

Karolina Rosa Fernandes Beraldo

Comparação do perfil antigênico de
Paracoccidioides brasiliensis e *Paracoccidioides lutzii*
para o imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Prof^a Dra. Adriana Pardini Vicentini

São Paulo

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Beraldo, Karolina Rosa Fernandes

Comparação do perfil antigênico de *Paracoccidioides brasiliensis* e *paracoccidioides lutzii* para o imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose/Karolina Rosa Fernandes Beraldo. – 2018.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dra. Adriana Pardini Vicentini.

1. *Paracoccidioides*. 2. Paracoccidioidomicose. 3. Antígenos de Fungos. 4. Testes sorológicos.

SES/CCD/CD-365/2018

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz.

Apoio financeiro:

Instituto Adolfo Lutz de São Paulo –
Coordenadoria de Controle de Doenças –
SES/SP (CTC-IAL#43-D/2011)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior (bolsa de mestrado)

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Ivan Fernandes e Luciana Caetano Rosa Fernandes, a minha carinhosa irmã Ana Clara Rosa Fernandes e ao meu amado esposo Emidio Beraldo Neto.

Agradecimentos

Primeiramente devo agradecer a Deus, não só pela oportunidade de realizar este projeto, mas pelas pessoas que colocou em meu caminho e pela força para passar pelas provações que fizeram a mim e ao trabalho maiores.

A minha família, por me apoiar incondicionalmente, aos meus pais Ivan Fernandes, Luciana Caetano Rosa Fernandes, a minha irmã Ana Clara Rosa Fernandes, e aos meus avós por terem me dado o melhor a vida toda....O melhor exemplo, a melhor inspiração, o melhor abraço e a melhor história. O exemplo e ensinamento de vocês estão em mim e em tudo que faço. Ao meu marido Emidio Beraldo Neto que me segurou e acreditou em mim em momentos que nem eu acreditei e compartilhou comigo todas as alegrias e inseguranças deste trajeto. Meu companheiro para a vida!

A minha orientadora, Dra. Adriana Pardini Vicentini, pela confiança de me acolher em seu laboratório, por tentar sempre passar o máximo de conhecimento possível. Pela paciência e exigência que tornaram esse trabalho bonito. Quero que saiba que realmente aprendi muito com você, obrigada.

Devo agradecer também a querida equipe do Laboratório de Imunodiagnostico das Micoses. Mayra Simioni Zaparoli, pelas risadas e por mostrar que sempre há uma comida e uma música possível para todas as situações. Lúcia Cupertino Barreto, que com seu jeito tímido sempre esteve presente e disposta a ajudar e conversar. A Camila Mika Kamikawa por suas sugestões e auxílio durante o trabalho. Sucesso para todas nós!!

A todos os funcionários do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz que de alguma forma fizeram parte desse trajeto. Agradeço especialmente, a Dra. Adele Caterino de Araujo e a Me. Maristela Salgado e suas equipes por compartilharem o parque tecnológico.

A Diretora do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, Me. Carmem Aparecida de Freitas Oliveira, pelo apoio oferecido.

A Me. Roseli dos Santos Freitas, do Laboratório de Invetigação Médica (LIM-53), Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, que nos auxiliou na avaliação morfológica, compartilhando conosco seu conhecimento e experiência.

A Dra. Tânia Sueli Andrade e toda equipe do Núcleo de Coleção de Microorganismos, Centro de Procedimentos Interdisciplinares do Instituto Adolfo Lutz: Vanessa Nieri Zanelatto, Lígia Maria Bozzoli, Maria Luiza Betani, Gleyciane Alves Teixeira, Maria Alvina da S. Ferreira Lima, Cleonice Pechi, Marizete Mezacasa e Elizabeth Harummy Takagi pela liofilização dos antígenos, divisão do parque tecnológico, e pela paciência e conversa de toda sexta feira.

A Dra Ana Paula Lemos e Maria Vaneide de Paiva D. dos Santos do Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz pela liofilização dos antígenos.

A Dra. Viviane Mazo Fávero Gimenes do Laboratório de Investigações Médicas (LIM53) Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo pela liofilização dos antígenos.

Ao Dr. Gil Bernard do Laboratório de Investigações Médicas (LIM-53) Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo pela doação do anticorpo policlonal anti-antígeno de *P.lutzii*.

A Dra. Gilda Maria Bárbaro Del Negro do Laboratório de Investigações Médicas (LIM53) Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo pela doação das amostras fúngicas de *P.lutzii*.

Ao Dr. Zoilo Pires de Camargo do Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo pela doação das amostras fúngicas de *P. brasiliensis*.

Ao Dr. Rui Durlacher do Centro de Medicina Tropical de Rondônia pelo envio dos soros de pacientes.

A Prof^a. Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago e ao Prof. Dr James Venturini da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo envio dos soros de pacientes.

Ao Dr. Pedro Pinto do Núcleo de Enteroparasitoses, Centro de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz pelo tempo disponibilizado e as sugestões dadas.

Aos funcionários do Núcleo de Citopatologia Oncótica, Centro de Patologia, especialmente as pesquisadoras Daniela Etlinger Colonelli e Sandra Lorente, por permitir e dividir o uso do microscópio foto-documentador.

Aos amigos do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz que participaram de mais uma história da minha vida pessoal e profissional, adoro vocês! Obrigada Juliana Mariotti Guerra, Juliana Possato Fernandes Takahashi, Leonardo Tadeu Araújo, Lidia Midori Kimura, Karen Miguita, Fernanda Draco e Regina Maria Catarino.

A Dra. Maria de Fátima Costa Pires e a Tirces Francine Guilherme, do Programa de Pós-graduação em Ciências-PPG-CCD-SES/SP, que durante o desenvolvimento do trabalho estiveram sempre dispostas a nos auxiliar.

Ao Dr. Marcos Vinícius da Silva, Dra. Gilda Maria Bárbaro Del Negro e Dra. Tânia Sueli de Andrade, que compuseram a banca de qualificação e contribuíram para melhoria do trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

Tem gente que tem o costume de vazar pelos cantos.
No começo vaza calada. Aos poucos. Aos pingos.
Mas se pega gosto principia o derrame.
Escorre quando fala. Escorre quando anda.
Não tem mais braço nem cabelo que segure.
Parece que vicia em ficar transbordada.

Mas tem gente que quando transborda é pra dentro.
E corre o risco de ficar represada. E represa você sabe.
Se aumenta muito arrebenta.

Mas se a pessoa ensaia um jeito de derramar pra fora.
Ai vai fazendo leito. Vai abrindo seu caminho na terra.
E a terra parece que se abre pra ela passar. Às vezes não

Cada um só sabe mesmo as coisas que suporta saber
Não sabe outras

Viviane Mosé,
Pensamento chão

Resumo

A paracoccidiodomicose (PCM) é causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*: *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*. A micose apresenta alta endemicidade na América do Sul e aproximadamente 80% dos casos descritos são registrados no Brasil. *P. lutzii*, tem sido apontado como agente causal da PCM, especialmente nas regiões Centro-Oeste e Norte, entretanto, alguns grupos têm relatado, a ausência de reatividade sorológica dos pacientes frente ao antígeno de referência de *P. brasiliensis*, conhecida por apresentar em sua composição a molécula de 43 kDa. Este estudo tem como principal objetivo estabelecer um protocolo para a produção de antígenos de *P. lutzii* que possam ser utilizados como referência em ensaios sorológicos para esta espécie. As preparações antigênicas foram obtidas a partir de três isolados (01, 66 e 8334), cultivados à 37°C, empregando-se dois meios de cultura distintos, ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose, segundo os protocolos descritos por Freitas (2005) e Assis et al. (1989), sendo que um terceiro protocolo foi proposto durante o desenvolvimento deste projeto. Os antígenos foram obtidos após cinco (5), 10 e 20 dias de cultivo e foram avaliados *in natura*, 10 e 20 vezes concentrados por liofilização. Considerando-se os diferentes pontos avaliados, este projeto gerou a produção de 90 preparações antigênicas. O *screening* das preparações antigênicas com potencial aplicabilidade no imunodiagnóstico da PCM causada por *P. lutzii*, permitiu a seleção de seis antígenos: quatro produzidos a partir do protocolo descrito por Freitas (2005), sendo três obtidos em ágar Fava-Netto modificado e um em ágar Sabouraud-dextrose e dois obtidos segundo o protocolo proposto durante o desenvolvimento deste projeto, ambos obtidos em Fava-Netto modificado. Verificou-se que todas as seis preparações antigênicas, apresentaram reatividade cruzada frente a soros de pacientes com PCM confirmada e residentes em região não endêmica para *P. lutzii*, bem como para soros de pacientes com PCM confirmada ou com suspeita clínica da micose, residentes em regiões endêmicas para *P. lutzii*. Observou-se que o uso do *immunoblotting* melhorou a sensibilidade do diagnóstico da PCM,

porém, reafirmou a ocorrência de reatividade cruzada entre as espécies de *Paracoccidioides* sp, já que diversas amostras de soro reconheceram tanto os marcadores sorológicos da infecção por *P. brasiliensis* (gp43 e gp70), assim como diversas frações de *P. lutzii*, com destaque a fração de 60 kDa. A comparação do perfil eletroforético, por SDS-PAGE, confirmou o compartilhamento de componentes antigênicos entre ambas as espécies de *Paracoccidioides*, justificando assim, a ocorrência de reatividade cruzada. Diante destes resultados, conclui-se que não é possível discriminar, sorologicamente PCM causada por *P. brasiliensis* daquela causada por *P. lutzii*.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, imunodiagnóstico, *P. lutzii*, antígenos.

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*: *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii*. Mycosis has high endemicity in South America and approximately 80% of the described cases are registered in Brazil. *P. lutzii*, has been reported as a causative agent of PCM, especially in the Midwest and North regions. However, some groups have reported the absence of serological reactivity of the patients against the reference antigen of *P. brasiliensis*, known to present in its composition to the 43 kDa molecule. This study has as main objective to establish a protocol for the production of *P. lutzii* antigens that can be used as reference in serological tests for this species. The antigenic preparations were obtained from three isolates (01, 66 and 8334) grown at 37°C using two different culture media, modified Fava-Netto agar and Sabouraud-dextrose agar, according to the protocols described by Freitas (2005) and Assis et al. (1989), and a third protocol was proposed during the development of this project. Antigens were obtained after five (5), 10 and 20 days of culture and were evaluated in natura, 10 and 20 times concentrated by lyophilization. Considering the different evaluated points, this project generated the production of 90 antigenic preparations. The screening of the antigenic preparations with potential applicability in the PCM immunodiagnosis caused by *P. lutzii* allowed the selection of six antigens: four produced from the protocol described by Freitas (2005), three being obtained on modified Fava-Netto agar and one on Sabouraud-dextrose agar and two obtained according to the proposed protocol during the development of this project, both obtained in modified Fava-Netto. All six antigenic preparations were cross-reactive to sera from patients with confirmed PCM and resident in a region not endemic to *P. lutzii*, as well as to sera from patients with confirmed PCM or with clinical suspicion of mycosis residing in endemic regions for *P. lutzii*. It was observed that the use of immunoblotting improved the sensitivity of the PCM diagnosis, but reaffirmed the occurrence of cross reactivity among the species of *Paracoccidioides sp*, since several serum samples recognized both the serological markers of infection by *P. brasiliensis* (gp43 and gp70),

as well as several fractions of *P. lutzii*, with emphasis on the fraction of 60 kDa. The comparison of the electrophoretic profile, by SDS-PAGE, confirmed the sharing of antigenic components between both species of *Paracoccidioides*, thus justifying the occurrence of cross-reactivity. In view of these results, we conclude that it is not possible to discriminate serologically PCM caused by *P. brasiliensis* from that caused by *P. lutzii*.

Key words: Paracoccidioidomycosis, immunodiagnosis, *P. lutzii*, antigens

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
CFA	Antígeno livre de células (<i>Cell free antigen</i>)
CIE	Contraímunoeletroforese
CSSEPC	Componentes solúveis da superfície externa da parede celular
CSSEPC-C	Componentes solúveis da superfície externa da parede celular obtido por meio de protocolo convencional
CSSEPC-M	Componentes solúveis da superfície externa da parede celular obtido por meio de protocolo modificado
<i>Cut off</i>	Ponto de corte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FN	Fava-Netto
GAPDH	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
Gp	Glicoproteína
<i>H. capsulatum</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>
HSP60	<i>Heat shock protein</i> de 60 kDa
HSP70	<i>Heat shock protein</i> de 70 kDa
IB	<i>Immunoblotting</i>

ID	Imunodifusão dupla
IgG	Imunoglobulina G
K	Kappa
kDa	Kilo Dalton
LIM	Laboratório de Investigações Médicas
MMM	Meio Mcveigh e Morton
MS/SVS	Ministério da Saúde/Serviço de Vigilância em Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
NGTA	Neoptona-glicose-tiamina-asparagina
p/v	peso/volume
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-L	Solução salina tamponada com fosfatos contendo leite em pó desnatado
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween 20
PCR	Reação em cadeia polimerase
PCM	Paracoccidioidomicose
pH	Potencial de hidrogênio
PI	<i>Paracoccidioides lutzii</i>
PYG	Proteose de peptona, extrato de levedo, glicose
RAPD	Reação de amplificação aleatória de DNA polimórfico

Rf	<i>Reference front</i> /mobilidade relativa
rpm	Rotação por minuto
SAB	Sabouraud-Dextrose
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
Th	Antigenos obtidos com solução thimerosal-borato
Tris	(hidroxi-metil)-amino-metano
V	Volts
v/v	volume/volume

Lista de Figuras

Figura 1. Áreas geográficas endêmicas para paracoccidiodomicose na América Latina.....	32
Figura 2. Análise micromorfológica do isolado 01 de <i>P. lutzii</i> cultivado em ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose durante cinco (5), 10 e 20 dias.....	84
Figura 3. Análise micromorfológica do isolado 66 de <i>P. lutzii</i> cultivado em ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose durante cinco (5), 10 e 20 dias.....	87
Figura 4. Análise micromorfológica do isolado 8334 de <i>P. lutzii</i> cultivado em ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose durante cinco (5), 10 e 20 dias.....	90
Figura 5. Macromorfologia dos isolados 01 (A), 66(B) e 8334(C) de <i>P. lutzii</i> cultivados durante 20 dias.....	91
Figura 6. Análise micromorfológica das amostras de <i>P. brasiliensis</i> cultivadas em ágar Fava-Netto modificado durante sete (7) dias.....	94
Figura 7. Padrão de reatividade, por imunodifusão dupla, das 24 amostras de soro de pacientes com reatividade sorológica para <i>P. brasiliensis</i> frente aos antígenos de <i>P. lutzii</i>	116
Figura 8. Avaliação, por <i>immunoblotting</i> , da amostra de soro (AM2H) de paciente com histórico de reatividade sorológica frente a antígeno de <i>P. brasiliensis</i> , porém com ausência de reatividade na última avaliação sorológica.....	120
Figura 9. Padrão de reatividade por imunodifusão dupla das 21 amostras de soro de pacientes com PCM comprovada oriundos de uma região potencialmente endêmica para <i>P. lutzii</i> frente aos antígenos de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	121

