F. Contribuição ao estudo da paracoccidiodomicose na República do Equador. **Revista de Patologia Tropical**, v.12, p.345-419, 1983.

SALGADO-SALAZAR, C., JONES, L. R., RESTREPO, A., McEWEN, J. G. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics**, v.26, p.1-12, 2010.

SALINA, M. A., SHIKANAI-YASUDA, M. A., MENDES, R. P., BARRAVIERA, B., MENDES-GIANNINI, M. J. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine before and during treatment. **J. Clin. Microbiol.** v. 36(6), p.1723-8, 1998.

SOARES, E. E., MADLUN, C. M., SILVA, S. P., PEREIRA M., FELIPE, M. S. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.33 p.505-7, 1995.

SPLENDORE, A. Zymonematozi com localizzazione nella cavità della bocca, osservata in Brasile. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v.5, p.313-9, 1912.

TAKAYAMA, A., ITANO, E. N., SANO, A., ONO, M. A., KAMEI, K. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. **Med. Mycol.**, 99999:1, 2009.

TEIXEIRA, M. M., THEODORO, R. C., CARVALHO, M. J. A., FERNANDES, L., PAES, H. C., HAHN, R. C., MENDOZA, L., BAGAGLI, E., SAN-BLAS, G., FELIPE, M. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol. Phylog. Evol.**, v.52(2), 273-83, 2009.

TERÇARIOLI, G.R., BAGAGLI, E., REIS, G.M., THEODORO, R.C., BOSCO, S.M.G., MACORIS, S.A.G., RICHINI-PEREIRA, V.B. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiology**, v. 7(92), p.1-8, 2007.

THEODORO, R. C., BOSCO, S. M. G., SUGIZAKI, M. F., BAGAGLI, E. Variation on mycelial-to-yeast phase transition and production of conidia in different isolates of *Paracoccidioides brasiliensis* obtained from human, armadillo and dog. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v. 47(14), p.45, 2005.

THEODORO, R. C., BAGAGLI, E., OLIVEIRA, C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. **Fungal Genet. Biol.**, v.45(9), p.1284-91, 2008a.

THEODORO, R. C., BOSCO, S. M. G., ARAÚJO Jr., J. P., CANDEIAS, J. M., MACORIS, S. A. G., TRINCA, L. A., BAGAGLI, E. Dimorphism, thermal tolerance, virulence and Heat Shock Protein 70 transcription in different isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia.** v.165, p. 355-65, 2008b.

THEODORO, R. C. **Gênero *Paracoccidioides*: especiação e análise do intein PRP8.** Tese de Doutorado, UNESP, Botucatu, 2010.

UNTEREINER, W. A., SCOTT, J. A., NAVEAU, F. A., SIGLER, L., BACHEWICH, J., ANGUS, A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycol.** v. 96(4), p.812-21, 2004.

VALLE, A. C. F., WANKE, B., WANKE, N. C. F., PEIXOTO, T. C., PEREZ, M. Tratamento da paracoccidioidomicose: Estudo retrospectivo de 500 casos. I – Análise clínica, laboratorial e epidemiológica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.67, p.251-4, 1993.

VERAS, K. N. **Paracoccidioidomicose: Estudo Epidemiológico e Clínico de Pacientes Internados no Hospital de Doenças Infecto-contagiosas (HDIC) em Teresina, Piauí. Identificação de Reservarias nos Estados do Pará e Maranhão.** Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1995.



VICENTINI, A.P, GESZTESI, J., GESZTESI, J.L., FRANCO, M.F. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v.62, p.1465-9, 1994.

VICENTINI-MOREIRA, A. P. Paracoccidioidomycose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **BEPA**, v.5(51), p.11-24, 2008.

WANKE, B. & LONDERO, A. T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis Infection. In: **Paracoccidioidomycosis**. FRANCO, M. F., LACAZ, C. S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. (Eds). Boca Raton, London, CRR Press, cap.7, 1994.