Figura 10. Avaliação, por <i>immunoblotting</i> , das amostras de soro (5RO, 15RO, 21RO) de pacientes de região potencialmente endêmica para <i>P. lutzii</i>	125
Figura 11. Reatividade imunodifusão dupla das amostras de soro (1RO a 8RO) de pacientes com PCM confirmada, residentes em área potencialmente endêmica para <i>P. lutzii</i> frente a antígenos de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	127
Figura 12. Reatividade imunodifusão dupla das amostras de soro (9RO a 16RO) de pacientes com PCM confirmada, residentes em área potencialmente endêmica para <i>P. lutzii</i> frente a antígenos de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	128
Figura 13. Reatividade imunodifusão dupla das amostras de soro (17RO a 21RO) de pacientes com PCM confirmada, residentes em área potencialmente endêmica para <i>P. lutzii</i> frente a antígenos de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	129
Figura 14. Comparação, do título de anticorpos circulantes anti- <i>P. brasiliensis</i> (Pb) e <i>P. lutzii</i> (Pl) das 12 amostras de soro de de pacientes com PCM comprovada e reagente frente aos antígenos de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> por imunodifusão dupla.....	130
Figura 15. Avaliação por <i>immunoblotting</i> das amostras de soro (J, L, M, N e O) de pacientes com PCM confirmada e residente em região potencialmente endêmica para <i>P. lutzii</i>	133
Figura 16. Avaliação, por <i>immunoblotting</i> , das amostras de soro de pacientes (1M, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M, 10M e 12M) com suspeita clínica de PCM e residentes em região potencialmente endêmica para <i>P. lutzii</i>	136
Figura 17. Perfil eletroforético dos antígenos selecionados de <i>P. lutzii</i> e <i>P. brasiliensis</i> em SDS-PAGE.....	140

Figura 18. Reatividade, por imunodifusão dupla, das amostras de soro de pacientes com histoplasmose e aspergilose frente às preparações antigênicas de *P. lutzii*.....141

Lista de tabelas

Tabela 1. Principais características macro e microformofógicas observadas nos isolados 01, 66, e 8334 de *P. lutzii* cultivados a 37°C, por 5, 10 e 20 dias em ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose.....92

Tabela 2. Principais características macro e micromorfológicas observadas nos isolados 113 e B-339 de *P. brasiliensis* cultivados a 37°C. por 7 dias em ágar Fava-Netto modificado.....94

Tabela 3. Padrão de reatividade, por imunodifusão dupla, dos antígenos de *P. lutzii* obtidos segundo Freitas (2005), em ágar Fava-Netto modificado, 37°C, durante 5, 10 e 20 dias, *in natura*, 10 e 20 vezes concentrados.....101

Tabela 4. Padrão de reatividade, por imunodifusão dupla, dos antígenos de *P. lutzii* obtidos segundo Freitas (2005), em ágar Sabouraud-dextrose, 37°C, durante 5, 10 e 20 dias, *in natura*, 10 e 20 vezes concentrados.....102

Tabela 5. Padrão de reatividade, por ID, dos antígenos de *P. lutzii* obtidos segundo Assis et al (1989) e sua versão modificada em ágar Fava-Netto modificado, 37°C, durante 5, 10 e 20 dias.....103

Tabela 6. Padrão de reatividade por ID, dos antígenos de *P. lutzii* obtidos segundo Assis et al (1989) (1991) e sua versão modificada em ágar Sabouraud-dextrose, 36°C, durante 5, 10 e 20 dias.....104

Tabela 7. Massas moleculares estimadas em kDa das frações proteicas compartilhadas entre os antígenos obtidos segundo Freitas (2005) em ágar Fava-Netto modificado.....107

Tabela 8. Massas moleculares estimadas em kDa das frações proteicas compartilhadas entre os antígenos obtidos segundo Assis et al (1989) e sua versão modificada produzidos em ágar Fava-Netto modificado.....109

Tabela 9. Massas moleculares estimadas das frações protéicas em comum entre os antígenos obtidos segundo Freitas (2005) obtidos em ágar Sabouraud-dextrose.....	111
Tabela 10. Massas moleculares estimadas, em kDa, das frações protéicas compartilhadas entre os antígenos obtidos segundo Assis et al. (1989) e sua versão modificada produzidos em ágar Sabouraud-dextrose.....	113
Tabela 11. Antígenos selecionados.	114
Tabela 12. Comparação, por imunodifusão dupla, do título de anticorpos circulantes anti- <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> em amostras de soro de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada.....	117
Tabela 13. Análise da reatividade de soros de pacientes com PCM comprovada residentes em área potencialmente endêmica para <i>P.lutzii</i> por imunodifusão dupla e <i>immunoblotting</i> , frente a antígenos de <i>P.brasiliensis</i> e <i>P.lutzii</i>	126
Tabela 14. Análise do padrão de reatividade, por imunodifusão dupla e <i>immunoblotting</i> , das amostras de soro de pacientes com PCM comprovada residentes em área potencialmente endêmica para <i>P. lutzii</i> , frente a antígenos de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	132
Tabela 15. Análise do padrão de reatividade, por imunodifusão dupla e <i>immunoblotting</i> , das amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM residentes em área potencialmente endêmica para <i>P. lutzii</i> , frente a antígenos de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	135
Tabela 16. Padrão de reatividade de soros de região endêmica para <i>P. brasiliensis</i> e potencialmente endêmica <i>P. lutzii</i> , por ID, frente a antígenos das duas espécies isoladamente e <i>pool</i> de antígenos.....	138

Índice

1.0. Introdução	23
1.1. Paracoccidioidomicose e seu agente etiológico.....	23
1.2. Histórico	23
1.3. Formas Clínicas	24
1.3.1. Paracoccidioidomicose infecção	24
1.3.2. Paracoccidioidomicose Doença	25
1.3.2.1. Forma Juvenil.....	25
1.3.2.2 Forma Crônica.....	26
1.3.2.3. Forma residual	26
1.4. Epidemiologia.....	27
1.5. Tratamento.....	34
1.6. Paracoccidioides sp	35
1.7. Fisiopatologia e fatores de virulência	39
1.8. Diagnóstico Sorológico.....	44
1.9. Antígenos de <i>Paracoccidioides</i> sp	52
2.0. Objetivos	66
2.1. Objetivo Geral	66
2.2. Objetivos Específicos.....	66
3.0. Delineamento experimental	67
4.0. Material e métodos	68
4.1. Amostras de <i>Paracoccidioides</i> spp	68
4.1.1. Amostras de <i>Paracoccidioides lutzii</i>	68
4.1.2. Amostras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	68
4.2. Obtenção de Antígenos de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	70
4.2.1. Exoantígeno de <i>Paracoccidioides</i> spp, segundo Freitas (2005)	70
4.2.2. Componente Solúvel da Superfície Externa de <i>Paracoccidioides</i> spp (CSSEPC de <i>Paracoccidioides</i> spp)	70
4.2.2.1. Componente Solúvel da Superfície Externa de <i>Paracoccidioides</i> spp (CSSEPC de <i>Paracoccidioides</i> spp), segundo Assis et al. (1989)	71
4.2.2.2. Componente Solúvel da Superfície Externa de Modificado de <i>Paracoccidioides</i> spp	71
4.2.3. Antígeno de referência de <i>P. lutzii</i>	72
4.3. Liofilização	72
4.4. Dosagem Proteica	73
4.5. Aspectos morfológicos das amostras de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	73
4.6. Amostras de soro	74
4.6.1. Soros Humanos	74
4.6.2. Anticorpos policlonais anti-exoantígeno de <i>Paracoccidioides</i> spp .	76
4.6.3. Anticorpos policlonais anti-exoantígeno de <i>Histoplasma capsulatum</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	76
4.7. Caracterização dos Antígenos de <i>Paracoccidioides</i> spp	76
4.7.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamina contendo Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	76
4.7.2. <i>Western Blotting</i>	77
4.7.3. Imudifusão Dupla em Gel de Agarose (ID).....	78

4.7.4. Immunoblotting.....	79
4.8. Determinação de Peso Molecular	80
4.9. Estudo da estabilidade dos antígenos de <i>Paracoccidioides spp</i>	80
5.0. Resultados.....	82
5.1. Aspectos macromorfológicos e micromorfológicos de <i>Paracoccidioides lutzii</i>	82
5.1.2. Aspectos macromorfológicos e micromorfológicos de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	93
5.2. Screening dos Antígenos de <i>Paracoccidioides lutzii</i>	95
5.2.1. Dosagem de Proteínas.....	96
5.2.2. Imunodifusão dupla em gel de agarose	97
5.2.2.1. Anticorpo policlonal anti-antígeno de <i>Paracoccidioides lutzii</i>	98
5.2.2.2. Anticorpo policlonal anti-antígeno de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	99
5.2.2.3. Anticorpo policlonal anti-antígeno de <i>Histoplasma capsulatum</i> e anti-antígeno de <i>Aspergillus fumigatus</i>	100
5.2.2.4. Soros de indivíduos saudáveis.....	105
5.3. Perfil eletroforético dos antígenos de <i>P. lutzii</i>	105
5.3.1. Antígenos obtidos em ágar Fava-Netto modificado	105
5.3.2. Antígenos obtidos em ágar Sabouraud-dextrose	110
5.4. Antígenos selecionados	113
5.4.1. Soros de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada e com reatividade frente ao filtrado de cultura da cepa B-339 de <i>P. brasiliensis</i> residentes em região de alta endemicidade para <i>P. brasiliensis</i>	115
5.4.2. Soros de pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose, porém com ausência de reatividade frente ao filtrado de cultura da cepa B-339 de <i>P. brasiliensis</i>	118
5.4.3. Soros de pacientes com histórico de reatividade frente ao antígeno de <i>P. brasiliensis</i> , porém, com a última amostra não reagente, ou seja, em processo de cura clínica e/ou sorológica.	119
5.4.4. Soros de pacientes com paracoccidioidomicose comprovada por meio de exame micológico direto e/ou histopatológico, porém sem avaliação sorológica para <i>Paracoccidioides sp</i> e residentes em região potencialmente endêmica para <i>P. lutzii</i>	120
5.4.5. Soros de pacientes com PCM comprovada por meio de avaliação histopatológica, porém, com ausência de reatividade para <i>P. brasiliensis</i> residentes em região potencialmente endêmica (Mato Grosso do Sul) para <i>P. lutzii</i>	130
5.4.6. Soros de pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose residentes em região potencialmente endêmica para <i>P. lutzii</i>	133
5.4.7. Soros de pacientes provenientes de região potencialmente endêmica para <i>P. lutzii</i> e endêmica para <i>P. brasiliensis</i> com resultado discordante, frente a <i>poll</i> de antígenos	136
5.4.8. Comparação do perfil antigênico dos antígenos selecionados de <i>P. lutzii</i> frente a antígenos de <i>P. brasiliensis</i>	138
5.4.9. Soros de pacientes com histórico sorológico para histoplasmose e aspergilose.....	140
5.4.10. Avaliação da estabilidade antigênica	142

6.0. Discussão	143
7.0. Conclusões	173
8.0 Referências.....	176
9.0 Anexos	199

1.0. Introdução

1.1. Paracoccidioidomicose e seu agente etiológico

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença fúngica negligenciada causada por fungos do gênero *Paracoccidioides* spp: *P. brasiliensis* (S1a, S1b, PS2, PS3 e PS4) (Matute et al., 2006; Muñoz et al., 2016) e *P. lutzii* (Teixeira et al., 2009, Teixeira et al., 2014), endêmicos nas regiões subtropicais da América Latina. Recentemente, uma análise molecular e morfológica propôs o reconhecimento das espécies crípticas PS2, PS3 e PS4 em novas espécies nomeadas de *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis*, respectivamente (Turissini et al., 2017).

1.2. Histórico

A primeira descrição do agente ocorreu em 1908, por Adolfo Lutz. Na ocasião, Lutz identificou no exame histopatológico de lesões da cavidade oral a presença de células redondas, mono e polinucleadas, observando também a presença de elementos micóticos livres bem como de células gigantes, classificando, baseado nestes achados a micose como pseudococcídica (Lutz, 1908). Em 1912, o patógeno foi classificado como pertencente ao gênero *Zymonema* por Afonso Splendore que em razão disso o nomeou de *Zymonema brasiliensis*. No entanto, em 1930, a classificação e denominação passaram por novas mudanças; Floriano Paulo de Almeida criou o gênero *Paracoccidioides* mantendo para a espécie a mesma denominação usada por Splendore, estabelecendo assim a nomenclatura empregada até os dias atuais; ou seja, *Paracoccidioides brasiliensis* (Lacaz, 2002).

1.3. Formas Clínicas

Desde sua descrição, a micose já foi nomeada de blastomicose sul-americana, doença de Lutz e doença de Lutz-Splendore-Almeida (Lacaz, 2002). Entretanto, em 1972, durante uma reunião realizada em Medellín, Colômbia convencionou-se o nome Paracoccidioidomicose para se referir ao agravo. Na mesma ocasião, a PCM foi classificada de acordo com as manifestações clínicas. Deste modo, a micose divide-se em PCM-infecção e PCM-doença (Shikanai-Yasuda et al., 2017; Mendes et al., 2017). Essa última, por sua vez, é classificada em aguda, também chamada de juvenil, ou crônica. Há ainda a forma sequelar, algumas vezes incapacitante.

1.3.1. Paracoccidioidomicose infecção

É considerada a forma assintomática da doença e compreende os casos de indivíduos sem manifestação clínica da PCM. Nestes casos, a infecção é confirmada por uma reação intradérmica positiva a paracoccidioidina ou identificação de focos latentes na autópsia de indivíduos que morreram por outras causas. (Shikanai-Yasuda et al., 2017; Mendes et al., 2017)

Em relação aos testes intradérmicos, deve-se salientar, que do ponto de vista da Vigilância Sanitária, a utilização da paracoccidioidina e de outros antígenos, constituem-se em agentes de risco para a saúde humana, visto a falta de qualidade e padronização da grande maioria destes imunobiológicos. Desta forma, com a publicação da Portaria nº 686/ MS/SVS (Ministério da Saúde/Serviço de Vigilância em Saúde) de 27 de agosto de 1998, até que os centros produtores de imunobiológicos atendam as normas técnicas de segurança e controle de qualidade, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), deixou de recomendar a utilização de preparações antigênicas, incluindo a paracoccidioidina, para a avaliação da

reação de hipersensibilidade do tipo tardio (disponível em www.anvisa.org. Acesso em 14 de fevereiro de 2018).

1.3.2. Paracoccidioidomicose Doença

1.3.2.1. Forma Juvenil

Acomete indivíduos predominantemente jovens de ambos os sexos, mas pode também ocorrer em adultos imunocomprometidos (de Macedo et al., 2017; Ferreira Rocha e de Araujo Torres, 2017). Desenvolve-se a partir de uma lesão pulmonar primária, não detectada que progride rapidamente com disseminação linfática e hematogênica para órgãos do sistema monocítico-macrofágico, como baço, fígado, linfonodos e medula óssea (Franco et al., 1987). Um estudo de coorte retrospectivo foi realizado por de Macedo et al. (2017) no período de 2001 a 2009, incluindo pacientes portadores da forma aguda de um centro de referência no Rio de Janeiro. Os autores observaram que os linfonodos foram os órgãos mais afetados (100%), seguidos pela pele e pelo baço (31% cada), sendo que a seqüela observada com maior frequência foi a baixa reserva adrenal. Ainda segundo os autores, o sequenciamento parcial dos genes *arf* e *gp43* de quatro (4) pacientes com cultura fúngica viável, permitiu a identificação de *P. brasiliensis* S1.

Na forma juvenil da doença, geralmente, os sintomas surgem após semanas ou meses após a infecção tornando os casos indicadores de áreas endêmicas (Blotta et al., 1999).

Apesar de corresponder a apenas 5-25% dos casos, os índices de letalidade relacionados à PCM estão particularmente associados a essa forma clínica (Fortes et al., 2011; Shikanai-Yasuda et al., 2017). Normalmente os pacientes acometidos pela mesma apresentam altos títulos de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* e depressão da resposta imune celular (Fortes et al., 2011). Observa-se ainda, que nestes indivíduos a inflamação granulomatosa é desorganizada, com grande número de fungos

e os granulomas frouxos, mal definidos, apresentando exudação supurativa e áreas de necrose (Franco et al., 1987; Fortes et al., 2011).

1.3.2.2. Forma crônica

A forma crônica corresponde a 74-96% dos casos da doença (Shikanai-Yasuda et al., 2017). Nesta apresentação clínica, acredita-se, que o indivíduo infecta-se nas primeiras décadas de vida entre os 10 e 20 anos, sendo que a mesma desenvolve-se lenta e silenciosamente, levando anos até que ocorra a manifestação dos primeiros sintomas. Apenas na vida adulta, a maioria dos pacientes, entre 30 e 60 anos, irá desenvolver o período ativo da doença, a partir da reativação de foco endógeno latente. Os sinais e sintomas podem variar de intensidade e gravidade entre leve, moderado e grave (Franco et al., 1987; Mendes et al., 2017), sendo que em 90% dos casos há comprometimento pulmonar. As lesões podem permanecer no foco primário (unifocal) ou disseminar-se para vários órgãos e sistemas (multifocal). O exame histopatológico, diferentemente ao observado para a forma juvenil, apresenta mais granulomas epitelióides compactos com menor quantidade de leveduras.

1.3.2.3. Forma residual

A forma residual diz respeito às sequelas de cunho anatômico ou funcional que podem ocorrer após o tratamento da doença (Shikanai-Yasuda et al., 2017). Essas alterações são consequências do processo inflamatório intenso, da fibrose e calcificação do tecido lesado. Restrição cardiopulmonar, dispnéia, estenose de glote e de traquéia e disfonia são as principais sequelas associadas à PCM (Brummer, 1993).

1.4. Epidemiologia

Geograficamente, os casos autóctones da PCM encontram-se restritos as áreas subtropicais da América Latina, estendendo-se do sul do México ao norte da Argentina (Colombo et al., 2011; Mendes et al., 2017; Giusiano et al., 2018). Nestas regiões a PCM é a segunda micose endêmica de maior prevalência, além disso, estima-se que aproximadamente 10 milhões de pessoas encontrem-se infectadas e que 1-2% da população possa apresentar alguma das formas clínicas da doença semanas a várias décadas após a exposição (Queiroz-Telles et al., 2017).

Apresenta distribuição heterogênea, com áreas de alta e baixa endemicidade (Shikanai-Yasuda et al., 2017). Entre 1930 e 2012, mais de 15.000 casos autóctones de PCM foram descritos, sendo o Brasil o responsável pela maioria dos casos registrados. Chile, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Belize, e Nicarágua não reportam casos autóctones da doença (Martinez, 2015).

As regiões com registro de casos possuem temperaturas médias anuais que variam de 17 a 24°C, altitudes acima do nível do mar de 1.500 metros e índice pluviométrico anual entre 500 a 2.500 mm/ano (Marques, 2003; Martinez, 2015).

Entre as espécies crípticas de *P. brasiliensis*, S1 tem sido descrita com maior frequência no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Peru e Venezuela (Teixeira et al., 2014; de Macedo et al., 2016a; de Macedo et al. 2017), a ocorrência de PS2 foi documentada na Venezuela e Brasil (Teixeira et al., 2014, de Macedo et al. 2016b), enquanto que, PS3 encontra-se restrita a Colômbia (Theodoro et al., 2012) assim como PS4 a Venezuela (Teixeira et al., 2014).

Na análise filogenética realizada por Teixeira et al., (2009), entre as 17 amostras de *P. lutzii* avaliadas, 16 pertenciam a região Centro-Oeste,

mais precisamente aos estados de Mato Grosso e Goiás, sugerindo, portanto, que a região seja endêmica para esta espécie. Porém estudos recentes indicam que apesar de endêmica na região centro-oeste, *P. lutzii* não é exclusiva da mesma (Marques-da-Silva et al., 2012; Arantes et al., 2016; Mendes et al. 2017).

Marques-da-Silva et al. (2012) evidenciaram a circulação de *P. lutzii* na região amazônica, através da reação em cadeia de polimerase (PCR) empregando os primers para HSP70 (*Heat shock protein/proteína de choque térmico* de 70 kDa), que de acordo com Teixeira et al. (2009) amplifica uma sequência do DNA presente somente em isolados de *P. lutzii*. Para tanto, o grupo amplificou essa região em duas (2) amostras fungicas isoladas de dois (2) pacientes que apresentavam sintomas compatíveis com PCM, porém, com ausência de reatividade frente ao antígeno de *P. brasiliensis*. Perante os resultados, os autores concluíram que os casos de PCM na região encontram-se subestimados em razão do polimorfismo antigênico de *Paracoccidioides* e apontam a necessidade da realização de um estudo retrospectivo empregando antígenos obtidos de isolados provenientes da região amazônica, afirmando assim, que a incidência da PCM poderia ser melhor estimada.

Arantes et al. (2016) visando obter novas informações sobre a distribuição geográfica e dinâmica da distribuição de *Paracoccidioides* spp no meio ambiente coletaram amostras de aerossóis e solo de tocas de tatus, bem como capturaram estes animais de áreas endêmicas e não endêmicas para PCM nos estados de Minas Gerais, Goiás e Rondônia, verificando que as amostras de solo de Goiás e Rondônia foram positivas para *P. lutzii* empregando a metodologia de Nested PCR enquanto que no estado de Minas Gerais apenas amostras de aerossol foram positivas. DNA de *P. brasiliensis* foi amplificado em apenas quatro (4) amostras de aerossol coletadas em Goiás. Utilizando a metodologia de hibridização *in situ* foi possível observar a presença de *P. brasiliensis* nas três áreas estudadas,

enquanto a presença de *P. lutzii* foi observada nos estados de Goiás e Rondônia. Segundo os autores a não detecção de fragmentos de DNA em sete tatus capturados em regiões com alta prevalência de infecção por *P. lutzii*, sugere uma possível diferença ecológica entre ambas as espécies em relação a seus hospedeiros selvagens. Apesar disso, o estudo revelou a circulação de ambas as espécies nas áreas estudadas e a ocorrência de *P. lutzii* na região sudeste.

Recentemente, Mendes et al. (2017) pesquisaram anticorpos circulantes IgG anti-*P. lutzii*, por ELISA indireto, em amostras de soro de 481 animais domésticos e silvestres do Rio Grande do Sul empregando como antígeno *cell free antigen* obtido a partir do isolado 208 de *P. lutzii*. Os autores observaram que do total de animais avaliados, 105 (21,8%) apresentaram reatividade frente ao antígeno de *P. lutzii* sugerindo, portanto, a circulação da espécie na região sul do Brasil, uma vez que esses animais nunca saíram do estado.

Paracoccidioides spp na natureza pode ser isolado no solo onde vive de forma saprofítica produzindo conídios infectantes (Franco et al., 1987; Restrepo et al., 2001; Arantes et al., 2016). Dessa forma, os casos de PCM estão, na grande maioria das vezes, relacionados a profissões cuja atividade laboral leve ao contato direto com o solo, como agricultores, jardineiros, tratoristas, entre outros. Fatores como alcoolismo e tabagismo são frequentemente associados com a doença (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

Mesmo sabendo que o fungo pode ser encontrado no solo, pouco se sabe sobre as características desse nicho ecológico (Wanke e Londero, 1994).

P. brasiliensis também já foi isolado em tatus da espécie *Dasypus novemcinctus*, e a presença dessa espécie se sobrepõe geograficamente com os casos de PCM humana (Bagagli et al., 1998).

Sano et al. (1998) encontraram genótipos semelhantes de isolados clínicos e isolados de tatu por meio da técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e em razão disso, sugerem que o contato com esses animais possam infectar humanos. O mesmo estudo comprovou que um único tatu pode portar células de diferentes genótipos de *Paracoccidioides*.

Naiff et al. (1986) encontraram o patógeno em quatro (4) de 20 tatus analisados não encontrando, porém, sinais da doença. No entanto, Bagagli et al. (1998) ao realizarem autópsia em tatus positivos para *P. brasiliensis* observaram a presença de lesões pulmonares e linfonodos mesentéricos aumentados. Segundo os autores, no exame histopatológico observou-se granulomas epitelióides contendo células fúngicas sugerindo que o tatu não apenas albergue o fungo, mas também desenvolva a doença. Pesquisando a infecção em tatus de diferentes cidades foi possível associar animais positivos a ambiente com água e áreas desmatadas.

Abordagens soroepidemiológicas já demonstraram a ocorrência da PCM infecção em animais domésticos e selvagens entre os quais pode-se citar: cães, gatos, galinhas, porcos, cavalos, ovelhas, coelhos e macacos. Porém, não foram identificadas lesões anatomopatológicas associadas à doença nos animais reagentes em testes sorológicos ou a paracoccidioidina sugerindo que a chance de progressão da mesma é menor nesses animais (Martinez, 2015).

No Brasil, a PCM não é doença de notificação compulsória o que torna difícil estabelecer dados sobre sua real prevalência, incidência e morbidade (Shikanai-Yasuda et al., 2017). Como existem áreas de alta e baixa endemicidade há variação na incidência dos casos, desta forma, estima-se que nas regiões sul e sudeste ocorram 0,71 até 2,70 novos casos por ano a cada 100.000 habitantes (Belissimo et al., 2011). Enquanto que no estado de Rondônia a média entre os municípios é de 9,40 a cada 100.000

habitantes (Vieira et al., 2014). A variação de endemicidade existente nas diferentes regiões do território nacional pode ser observada na **Figura 1**.

Segundo Shikanai-Yasuda et al. (2006) o aumento de casos da doença nas regiões centro-oeste e norte esta provavelmente relacionado a expansão da agricultura como observado nos estados do Maranhão e Pará, bem como devido ao desmatamento, no caso de Rondônia. Martinez (2017) demonstrou que a expansão da PCM pelo território brasileiro encontra-se íntima e diretamente relacionada à cafeicultura na região sudeste, a expansão da fronteira agropecuária e construção de malhas viárias nas regiões centro-oeste e amazônica.

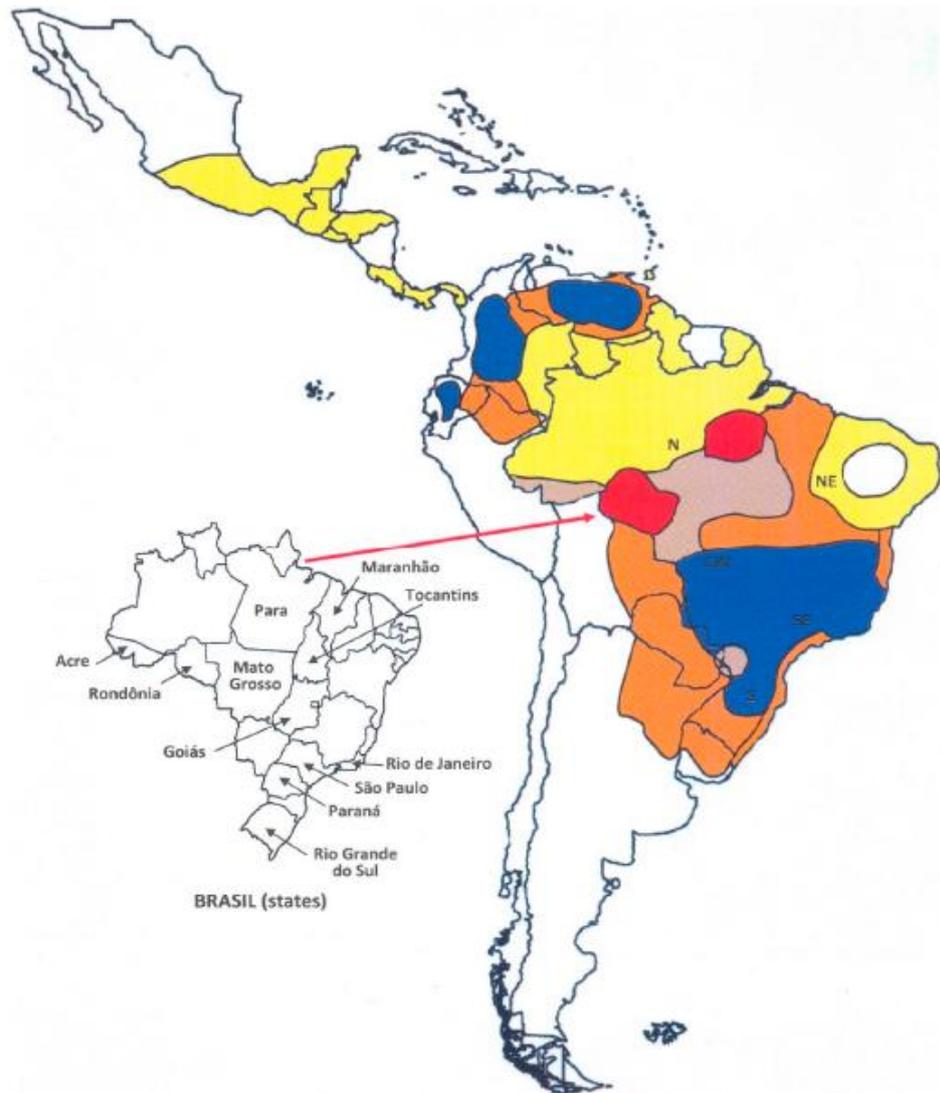


Figura 1. Áreas geográficas endêmicas para paracoccidioidomicose na América Latina: (■) Áreas de alta endemicidade (■) alta endemicidade observada desde as últimas décadas do século 20 (■) áreas com algumas evidências recentes de endemicidade crescente (■) áreas de endemicidade moderada (■) áreas de baixa endemicidade (■) nenhum caso ou raro. Fonte: Martinez, 2017.

Coutinho et al. (2002) analisaram 3.181 óbitos por PCM no Brasil, no período de 1980 a 1995 registrados no Sistema de Informação sobre mortalidade (SIM-DATASUS) e Censo Nacional (IBGE), revelando que a micose mostrou grande magnitude e baixa visibilidade, destacando-se como oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva, entre as infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de

mortalidade entre as micoses sistêmicas. A taxa de mortalidade média anual foi de 1,45/milhão de habitantes, seguido por criptococose com 0,33; pneumocistose com 0,13 e histoplasmosose com 0,04/milhão de habitantes. Estes dados revelam claramente a falta de notificação, comum em doenças negligenciadas, não apenas para a PCM, mas para as demais doenças fúngicas, visto que no período estudado não se observou dados de mortalidade por candidíase, e baixo índice para criptococose, doenças sabidamente de grande impacto. A distribuição espacial de mortalidade não foi homogênea entre as diferentes regiões e estados. Os cinco estados com maiores registros pertencem às regiões sul e sudeste, sendo São Paulo o responsável por 30% dos casos.

Bittencourt et al. (2005) avaliaram a taxa de mortalidade por PCM, entre 1980 a 1998, no estado do Paraná. No período avaliado, pode-se observar a ocorrência de 551 óbitos, sendo que a taxa de mortalidade média anual foi de 3,48 por milhão de habitantes com prevalência do sexo masculino, na faixa etária compreendida entre 30 a 59 anos. A exemplo do observado por Coutinho et al. (2002), este trabalho reforça a variação nas taxas de mortalidade entre os diferentes estados brasileiros, uma vez que o estado do Rio de Janeiro apresentou no mesmo período a menor taxa de mortalidade (1,18 por milhão de habitantes).

Santo (2008) analisou a tendência da mortalidade relacionada à PCM no estado de São Paulo pela avaliação das causas múltiplas de morte, considerando todos os óbitos ocorridos entre 1985 e 2005, cujas declarações de *causa-mortis* informassem a micose em qualquer linha ou parte do atestado médico, relatando a ocorrência de 1.950 óbitos, com coeficiente médio de 2,73 por 1.000.000 habitantes. Segundo o autor, os índices de mortalidade foram mais elevados em pacientes do sexo masculino com idade avançada, observando ainda uma tendência de elevação no inverno.

Coutinho et al. (2015) avaliaram a morbidade hospitalar e mortalidade por PCM, no Brasil, no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2006, observando que no período estudado ocorreram 1.523 óbitos, com média de 169/ano. Segundo os autores, todos os estados brasileiros registraram pelo menos um óbito por PCM, sendo que a maioria (88%) dos pacientes era do sexo masculino, com faixa etária superior a 50 anos. Os autores observaram ainda que em relação à atividade profissional, 60% eram trabalhadores rurais.

Kamikawa et al. (2012) demonstraram que 60% dos municípios do estado de São Paulo apresentam ao menos um paciente com anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, detectados por imunodifusão dupla em gel de agarose. Os autores observaram que a maioria dos pacientes sorologicamente reagentes para *P. brasiliensis* concentra-se nas macro-regiões de Campinas, São Paulo e Grande São Paulo, Sorocaba e São João da Boa Vista, enquanto as maiores taxas de reatividade foram observadas nos municípios de Piracicaba, Franca, Araçatuba e Presidente Prudente. Contudo, os autores ressaltam que os resultados estão subestimados, uma vez que não foram incluídas no estudo, amostras de pacientes atendidos nos serviços de referência de importantes pólos endêmicos da doença como Botucatu, Ribeirão Preto, Araraquara e Bauru.

1.5. Tratamento

Paracoccidioides spp são suscetíveis à maioria dos agentes antifúngicos sistêmicos, existindo, portanto, uma gama de fármacos disponíveis para o tratamento da PCM. Drogas como itraconazol, sulfametoxazol trimetropin (cotrimoxazol) e anfotericina B são frequentemente utilizadas na prática clínica (Shikanai-Yasuda et al., 2017; Mendes et al., 2017). Apesar do tratamento dispor de fármacos considerados eficazes, a toxicidade, as interações medicamentosas e o alto

custo, devem ser sempre considerados (Marques, 2003; Mendes et al., 2017).

Para o tratamento de pacientes acometidos pela forma leve e moderada da doença recomenda-se a administração de 200 mg de itraconazol/dia. A vigência do tratamento dura em média um ano, mas pode se prolongar até 18 meses (Shikanai-Yasuda et al., 2017). Estudos retrospectivos demonstraram que o tratamento com itraconazol é mais vantajoso quando comparado ao tratamento com a cotrimoxazol (Borges et al., 2014). Por ter atividade fungistática, a eficácia do cotrimoxazol encontra-se diretamente ligada a um maior tempo de tratamento. Entretanto, esta medicação pode ser utilizada em pacientes sob tratamento concomitante para tuberculose (Cavalcante et al., 2014) ou nos casos onde o itraconazol é contra-indicado, como no caso de pacientes com envolvimento do sistema nervoso central visto que o fármaco não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica ou ainda em pacientes com o envolvimento do trato gastrointestinal, uma vez que a medicação apresenta absorção errática (Mendes et al., 2017)

Para os casos de PCM severa ou disseminada a anfotericina B (deoxicolato ou lipossomal) tem sido o fármaco de escolha. Contudo, se o uso desse medicamento não for possível, recomenda-se o uso de cotrimoxazol intravenoso na dose de 800 mg/160 mg a cada oito horas (Shikanai -Yasuda et al., 2017).

Em relação aos corticosteróides, o uso dos mesmos durante o tratamento anti-fúngico parece reduzir a inflamação e por consequência as lesões nos gânglios, traquéia e pulmão evitando ou minimizando o quadro de insuficiência respiratória. Bernard et al., (2012) demonstraram que os pacientes podem ser beneficiados com a administração de corticosteróides especialmente em casos de inflamação exacerbada, mesmo após aparente melhora clínica.

Segundo o Consenso Brasileiro em Paracoccidiodomicose, todos os casos confirmados e prováveis da doença devem ser tratados. A conduta terapêutica deve obrigatoriamente incluir medidas de suporte às complicações clínicas associadas ao envolvimento de diferentes órgãos pela micose, aporte nutricional adequado, além da terapêutica antifúngica específica (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Mendes et al., 2008; Shikanai-Yasuda et al., 2017). Os pacientes deverão ser acompanhados periodicamente até apresentarem os critérios de cura (Shikanai-Yasuda et al., 2017; Mendes et al., 2017).

Finalmente, é importante salientar, que até o presente momento, não há evidências *in vitro* ou *in vivo* demonstrando que paracoccidiodomicose causada por *P. brasiliensis* ou por *P. lutzii* responda de forma diferente aos agentes antifúngicos utilizados no tratamento da doença (Shikanai -Yasuda et al., 2017).

1.6. *Paracoccidioides* sp

Paracoccidioides sp são fungos termodimórficos, por essa razão, em temperatura ambiente apresentam-se na forma de micélio com colônias brancas aderidas ao meio apresentando crescimento lento (3-4 semanas). A microscopia óptica revela filamentos micelianos hialinos, finos, septados com esporos terminais ou intercalares. A 37°C as células são leveduriformes e formam colônias cerebriformes. Ao exame microscópico apresentam células arredondadas com múltiplos brotamentos e algumas apresentam tubos germinativos (Lacaz, 2002).

Taxonomicamente pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Plectomyceto, Ordem Onigenales, Família Ajellomycetaceae, gênero *Paracoccidioides*, espécies *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* (San-Blas et al. 2002; Texeira et al., 2009; Bocca et al., 2013).

Desde a primeira publicação relacionada a PCM, acreditava-se que o gênero era composto por uma única espécie: *Paracoccidioides brasiliensis*. Porém, Matute et al. (2006) demonstraram através da análise filogenética de 65 isolados de seis áreas endêmicas que *Paracoccidioides brasiliensis* é dividido em quatro (4) espécies crípticas, nomeadas S1, PS2, PS3 e PS4 (Texeira et al., 2014). Ambos os trabalhos confirmaram o que outros grupos já haviam observado, ou seja, o gênero *Paracoccidioides* apresenta uma grande variabilidade genética (Molinari-Madlum et al., 1999).

Carrero et al. (2008) ao realizarem análise filogenética de 14 genes obtidos a partir de 21 isolados de *Paracoccidioides* spp, verificaram que duas (02) amostras fúngicas, Pb01 e IFM54648 não agruparam-se em nenhuma espécie críptica de *P. brasiliensis* proposta anteriormente por Matute et al. (2006). Diante destes resultados, os autores levantaram a hipótese do isolado Pb01 pertencer a uma nova espécie, entretanto, concluíram que para ter este grau de certeza vários isolados semelhantes a *Pb01-like* deveriam ser encontrados e analisados. A partir da ideia lançada por Carrero et al. (2008), Texeira et al., (2009), analisaram molecularmente 82 isolados identificando 17 amostras que nas análises filogenéticas agrupavam-se com *Pb01-like* e separavam-se das espécies crípticas de *P. brasiliensis*. Neste mesmo trabalho, os autores, analisaram a morfologia dessas amostras fúngicas e concluíram que havia diferenças, por exemplo, a produção de conídios mais alongados de *Pb01-like* quando comparado a *P. brasiliensis*.

A partir dessas observações foi proposta a criação da nova espécie de *Paracoccidioides*, visto as diferenças genéticas entre esses grupos. A nova espécie foi nomeada de *P. lutzii* em homenagem a Adolfo Lutz, por seu pioneirismo na descrição da PCM (Texeira et al., 2014).

A partir dos trabalhos de Matute et al. (2006), Teixeira et al. (2009) e Teixeira et al. (2014), diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo

de averiguar as possíveis diferenças clínicas e diagnósticas que o complexo *P. brasiliensis* e *P. lutzii* tenham eventualmente entre si.

De acordo com Theodoro et al. (2012) a dispersão de *P. brasiliensis* (S1, PS2, PS3) e *P. lutzii* ocorreu há 21,6 milhões de anos na região noroeste da América do Sul. Segundo os autores, não há barreiras geográficas entre S1/PS2 e *P. lutzii*, de modo que provavelmente houve uma especiação pariapátrica, no qual a umidade, temperatura e recursos ambientais foram suficientes para estimular divergências entre as espécies. Por outro lado, a divergência de S1 e PS3 parece ter ocorrido devido a existência de barreiras geográficas, causadas possivelmente, pela elevação dos Andes e as incursões marítimas provocadas por variações do nível do mar.

Desjardins et al. (2011) analisaram resultados de predições gênicas e de montagem do genoma de *Paracoccidioides* sp demonstrando que entre si, os isolados de *P. brasiliensis* (Pb03 e Pb18) compartilham 96% de similaridade de sequência, e quando comparados com *P. lutzii* (Pb01) esse percentual cai para 90% mostrando uma divergência entre as espécies. Segundo os autores, o tamanho do genoma dos isolados Pb03 e Pb18 são semelhantes, 29,1Mb e 30,0Mb, respectivamente enquanto o de Pb01 possui 32,9Mb.

Estudos indicam que *Paracoccidioides* tem um ciclo de vida sexuado devido à detecção de eventos de recombinação gênica dentro dessa população. Dentro deste contexto, é importante ressaltar que há isolados que alteram seu agrupamento de acordo com o gene analisado, ora com *P. brasiliensis* e ora com *P. lutzii* (Teixeira et al., 2009). Uma explicação para este fenômeno baseia-se na ocorrência de cruzamentos entre as espécies, ou seja, células híbridas (Teixeira et al., 2009). Theodoro et al. (2012) sugerem que a ausência de barreiras geográficas pode contribuir para a

ocorrência de isolados híbridos e que por essa razão, a hipótese não pode ser descartada.

Barbosa et al. (1968) relataram que pacientes oriundos do estado de Goiás, hoje sabidamente região endêmica para *P. lutzii* apresentam com maior frequência a forma linfático-abdominal da doença. Essa diferença clínica relacionada à espécie não pode ser ignorada, porém não pode ser afirmada categoricamente e não poderá ser até que o diagnóstico diferencial seja realizado possibilitando que médicos observem em grande escala as peculiaridades clínicas entre seus pacientes. Porém, atualmente o simples diagnóstico de agente causal da PMC representa uma dificuldade para vários centros clínicos, distanciando ainda mais o estudo comparativo entre as espécies.

Hahn et al. (2014) relataram um caso atípico de PCM por *P. lutzii* no estado do Mato Grosso. O paciente, do sexo masculino, 51 anos de idade, trabalhador rural não apresentava nenhuma evidência de imunossupressão, sem comorbidade, porém era etilista e tabagista. A pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* apresentou ausência de reatividade frente a filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339, entretanto, a reatividade foi detectada quando se utilizou uma preparação antigênica produzida a partir de um isolado autóctone. O fungo foi isolado de hemocultura e a espécie foi confirmada por identificação filogenética. Os autores ressaltaram que mesmo na vigência de tratamento específico e cuidados intensivos, a doença evoluiu rapidamente, culminando com o óbito do paciente 39 dias após a admissão hospitalar. O caso foi classificado, pelos autores, como fungemia fatal por *P. lutzii*.

1.7. Fisiopatologia e fatores de virulência

Paracoccidioides sp no ambiente esta presente no solo na forma de micélio produzindo conídios. Uma vez inalados, os conídios ou fragmentos

de hifa atingem os brônquios terminais e alvéolos onde a temperatura elevada (36-37°C), os hormônios do hospedeiro e o sistema imune geram pressões sobre o fungo fazendo com que o mesmo altere sua morfologia, assumindo aspecto de levedura, também conhecida como forma parasitária (González-Ochoa, 1956).

McEwen et al. (1987) demonstraram experimentalmente o curso do processo infeccioso causado por *P. brasiliensis*. Camundongos BALB/c adultos de ambos os sexos foram infectados por via intranasal com 10 conídios viáveis de *P. brasiliensis*. Os animais foram sacrificados em intervalos de até seis (6) meses e avaliados por histopatologia e cultura de órgãos. Os autores verificaram que no tecido pulmonar os conídios provocaram uma resposta inflamatória em um período que variou de 3 a 6 horas após a infecção. Inicialmente o infiltrado celular era composto de polimorfonucleares e após 6h evidenciou-se a presença de linfócitos que permaneceram em grande quantidade até o fim do experimento (24 semanas). Verificaram também, que após 12 horas algumas leveduras já eram observadas no tecido pulmonar e após 18 horas o dimorfismo fúngico estava completo. A formação do granuloma, característico do processo infeccioso causado por *P. brasiliensis*, foi evidenciada após seis (6) dias, porém, era mais notável em órgãos secundários (linfonodos, baço e fígado) após seis (6) meses da infecção.

Mais raro, porém possível, é o contágio por inoculação traumática do fungo no tegumento (Franco et al., 1987).

O termodimorfismo é essencial para a sobrevivência e perpetuação do patógeno no hospedeiro, podendo ser comparado a uma adaptação (Oliveira et al., 2015).

Diversos autores têm demonstrado que o 17- β estradiol impede a transformação de micélio para levedura dificultando assim o

desenvolvimento da doença nas mulheres. Segundo, Restrepo et al. (1984) e Salazar et al. (1988), o 17- β estradiol atua inibindo a síntese de proteínas de *P. brasiliensis* importantes para a transformação/reversão da fase infectante para a parasitária. Por outro lado, na ausência de níveis adequados deste hormônio observa-se a mesma prevalência da infecção em ambos os sexos, especialmente em pacientes com idade inferior a 13 anos ou em mulheres menopausadas (Shankar et al., 2011).

Durante a transição da forma de micélio para levedura, no tecido hospedeiro, ocorrem mudanças na composição polissacarídica da parede celular de *Paracoccidioides* sp. San-Blas e San-Blas (1977) demonstraram que a β -(1,3) glucana, presente no micélio, é espontaneamente reduzida e substituída por α -(1,3) glucana na forma parasitária por ser uma molécula imunogênica e susceptível as β -glucanases produzidas por leucócitos e macrófagos. Um estudo sobre a composição da parede celular de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* revelou que não há aumento de α -(1,3) glucana em *P. lutzii* na presença de soro de cavalo enquanto em *P. brasiliensis* este aumento é observado. Essa diferença de expressão de moléculas entre as duas espécies pode impactar na virulência desses fungos (Camacho e Niño-Vega, 2017).

No parênquima pulmonar, as células leveduriformes podem ser destruídas e a infecção controlada ainda no foco primário antes que o indivíduo manifeste qualquer sintoma, o que ocorre na maioria dos casos, quando leva-se em consideração os índices de paracoccidioidina positivos em áreas endêmicas (McEwen et al., 1995).

No entanto, a relação parasito-hospedeiro é multifatorial e depende não apenas da resposta imune, da susceptibilidade e fatores de risco do indivíduo entre os quais pode-se citar: desnutrição, tabagismo, etilismo ou doença de base, assim como do tempo de exposição ao patógeno, carga

fúngica e virulência do mesmo que envolve a capacidade de adesão, evasão, colonização e invasão (Oliveira et al., 2015).

Paracoccidioides sp desenvolveu tais mecanismos com destaque a adesão às células epiteliais, dessa forma, a eliminação através do muco de células ciliadas é evitada (Hernandez et al., 2015). Deste modo, o foco inicial pode regredir, mas mantendo leveduras viáveis, formando um foco quiescente que pode expandir-se meses ou até anos após o contato inicial gerando a forma crônica da doença (Franco et al., 1987).

Muitas moléculas vêm sendo estudadas com o objetivo de compreender a patogênese da PCM. Entre elas destaca-se a glicoproteína de 43 kDa caracterizada, em 1986, por Puccia et al. Trata-se da primeira adesina descrita em *P. brasiliensis* atuando como receptor de laminina (Vicentini et al., 1994) e fibronectina (Mendes-Gianini et al., 2006). Esta relacionada à evasão do sistema imune, pois diminui a capacidade fungicida de macrófagos *in vitro* (Popi et al., 2002) e a efeitos proteolíticos sobre a elastina e colágeno, auxiliando a invasão tecidual (Mendes-Gianini et al., 1990). Está presente na parede celular fúngica, mas também é secretada para o meio extracelular (Straus et al., 1996). A gp43 possui importância diagnóstica já que é considerada o antígeno imunodominante de *P. brasiliensis* (Puccia et al., 1986; Puccia e Travassos, 1991).

P. lutzii possui uma gp43 ortóloga chamada Plp43 que possui alguns epítomos em comum com a gp43 de *P. brasiliensis*. A sequência de aminoácidos da gp43 é 81% idêntica a de Plp43, entretanto, dados da literatura sugerem, que a ortóloga não deva ser empregada para fins diagnósticos visto ser pouco expressa durante a infecção (Leitão et al., 2014).

A glicoproteína de 70 kDa, ou gp70, também pode ser utilizada como marcador da progressão da doença causada por *P. brasiliensis*. Estudos

mostram que a molécula esta associada à evasão do sistema imune através da diminuição da atividade macrofágica por receptores de manose e fagocitose por opsonização, além de diminuir a liberação de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio por macrófagos *in vitro* (Matto Grosso et al., 2003). A gp70 é reconhecida por aproximadamente 95,0% dos soros de pacientes com PCM em atividade (Puccia et al., 1986; Camargo et al., 1989; Silva et al., 2008). No entanto, segundo observação de Camargo et al. (1989), a terapia antifúngica pode estar envolvida na redução do reconhecimento desta fração.

Outro potencial fator de virulência de *Paracoccidioides* spp é a formação de biofilme. Diversos autores têm demonstrado que a capacidade de formação de biofilmes por alguns patógenos é extremamente importante para a sobrevivência dos mesmos no tecido hospedeiro, visto que o biofilme confina o patógeno a uma membrana extracelular, dificulta a ação de fármacos e possibilita a evasão do microorganismo da resposta imune do hospedeiro (Pitangui et al., 2012; Sardi et al.; 2014; Sardi et al., 2015; Cattana et al., 2017).

Sardi et al. (2015) foram pioneiros na descrição da formação de biofilmes por *P. brasiliensis*. Segundo os autores, *P. brasiliensis* conseguiu formar um biofilme maduro em 144 horas com uma espessura de 100 µm. A presença do biofilme foi associada há um aumento na expressão de adesinas e enzimas. Os genes GP43, enolase, GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) e aspartil proteinase encontravam-se expressivamente aumentados, enquanto que a fosfolipase foi regulada negativamente no biofilme. A caracterização do biofilme formado por *P. brasiliensis* pode contribuir para uma melhor compreensão da patogênese da paracoccidioidomicose, bem como para a busca de novas alternativas terapêuticas.

Recentemente, Cattana et al. (2017) relataram a formação de biofilme em uma prótese vascular de paciente com um quadro de PCM disseminada.

Gómez et al. (2001) foram os primeiros a demonstrar que *P. brasiliensis* é capaz de produzir melanina tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No experimento, conídios e células leveduriformes, crescidas em meio de cultura, e células leveduriformes coletadas de animal infectado foram reagentes com anticorpos contra melanina por imunofluorescência. A presença de melanina em *P. brasiliensis*, provavelmente, assim como em outros fungos patogênicos, representa um mecanismo de defesa do patógeno a resposta imune do hospedeiro e a fármacos (Tarborda et al., 2008; Baltazar et al., 2015). A melanização aumenta a resistência a fagocitose diminuindo a ligação entre os componentes da parede celular aos receptores do macrófago (Silva et al., 2006) além de proteger o patógeno das injúrias causadas por espécies reativas de oxigênio e reativos de nitrogênio, tornando-o mais resistente a morte intracelular (Silva et al., 2009; Baltazar et al., 2015).

1.8. Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico definitivo da PCM baseia-se na observação direta das células leveduriformes com múltiplos brotamentos em fluídos corporais ou tecidos bem como pela cultura do agente etiológico seguido da reversão da fase miceliar para leveduriforme (Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Mendes et al., 2008). Entretanto, os métodos clássicos de diagnóstico baseados nas características fenotípicas e na cultura do patógeno são demorados e pouco sensíveis; e a avaliação histopatológica pode ser inviável para alguns pacientes, pelo risco durante o procedimento de coleta do espécime ou ainda pela inacessibilidade ao local da lesão (Teles e Martins, 2011). Por estas razões, o diagnóstico sorológico, mesmo não sendo o padrão ouro, tornou-se uma importante ferramenta tanto de diagnóstico quanto de seguimento da doença (Mendes Gianini et al., 2004; Vicentini, 2008; Camargo, 2008).

Há diversos testes sorológicos disponíveis visando o diagnóstico da PCM, entre os quais pode-se citar: imunodifusão dupla de gel de agarose (ID), contraímuno eletroforese (CIE), ELISA indireto, Dot-Blot e *immunoblotting* (IB). Entretanto, a sensibilidade e especificidade destas técnicas, parâmetros imprescindíveis para a obtenção de um resultado confiável, estão diretamente relacionadas à preparação antigênica empregada (Vicentini, 2008; Camargo, 2008; Telles e Martins, 2011; da Silva et al., 2016; Mendes et al. 2017).

A ID foi primeiramente utilizada para o diagnóstico da PCM por Ferri (1961) e desde então, permanece como o método de escolha para o diagnóstico inicial de pacientes com suspeita clínica da doença (da Silva et al., 2016; Shikanai-Yasuda et al., 2017).

A metodologia é empregada rotineiramente pelos laboratórios devido a sua simples execução e baixo custo operacional visto que não necessita de automação (Vicentini, 2008). Além disto, a técnica consente que os clínicos realizem o acompanhamento sorológico dos pacientes, verificando a diminuição dos títulos de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, permitindo também avaliar a eficácia da terapia anti-fúngica (Do Valle et al., 2001; Camargo, 2008; Vicentini, 2008; Mendes et al., 2017). Além destas vantagens, possui elevada especificidade e valor preditivo positivo, entretanto, a sensibilidade da técnica encontra-se intimamente relacionada ao tipo de antígeno utilizado, podendo variar entre 65 e 100% (Camargo, 2008; da Silva et al., 2016).

Do Valle et al. (2001) avaliaram, por ID, amostras de soro de 245 pacientes, antes do início do tratamento com anti-fúngico, frente a antígeno de filtrado de cultura de leveduras concentradas e dialisadas a partir de um *pool* de isolados de *P. brasiliensis*, demonstrando 90,2% de sensibilidade.

A mistura antigênica denominada Ag7, composta por aproximadamente 90% de gp43, tem fornecido resultados com sensibilidade de 84,3% e especificidade de 98,9% em diferentes centros de diagnóstico, no entanto, apresenta menor valor preditivo na avaliação do acompanhamento sorológico durante e depois do tratamento (Marques, 2003).

Silva et al. (2006) avaliaram, por ID, 75 amostras de soro de pacientes com PCM comprovada frente a diferentes preparações antigênicas, demonstrando 90% de reatividade para antígeno somático e componentes solúveis da superfície externa da parede celular de *P. brasiliensis*, 86,6% para *cell-free antigen*, 83,3% para antígeno metabólico, 80% para antígeno obtido em caldo NGTA (Neoptona-glicose-tiamina e asparagina) e 76,6% para antígeno obtido em caldo Negroni.

Na ID, quando se utiliza como antígeno filtrado de cultura obtido a partir de células leveduriformes de *P. brasiliensis* frente a soros de pacientes com suspeita clínica da doença, é possível detectar até três linhas de precipitação. O aparecimento de uma linha próxima ao orifício do antígeno é observado em aproximadamente 95 a 98% dos soros de pacientes portadores de doença ativa, sendo esta, a última a desaparecer após a instauração da terapia antifúngica. O número de linhas de precipitação observadas está intimamente relacionado à severidade da doença (Siqueira, 1982; Mendes Giannini et al., 1994).

Segundo Do Valle et al. (2001) situações entre as quais podem-se citar: a) o efeito pró-zona, devido ao excesso de antígenos decorrentes da disseminação/gravidade da doença; b) a formação de imunocomplexos com oclusão de epítomos; c) a presença de anticorpos assimétricos inibindo a ligação secundária em reações de precipitação; e d) níveis de anticorpos abaixo do limite de detecção da técnica, podem interferir na sensibilidade e eficácia da metodologia.

Neves et al. (2003) sabendo que a ID possui sensibilidade variável avaliaram 28 amostras de soros de pacientes com PCM confirmada, porém, com ausência de reatividade, por ID, frente ao antígeno *cell free antigen* obtido a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis*. A análise dos resultados revelou que a falta de reatividade destes soros pode estar relacionada à produção de títulos baixos de anticorpos IgG2 de baixa avidéz dirigidos contra epítomos de carboidratos. Neste mesmo trabalho, os autores citaram que para evitar a liberação de resultados falsos negativos, muitos laboratórios têm utilizado ensaios com especificidade elevada, como a ID, associados a técnicas com sensibilidade elevada, como ELISA indireto, sendo as reações cruzadas abolidas pelo uso de antígenos tratados com metaperiodato de sódio. Entretanto, os autores verificaram que para alguns pacientes que produzem preferencialmente anticorpos anti-*P. brasiliensis*, isótipo IgG2, de baixa avidéz, o tratamento com metaperiodato de sódio também aboliu a reatividade em ELISA, prejudicando assim a sensibilidade do ensaio.

A CIE pode ser utilizada no diagnóstico precoce da PCM, porém, por ser uma técnica mais onerosa não é utilizada rotineiramente em muitos laboratórios de rotina (da Silva et al., 2016). A exemplo da ID, a metodologia é útil para o monitoramento de rotina de pacientes com PCM durante o tratamento. Segundo Ferreira et al. (2016) a técnica apresenta sensibilidade entre 77 e 97% e especificidade de 95%.

Por meio da técnica de *immunoblotting* (IB), Camargo et al. (1989) e Restrepo (1992) verificaram que anticorpos IgG anti-*P. brasiliensis* reagiram com quatro componentes fúngicos principais, a saber: proteínas de 70, 52, 43 e 20-21kDa, presentes no antígeno Ag7, obtido a partir da cepa B-339; predominando a glicoproteína de 43 kDa (gp43), reconhecida por 100% dos soros de pacientes com PCM.

Silva et al. (2008) analisaram 23 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM e verificaram que 65% apresentaram, por ID, ausência de reatividade para *P. brasiliensis*. A análise por *immunoblotting*, destes soros não reagentes por ID, revelou 95,4% de reatividade frente à gp43 e 100% frente à gp70, empregando-se antígeno obtido no 5º dia de cultura da amostra 113 de *P. brasiliensis*. Estes resultados demonstraram que o emprego desta metodologia aumentou substancialmente a sensibilidade do imunodiagnóstico da PCM. Os autores sugerem, inclusive, a adoção de, pelo menos, dois (2) ensaios sorológicos para detecção de anticorpos, nos casos de diagnóstico duvidoso.

Perenha-Viana et al. (2012) avaliaram a segurança e sensibilidade sorológica da metodologia de *immunoblotting* visando o diagnóstico rápido e eficaz da PCM. O desempenho da técnica foi avaliado frente a 517 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica da doença, empregando exoantígeno bruto da cepa B-339 de *P. brasiliensis*. Os resultados sorológicos foram comparados àqueles obtidos pela reação de imunodifusão dupla. Do total de amostras avaliadas, 250 (48,4%) apresentaram reatividade por IB enquanto por ID a reatividade foi de 27%. Dentre as 337 amostras com ausência de reatividade por ID, 29% foram reconhecidas pela preparação antigênica, comprovando uma maior sensibilidade da técnica quando comparada a ID. Neste estudo, a metodologia de *immunoblotting* apresentou uma sensibilidade maior (95,5% para soros diluídos a 1:50 e 91,8% para os diluídos a 1:400) quando comparada à sensibilidade de 80% (soro puro) da imunodifusão dupla. Entretanto, a especificidade do IB foi inferior (54,5% para soros diluídos a 1:50 e 63,5% para os diluídos a 1:400) aquela obtida pelo teste padrão ouro sorológico (93,6%).

Bertoni et al. (2012) demonstraram o potencial do IB no diagnóstico diferencial entre tuberculose pulmonar e paracoccidiodomicose ao avaliarem amostras de soro de 134 pacientes triados clínica e radiologicamente para estas patologias. A pesquisa de anticorpos circulantes anti-gp43 de *P.*

brasiliensis, por IB, impediu que seis pacientes recebessem terapia empírica para tuberculose; por outro lado permitiu que outros seis pacientes, que não reagiram frente à gp43, fossem encaminhados para investigação laboratorial e tratamento adequado.

Passos (2012) avaliando os parâmetros intrínsecos dos ensaios de ID e IB, frente a 36 amostras de soro de pacientes com PCM ativa e 49 soros de doadores de sangue, demonstraram para ID sensibilidade de 81% e eficiência de 92%. Para o IB, a sensibilidade foi de 94% e eficiência de 98%. Para ambas as técnicas a especificidade foi de 100%. A análise de concordância (índice *kappa* de Cohen) entre ambas foi considerada boa ($k=0,76$). A autora concluiu que as metodologias são complementares para o diagnóstico presuntivo, prognóstico da doença e possível detecção precoce do processo infeccioso.

O teste de ELISA tem sido utilizado para a detecção de anticorpos em quase todas as micoses sistêmicas, senão em todas. Apesar disso, em relação ao imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose, a técnica, devido sua elevada sensibilidade e baixa especificidade, ainda oferece grande porcentagem de reatividade cruzada, principalmente frente a soros de pacientes com histoplasmose, candidíase, Doença de Jorge Lobo e, também, frente a soros de pessoas aparentemente saudáveis, residentes em áreas endêmicas para PCM (Maluf et al., 2003; Albuquerque et al., 2005; Mendes et al., 2017).

Cano et al. (1986) avaliaram o desempenho do ensaio de ELISA empregando antígeno citoplasmático de *P. brasiliensis*, demonstrando que 66% dos soros analisados reagiram a títulos maiores ou iguais a 1:128. Apenas 4 a 5% dos soros de indivíduos saudáveis doadores de banco de sangue, pacientes com histoplasmose e outras micoses sistêmicas reagiram a essa diluição, conferindo 95% de especificidade ao teste.

Sylvestre et al. (2014) avaliaram o desempenho do teste de ELISA empregando como preparação antigênica filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis* frente a 200 amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose e 200 amostras de soro de indivíduos saudáveis, doadores de banco de sangue. Foram avaliados dois *cut-offs* distintos, ou seja, 0,710 e 0,850, observando-se valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia de 96%, 95%, 95%, 96% e 95,5% para o primeiro ponto de corte e de 96,9%, 95,1%, 95%, 97% e 96% para o segundo ponto de corte. Os autores observaram ainda, elevada prevalência de resultados falso-positivos em amostras de outras doenças, principalmente quando a densidade óptica de 0,710 foi utilizada como *cut-off*, encontrando 41,4% de reatividade cruzada para tuberculose, 35,8% para histoplasmoses e 43,5% para bola fúngica aspergilar.

Silva (2014) otimizou e validou a metodologia de ELISA indireto visando sua aplicabilidade como método de triagem dos soros com suspeita clínica para PCM comparando-a com o ensaio de imunodifusão dupla. Foram avaliadas 425 amostras de soro (111 amostras obtidas de indivíduos saudáveis, 55 amostras de pacientes com PCM confirmada, 54 amostras de pacientes com outras micoses e 205 amostras de pacientes com suspeita clínica para PCM). A análise dos resultados do grupo controle demonstrou sensibilidade de 67% e 96% e especificidade de 100% e 95% para a ID e ELISA indireto, respectivamente. A comparação das duas técnicas, sendo a ID considerada como padrão ouro sorológico, resultou em co-positividade de 100% e co-negatividade de 70%. A concordância entre as técnicas foi classificada como boa segundo índice *kappa*. A análise das amostras de soros de pacientes com outras doenças pulmonares (aspergilose, histoplasmoses e tuberculose) demonstrou 50% de reação cruzada. Os resultados demonstram que, a metodologia de ELISA indireto, devido sua alta sensibilidade, pode ser aplicada como teste de triagem sorológica; conferindo assim maior rapidez na liberação dos laudos de pacientes com ausência de reatividade para *P. brasiliensis*.

Taborda e Camargo (1994), empregaram a metodologia de Dot-blot para avaliar 50 amostras de soros de pacientes com PCM, durante o período de tratamento com anti-fúngico, utilizando como antígeno a fração de 43 kDa (gp43) purificada. A análise dos resultados demonstrou sensibilidade e eficiência da metodologia, uma vez que revelou 100% de reatividade.

Martins et al. (1997), avaliaram pelas técnicas de Dot-blot, ELISA e *immunoblotting* utilizando *pool* de antígenos (somático e filtrado de cultura), o perfil de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* em amostras de soro de pacientes com doença ativa na fase pré-tratamento e durante o tratamento com itraconazol. Na fase de pré-tratamento, a detecção de anticorpos circulantes no soro de pacientes com título elevado de anticorpos IgG foi de 81,5% pelo Dot-blot e 84% pelo ELISA. Por outro lado, as porcentagens de soros pré-tratamento com títulos elevados para anticorpos IgA e IgM foram menores (51,9% e 51,8%, respectivamente para Dot-blot e 16% e 36% para ELISA) com tendência a se tornarem negativos. A técnica de DB apresentou decréscimo na fase pós-tratamento para 61% após um ano e 50% após três anos.

Correa et al. (2007) objetivando melhorar a eficácia da metodologia de Dot-blot avaliaram a aplicabilidade da proteína recombinante do gene p27 de *P. brasiliensis* subclonado. Cinquenta amostras de soro foram analisadas: 10 soros de sete pacientes com PCM, 10 com histoplasmose, 10 com aspergilose, 10 com tuberculose e 10 soros de indivíduos com ausência de reatividade para *P. brasiliensis* por imunodifusão dupla. Apesar da afirmativa dos autores de que o processo de obtenção antigênica é mais fácil, menos oneroso e útil, o estudo envolveu apenas sete soros de pacientes com a confirmação da doença, o que resulta em valores altos de sensibilidade e especificidade (100 e 98%, respectivamente).

Recentemente, Kamikawa et al. (2017) padronizaram e validaram o ensaio de Dot-blot visando o diagnóstico rápido da PCM. Foram avaliadas

300 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica da doença. A sensibilidade do ensaio, empregando como antígeno, filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339, foi de 91% e a especificidade de 95,4%, resultados superiores aos da ID, que frente as mesmas amostras e com o mesmo antígeno apresentou 72,7% e 98,5%, respectivamente.

Em relação a *P. lutzii*, por tratar-se de uma espécie descrita relativamente a pouco tempo, poucos são os trabalhos direcionados ao diagnóstico sorológico da PCM causada por esta espécie. Neste sentido, os dois únicos trabalhos publicados por Queiroz et al (2014) e Gegembauer et al (2014), concentram-se muito mais na busca de preparações antigênicas com aplicabilidade diagnóstica do que na avaliação sorológica propriamente dita. Diante do exposto, este assunto será tratado no próximo tópico.

1.9. Antígenos de *Paracoccidioides sp*

Várias preparações antigênicas já foram e/ou ainda são utilizadas no diagnóstico sorológico da PCM. Entre elas filtrado de cultura, antígenos citoplasmáticos ou somáticos, componentes solúveis da superfície externa da parede celular de *P. brasiliensis* (CSSEPC de Pb), *cell free antigen* (CFA), antígenos purificados e antígenos recombinantes. Porém, a obtenção dos mesmos não é padronizada e com a vasta quantidade de técnicas disponíveis com este propósito, o estudo e a padronização de métodos de extração tornam-se tão importantes quanto a avaliação e determinação do melhor (es) isolado (s) e meio (s) de cultura que devem ser empregados.

Na verdade, há diversos protocolos disponíveis e utilizados por centros de diagnósticos de modo que o resultado sorológico nem sempre é reproduzido entre as instituições (Camargo, 2008; Vidal et al., 2014).

Restrepo (1985) preconizou que diferentes preparações antigênicas possuem variações de qualidade dependendo do isolado empregado, da

fase morfológica, das condições de cultura, da técnica de obtenção e quantidade de repiques após o isolamento.

Segundo Negroni e Negroni (1968) o antígeno ideal deve ser de fácil preparo, apresentar alta estabilidade, conferir bons índices de sensibilidade e especificidade, permitir a repetitividade e reprodutibilidade dos resultados, além de poder ser utilizado em diferentes métodos sorológicos.

O histórico de produção de antígenos de *Paracoccidioides* sp é vasto e tem início com o trabalho de Moses (1916) que avaliou o desempenho de um extrato de levedura empregando a técnica de fixação do complemento. A partir de então, surgiram diversos métodos de obtenção de antígenos e com eles, os estudos de caracterização de perfil antigênico que possibilitaram melhorias ao diagnóstico e instrumentos para a compreensão dos resultados sorológicos.

Restrepo e Moncada (1974) utilizando filtrado de cultura de células leveduriformes de *P. brasiliensis* como antígeno para avaliar, por imunodifusão dupla, soros de pacientes com PCM descreveram a visualização de três (3) linhas de precipitação. Segundo os autores, a linha 1 localizada próxima ao orifício do antígeno estava presente em 85,1% dos soros avaliados, a linha 2 localizada em uma posição intermediária em 83,3% das amostras e por fim a linha 3, mais próxima ao orifício do soro em 64,8% das amostras avaliadas. Estes pacientes foram acompanhados por até três (3) anos e os autores observaram que as linhas de precipitação 2 e 3 diminuíram de intensidade ou até mesmo deixaram de aparecer no decorrer do tratamento e com a melhora clínica dos pacientes, entretanto, a linha 1 permaneceu evidente mesmo nos casos de melhora clínica substancial.

Em 1977, Yarzabal et al. purificaram o antígeno responsável pela formação do arco E, previamente descrita pelo grupo como sendo uma fração importante para o diagnóstico devido a especificidade e frequência

que ocorre em soros de pacientes com PCM. O grupo observou que o arco E era composto por dois componentes, E1 e E2, sendo o último identificado por meio da imunoeletoforese como específico para *P. brasiliensis*. A fração purificada foi avaliada frente a 14 amostras de soro de pacientes com PCM e duas (2) amostras de soros de pacientes com histoplasmose. O resultado confirmou a especificidade da fração E2 visto que não foi observada reação cruzada, mantendo reagente todas as amostras de soro de pacientes com PCM.

Em 1986, Puccia et al., estudaram a natureza do antígeno E2. Utilizando filtrado de cultura e cromatografia em coluna de gel filtração, obtiveram três frações denominadas de F1, F2 e F3. Dentre estas, apenas a fração F1 era imunorreativa frente a soros de pacientes com PCM pelo ensaio de imunodifusão dupla e apresentava afinidade pela Concanavalina-A. A eluição desta fração em coluna de afinidade forneceu componentes que analisados por SDS-PAGE apresentavam massas moleculares de 43, 55 e 70 kDa. Estudos de imunoprecipitação empregando soros destes pacientes demonstraram que apenas a fração antigênica com massa molecular de 43 kDa era imunoprecipitada por 100% dos soros de pacientes com PCM e não reativa com soros de indivíduos normais (Puccia et al., 1991). Os mesmos autores verificaram posteriormente, que a glicoproteína de 43 kDa (gp43) era o principal componente antigênico presente nas frações anteriormente descritas por Restrepo e Moncada (1974) e Yarzabal et al. (1977).

Kaufman e Standard (1978), obtiveram exoantígenos de *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* e *P. brasiliensis* em ágar Saubouraud utilizando solução 1:5000 de thimerosal. O antígeno de *P. brasiliensis* foi concentrado 50 vezes e avaliado por imunodifusão dupla frente a soro de referência. Os autores, a exemplo de Restrepo e Moncada (1974) verificaram a formação de três (3) linhas de precipitação e ausência de reatividade cruzada frente a soros de pacientes com outros processos infecciosos, sugerindo que esta metodologia de obtenção de antígeno pode

ser empregada para produção de imunobiológico visando o diagnóstico rápido e específico do agravo.

Camargo et al. (1989) relataram o preparo de um antígeno exocelular denominado Ag7, que, segundo os autores, poderia ser usado como antígeno padrão visando o imunodiagnóstico da PCM. Para tanto, escolheram a amostra B-339, cultivada em caldo Negroni, a 36°C por 7, 10, 15, 20, 25 e 30 dias, observando que as preparações antigênicas obtidas com 7, 10, 15 e 20 dias de cultivo apresentaram melhor padrão de reatividade, pela prova de ID, frente a soros de pacientes com PCM quando comparada às obtidas com 25 e 30 dias, verificando ainda, que a prova de ID apresentou 97,1% de sensibilidade e 100% de especificidade quando empregaram como antígeno a preparação obtida com sete (7) dias de cultivo. Os autores observaram que além de conferir altos índices de sensibilidade e especificidade, que o exoantígeno de sete (7) dias manteve sua atividade por vários anos quando mantido sob liofilização sugerindo assim, o emprego deste protocolo para a produção de reagentes estáveis com aplicabilidade no diagnóstico confirmatório da PCM.

Apesar de apresentar bons resultados o antígeno obtido por Camargo et al. (1989) apresentava uma obtenção laboriosa, composta por várias etapas, de modo que laboratórios com pouca infraestrutura e poucos recursos financeiros não conseguiam produzi-lo. Desta forma, em 2003 Camargo et al., baseados no protocolo anteriormente descrito, padronizaram um método simplificado, passível de ser utilizado por todos os laboratórios de mico-sorologia da América do Sul. Segundo os autores, todos os lotes de Ag7 simplificado revelaram por SDS-PAGE grandes quantidades de gp43. Além disso, todas as preparações antigênicas reagiram, por ID, frente às amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada, não sendo evidenciada reatividade cruzada frente a soros de pacientes com outras infecções fúngicas.

Assis et al. (1989) obtiveram antígenos solúveis, aos quais denominou de componentes solúveis da superfície externa da parede celular de *P. brasiliensis* (CSSEPC de Pb) a partir das amostras 2, 18, 265, 113, B- 339, 192, ADEL, G, PTL, S, SN e U em NaCl 0,85%, verificando que os mesmos apresentaram reatividade pela imunodifusão dupla e imunoeletroforese, frente a soros de pacientes com PCM e soros anti-antígeno particulado de *P. brasiliensis*. Empregando a técnica de *immunoblotting*, o autor observou que os antígenos apresentaram diferentes bandas de precipitação e que a preparação antigênica obtida da amostra 113 apresentou o maior número de bandas protéicas, incluindo a gp43, sugerindo assim, que essas frações proteicas estão presentes na superfície externa da parede celular, sendo solúveis em solução de NaCl 0,85%.

Camargo et al. (1991) propuseram um novo método de obtenção de exoantígeno de *P. brasiliensis* ao qual denominaram de *cell free antigen* (CFA) ou extrato livre de células. Trata-se de uma preparação antigênica composta por proteínas fúngicas que encontram-se fracamente ligadas a parede celular do patógeno e que são facilmente obtidas a partir da suspensão de células em solução tamponada com fosfatos (PBS), homogeneizadas vigorosamente em agitador de tubos (vortex). Os autores observaram por SDS-PAGE que a preparação antigênica obtida a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis*, cultivada durante três dias (3) e sete (7), em ágar Sauboroud, a 35°C apresentou um intenso perfil eletroforético, apresentando frações com massa molecular aparente migrando entre 10 e 110 kDa. Neste mesmo trabalho, verificaram por *immunoblotting* que soros de pacientes acometidos pela forma crônica reconheceram preferencialmente as frações de 20, 43, 45, 55 e 70 kDa enquanto os soros de pacientes portadores da forma aguda reagiram apenas com a fração de 43 kDa.

Blotta e Camargo (1993) empregaram a metodologia de *immunoblotting* para avaliar as frações antigênicas presentes no CFA obtido

a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis*. Para tanto selecionaram 60 amostras de soro de pacientes com PCM confirmada, 30 de cada forma clínica, ou seja, aguda e crônica. A análise do perfil eletroforético, por SDS-PAGE, revelou que a preparação antigênica apresentava 42 frações migrando entre 18 a 102 kDa. Os autores verificaram por *immunoblotting* que 31 frações diferentes foram reconhecidas, sendo que 23 frações foram reconhecidas por soros de pacientes da forma crônica e 30 frações por soros de pacientes da forma aguda. As frações antigênicas mais frequentes em pacientes da forma aguda foram: 24 e 28 kDa (20%), 20, 22, e 78 kDa (25%), 76 kDa (28%), 80 kDa (30%), 70 kDa (45%), e 43 kDa (100%). Enquanto para as amostras de soro de pacientes com a forma crônica as frações frequentes foram: 28 kDa (20%), 22 e 88 kDa (25%), 70 kDa (35%), e 43 kDa (100%). Segundo os autores, o antígeno CFA é composto por uma grande variedade de moléculas e independente da forma clínica o mesmo pode ser empregado na análise da resposta imune humoral de pacientes com PCM.

Apesar de todos os trabalhos acima citados considerarem a fração 43 kDa de *P. brasiliensis* imunodominante e por essa razão importantíssima para o diagnóstico sorológico, ainda em 1995 Del Negro et al relataram a não reatividade de alguns soros de pacientes com suspeita clínica de PCM frente a essa fração. Uma das hipóteses levantadas pelos autores para explicar a ausência de reatividade baseou-se nas diferentes isoformas de gp43. Tal especulação baseou-se no trabalho de Campos et al. (1995) que ao analisarem, por SDS-PAGE, 13 isolados de *P. brasiliensis* verificaram ausência da molécula de 43 kDa em três (3) preparações antigênicas. Os autores verificaram ainda que em duas (2) preparações apesar de ser possível a visualização da gp43, a mesma se apresentava na forma de uma linha de fraca intensidade, enquanto que em oito (8) preparações, a molécula era visível, sugerindo que era expressa/secretada em grandes quantidades. Estas oito (8) preparações antigênicas foram submetidas à

avaliação isoelétrica que revelaram quatro (4) perfis distintos de isoformas de gp43.

Algumas pesquisas sugerem que nem todos os epítomos expressos pela molécula de 43 kDa encontram-se presentes de maneira uniforme nas amostras de *P. brasiliensis* (Souza et al., 1997). Além disso, sabe-se que *P. lutzii* não produz uma gp43 idêntica àquela produzida por *P. brasiliensis* e que provavelmente a expressa pouco durante a infecção de modo que, para o diagnóstico de pacientes infectados com *P. lutzii* essa molécula parece não ter a mesma importância (Leitão et al., 2014)

Outra questão a ser observada na produção de antígenos e que dificulta a padronização é a variabilidade antigênica e bioquímica entre lotes produzidos pelo mesmo protocolo como demonstrado por Franco et al., (1996). No estudo, três amostras (Bt1, Bt2 e Bt3) isoladas de pacientes atendidos pelo Hospital Universitário da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) foram utilizadas para o preparo de antígenos (filtrado de cultura) empregando-se dois meios de cultura distintos: McVeigh & Morton (MMM) e PYG (protease de peptona, extrato de levedura e glicose). Cada antígeno foi preparado duas vezes com o objetivo de obter-se dois lotes diferentes da mesma preparação antigênica. A análise dos resultados revelou diferenças entre os lotes de antígenos obtidos a partir do mesmo isolado e diferenças entre antígenos de isolados distintos. Quando avaliada por SDS-PAGE a preparação antigênica obtida da amostra Bt2 produzida em PYG revelou 13 frações protéicas no primeiro lote e 24 no segundo lote, sendo que 12 eram comuns a ambas as preparações antigênicas. Em relação à preparação antigênica obtida no meio MMM observou-se 21 frações no primeiro lote e 15 frações no segundo lote, sendo que 13 frações eram compartilhadas entre ambos. Deve-se ressaltar que nove (9) frações proteicas/glicoproteicas em comum foram identificadas nas preparações antigênicas obtidas a partir do isolado Bt2, independentemente do lote e meio de cultura. Em relação ao conjunto de preparações antigênicas obtidas, observou-se por SDS-PAGE

que apenas seis (6) frações (43, 21, 19, 17, 14 e 13 kDa) eram comuns a todos independentemente do meio de cultura utilizado e isolado empregado. Segundo os autores, uma hipótese para as variações entre os preparados antigênicos possa estar relacionada à instabilidade fenotípica do fungo ou ainda da atividade residual proteolítica.

Alguns centros de diagnóstico empregam em seus ensaios sorológicos *pool de* isolados de *P. brasiliensis* na tentativa de melhorar a sensibilidade dos mesmos (Vidal et al., 2014). Da Silva et al. (1991) avaliaram a sensibilidade da mistura, em partes iguais, de filtrado de cultura e antígeno somático sendo seu desempenho comparando aos mesmos antígenos individualmente. Os autores verificaram, por microimunodifusão, que 100% dos soros avaliados reagiram frente à mistura dos antígenos, enquanto que 99,4% e 97,5% reagiram frente aos antígenos somático e filtrado de cultura, respectivamente. Neste mesmo trabalho, os autores avaliaram 26 amostras de soro de pacientes com PCM que haviam apresentado anteriormente ausência de reatividade frente ao antígeno somático, observando que 26,9% apresentaram reatividade frente ao filtrado de cultura, 34,6% ao antígeno somático e 38,5% a mistura dos antígenos. Os autores concluíram que a mistura antigênica proporcionou uma maior sensibilidade ao teste quando comparada a sensibilidade obtida com o uso individual dos antígenos, e sem aumentar a reatividade cruzada.

Atualmente alguns grupos têm se dedicado em identificar e produzir antígenos recombinantes de *P. brasiliensis* visto que os mesmos possuem a vantagem de reduzir a reação cruzada com outras infecções, o que pode ocorrer com antígenos brutos (Brummer et al., 1993), além de conferir maior reprodutibilidade à obtenção de antígenos (Ortiz et al., 1996; Peron et al., 2017). A exemplo ao observado para antígenos brutos, a associação entre antígenos recombinantes diferentes têm aumentado a sensibilidade e a eficácia dos ensaios (Diez et al., 2003; Fernandes et al., 2011).

A proteína de 27 kDa de *P. brasiliensis* foi escolhida por Ortiz et al. (1996) para ser expressa em *Escherichia coli*. Das 44 amostras de soro de pacientes com PCM confirmada avaliadas, por *immunoblotting*, 41 (91%) foram reagentes frente ao antígeno recombinante, não sendo observadas reações cruzadas com outras micoses e tuberculose.

Carvalho et al. (2008) avaliaram três isoformas da gp43 que foram expressas em *Pichia pastoris* (gp43rA, gp43rD e gp43rE) e compararam seu desempenho empregando os ensaios de ID e Dot-blot avaliando 90 soros de 78 pacientes diferentes. Por ID, verificaram que a positividade utilizando as isoformas gp43rD e gp43rE foi de 100% enquanto que para gp43rA foi de 98%, sendo que a especificidade foi de 100% para todas as isoformas. Os autores concluíram que estes antígenos recombinantes podem ser empregados no diagnóstico da PCM sem a necessidade da associação de antígenos, e que a isoforma gp43rE aparentemente produz o resultado mais próximo aquele obtido com gp43 purificada/nativa. Em relação ao Dot-blot, os autores obtiveram sensibilidade e especificidade elevada (100%) apenas quando os antígenos foram previamente tratados com metaperiodato de sódio.

Fernandes et al. (2011) avaliaram, por ELISA, o desempenho da associação de duas proteínas recombinantes (rPb27 e rPb40) no diagnóstico da PCM. Verificando que a sensibilidade do rPb27 e rPb40 utilizados individualmente foi de 89 e 54%, respectivamente. Quando associados, a sensibilidade do ensaio aumentou para 96%. A especificidade em relação a outras micoses foi de 100% quando empregados juntos diminuindo para 75% (rPb40) e 78% (rPb27) quando utilizados individualmente.

Peron et al. (2017) avaliaram o uso do antígeno recombinante HSP60 (*Heat shock protein*/proteína de choque térmico de 60 kDa) em associação a recombinante gp43 no diagnóstico da PCM. Empregando a metodologia de *immunoblotting* observaram que 90,9% dos soros apresentaram reatividade

frente a gp43 e 77,3 % frente a rHSP60 (proteína de choque térmico de 60 kDa recombinante), além disso, 27% das amostras obtidas de indivíduos saudáveis reconheceram esta proteína. Em contra partida, quando empregaram o ensaio de ELISA verificaram que a sensibilidade foi de 90,91% e a especificidade de 100% para gp43 e 73,33 e 77,27%, respectivamente para rHSP60. Em razão ao alto índice de reações cruzadas a rHSP60 não mostrou ser uma boa opção para diagnóstico. Segundo os autores os resultados falso positivos podem ser explicados pela semelhança que a proteína de choque térmico de 60 kDa de *P. brasiliensis* possui com outros patógenos como *B. dermatitidis*, *H. capsulatum* e *A. fumigatus*. Os autores discutem ainda sobre a possibilidade de soros de pacientes infectados por *P. lutzii* estarem incluídos na amostragem analisada, sendo, portanto, responsáveis pelos poucos casos não reagentes a gp43.

A produção de antígenos recombinantes requer o pleno conhecimento das frações antigênicas do fungo como um todo para que a melhor proteína possa ser escolhida como alvo a fim de ser expressa e aplicada no diagnóstico, conferindo assim alta sensibilidade e especificidade ao ensaio. Entretanto, deve-se lembrar de que ao contrário de *P. brasiliensis*, *P. lutzii* não encontra-se bem caracterizado e pouco se sabe sobre suas frações e quais moléculas são compartilhadas pelo gênero. Por essa razão, o uso de antígenos purificados ou ainda recombinantes podem não contemplar o diagnóstico de diversos pacientes infectados com *P. lutzii*.

Isso corrobora a necessidade de estudos que caracterizem os isolados com potencial de serem aplicados em testes diagnósticos visto que resultados falso negativos podem ocorrer. Apesar dos trabalhos pioneiros sobre *P. lutzii* pouco se sabe sobre suas frações imunogênicas e perfil proteico.

Queiroz et al. (2014) visando conhecer o perfil antigênico e imunogênico de três (3) amostras de *P. lutzii* isoladas de pacientes

provenientes do estado de Mato Grosso, obtiveram antígenos a partir dos isolados PI 2875, PI 9840 e PI 2912. A análise, por SDS-PAGE, do perfil proteico/glicoproteico dos antígenos, cultivados em caldo Fava-Netto, durante sete dias a 37°C, revelou perfil diferente entre si, revelando que o antígeno obtido do isolado PI 9840 foi o que apresentou um maior número de frações distintas. Por outro lado, os antígenos PI 2875 e PI 2912 apresentaram bandas mais difusas, sendo que uma fração de forte intensidade foi observada entre 50 e 60 kDa. Segundo os autores, o soro 9840, colhido do paciente com PCM por *P. lutzii* só foi capaz de reconhecer, por ID, seu próprio antígeno, ou seja, Ag-PI 9840 não reconhecendo os outros antígenos de *P. lutzii*. Os autores concluíram que os isolados de *P. lutzii* apresentam uma variabilidade antigênica significativa, sugerindo assim, a possibilidade da mesma estar relacionada às divergências observadas nos padrões de reatividade sorológica, por ID, dos pacientes infectados por *Paracoccidioides* sp quando utilizados antígenos obtidos de isolados de outras regiões frente a antígenos obtidos de isolados do estado de Mato Grosso.

Gegembauer et al. (2014) avaliaram amostras de soro de pacientes com PCM comprovada, por exames direto a fresco ou histopatológico, oriundos da região centro-oeste do Brasil frente a preparações antigênicas de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Inicialmente, todas as amostras foram avaliadas frente a antígeno de *P. brasiliensis* e gp43 a fim de selecionar soros de pacientes com PCM por *P. brasiliensis* daqueles com PCM por *P. lutzii*. Os soros não reagentes, nesta primeira etapa, foram então avaliados frente a três (3) preparações antigênicas diferentes de *P. lutzii*, a saber: exoantígeno, antígeno precipitado com ácido tricloroacético (AgTCA) e *cell-free antigen* (CFA). Das 89 amostras de soros avaliadas, por ID, frente ao antígeno bruto e gp43 de *P. brasiliensis*, 72 apresentaram reatividade, sendo classificados como sendo de pacientes com PCM por *P. brasiliensis*. Os 17 soros com ausência de reatividade, foram avaliados, por ID, frente exoantígeno, AgTCA e CFA de *P. lutzii*. O exoantígeno forneceu 58% de reatividade sorológica,

entretanto, as reações foram muito fracas; o AgTCA 17% de reatividade, apresentando também, reações de fraca intensidade e o CFA forneceu 100% de reatividade, permitindo a identificação de quatro linhas de precipitação. Ainda neste mesmo estudo, foi possível, empregando-se o ensaio de ELISA, diferenciar as amostras de soros de pacientes com PCM por *P. lutzii* daqueles por *P. brasiliensis* utilizando como antígeno o CFA obtido a partir da amostra EPM 208 de *P. lutzii*. Os soros dos pacientes com PCM por *P. lutzii* apresentaram altos títulos de anticorpos circulantes quando comparados com soros de PCM por *P. brasiliensis* e soros heterólogos. Por *immunoblotting*, os autores demonstraram que amostras de soros de pacientes com PCM por *P. lutzii* reconheceram vários antígenos homólogos, enquanto soros de pacientes com PCM por *P. brasiliensis* não reconheceram antígenos de *P. lutzii*. Os autores concluíram, que a preparação antigênica CFA de *P. lutzii* demonstra ser um excelente antígeno para o diagnóstico da PCM por *P. lutzii*.

Recentemente, Morais (2017) visando melhorar os parâmetros de diagnóstico sorológico bem como do acompanhamento terapêutico dos pacientes infectados por *Paracoccidioides* sp produziu, duas preparações antigênicas distintas, *exoantígeno* e *cell free antigen*, a partir de dois isolados (01 e 66) de *P. lutzii*. Estas preparações antigênicas foram avaliadas, por ID e contraímuno eletroforese, frente a amostras de soro de pacientes residentes em região potencialmente endêmica para *P. lutzii* e frente a amostras de soro de pacientes residentes em regiões endêmicas para *P. brasiliensis*. Diferente ao descrito por Gegembauer et al, (2014), a autora demonstra não ter sido possível a diferenciação entre as espécies de *Paracoccidioides* empregando ambos os ensaios sorológicos. A autora demonstra ainda, que mesmo apresentando grande variabilidade antigênica, os isolados de *P. lutzii* avaliados no referido trabalho, apresentam frações em comum com *P. brasiliensis*.

Sendo o Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Referência Estadual para o imunodiagnóstico das micoses, incluindo a PCM, tornou-se necessário, apesar do estado de São Paulo, não ser considerado região endêmica para *P. lutzii*, que o Instituto Adolfo Lutz dispusesse desta preparação antigênica para atender eventuais demandas visando à pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. lutzii*.

Diante do exposto, este trabalho, buscando autonomia na produção de preparações antigênicas de *P. lutzii*, uma vez que a mesma não encontrá-se disponível para comercialização, tem como objetivos: avaliar o perfil antigênico de *P. lutzii* e sua aplicabilidade no imunodiagnóstico da PCM causada por esta espécie de *Paracoccidioides*.

Para tanto, tendo conhecimento do baixo desempenho do filtrado de cultura de *P.lutzii* produzido por Queiroz Júnior et al. (2014), Gegembauer et al. (2014) e Morais (2017), uma das estratégias adotadas no desenvolvimento deste trabalho, foi a produção de antígenos de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* empregando a metodologia descrita inicialmente por Kaufman e Standard (1978) e posteriormente otimizada e padronizada no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses por Freitas (2005) para a produção de antígenos de *H. capsulatum*. É importante salientar que a metodologia padronizada por Freitas (2005) confere grandes vantagens econômicas aos laboratórios, uma vez que para a obtenção das preparações antigênicas, não há necessidade do emprego de estufa incubadora com agitação, equipamento com um custo relativamente alto e que necessita de manutenção preventiva com certa frequência, uma vez que estes imunobiológicos podem ser obtidos em fase estacionária. Soma-se a esta observação, os resultados obtidos pela autora, que demonstram claramente que o emprego da solução thimerosal-borato (1:5.000) permitiu a extração de proteínas fúngicas com potencial antigênico em um curto período de tempo, ou seja, 24 horas, quando comparado aos demais protocolos existentes. Além disso, o emprego da solução thimerosal-borato (1:5.000)

contribuiu para a obtenção de preparações antigênicas específicas e estáveis. Sabendo ainda, da dificuldade orçamentária que muitos laboratórios enfrentam em diferentes regiões do Brasil, este trabalho propõe, em substituição ao *cell free antigen* (extrato livre de células), preparação antigênica descrita por Camargo et al. (1991) a avaliação de uma preparação antigênica denominada, por Assis et al. (1989), de componente solúvel da superfície externa da parede celular de *P. brasiliensis* (CSSEPC de Pb). A metodologia em questão utiliza solução de NaCl 0,85% para a extração das proteínas fúngicas aderidas a parede celular do patógeno, enquanto que Camargo et al (1991) preconizam o emprego de solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,4 para a extração destas proteínas. Corroboram para o emprego dos CSSEPC de *Paracoccidioides* sp, o estudo conduzido no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Instituto Adolfo Lutz, por Silva (2005) e Silva et al. (2008), que demonstra que os antígenos produzidos por Assis et al (1989), além de serem específicos, apresentavam alta estabilidade, mais de 15 anos, após a sua obtenção.

2.0. Objetivos

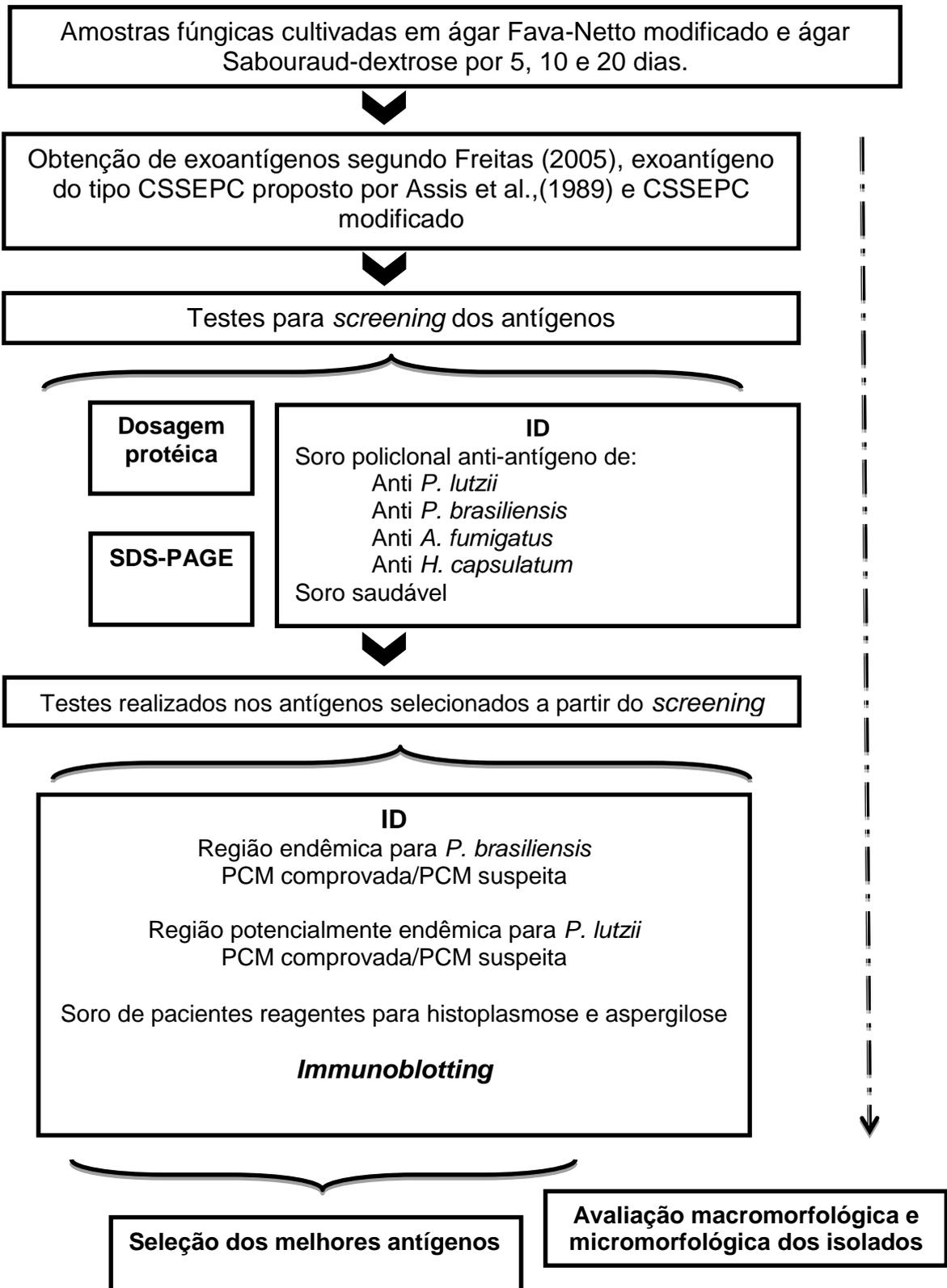
2.1. Objetivo Geral

O objetivo central deste estudo foi o estabelecimento e padronização de um protocolo visando à produção de antígeno de *Paracoccidioides lutzii* que possa ser utilizado em ensaios sorológicos visando o diagnóstico presuntivo e/ou confirmatório da paracoccidiodomicose causada por *P. lutzii*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os aspectos fenotípicos (macro e micromorfológicos) das amostras de *P. lutzii* cultivadas a 37°C, durante 5, 10 e 20 dias em ágar Fava-Netto modificado e em ágar Sabouraud-dextrose a fim de averiguar o possível efeito do meio de cultura na produção de antígenos;
- Caracterizar e avaliar por imunodifusão dupla e *immunoblotting* antígenos de *P. lutzii* obtidos segundo Freitas (2005), cultivados em ágar Fava-Netto modificado, a 37°C, durante 5, 10 e 20 dias;
- Caracterizar e avaliar por imunodifusão dupla e *immunoblotting* antígenos de *P. lutzii* obtidos segundo Freitas (2005), cultivados em ágar Sabouraud-dextrose, a 37°C, durante 5, 10 e 20 dias;
- Caracterizar e avaliar por imunodifusão dupla e *immunoblotting* antígenos de *P. lutzii* obtidos segundo Assis et al. (1989) cultivados em ágar Fava-Netto modificado, a 37°C, durante 5, 10 e 20 dias;
- Caracterizar e avaliar por imunodifusão dupla e *immunoblotting* antígenos de *P. lutzii* obtidos segundo Assis et al. (1989) cultivados em ágar Sabouraud-dextrose, a 37°C, durante 5, 10 e 20 dias;
- Avaliar e comparar o perfil eletroforético das diferentes preparações antigênicas de *P. lutzii* e *P. brasiliensis*.
- Avaliar a estabilidade das preparações antigênicas de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

3.0. Delineamento experimental



4.0. Material e métodos

4.1. Amostras de *Paracoccidioides* spp

As amostras utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho foram mantidas em ágar Fava-Netto modificado, a 37°C por meio de subcultivos quinzenais no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Unidade Técnica de Doenças Respiratórias e Zoonóticas, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

4.1.1. Amostras de *P. lutzii*

Foram utilizadas três amostras de *P. lutzii*, a saber:

1. Amostra 01: isolada na cidade de Goiânia, Goiás, Brasil em 1992 a partir de pele humana de paciente com paracoccidiodomicose. ATCC, sob o nº MYA-826. (Texeira et al., 2009; Almeida Junior et al., 2015)
2. Amostra 66: isolada na cidade de Goiânia, Goiás, Brasil a partir de tecido pulmonar de paciente com paracoccidiodomicose (Machado et al., 2011; Almeida Junior et al., 2015), e
3. Amostra 8334: isolada na cidade de Goiânia, Goiás, Brasil de paciente com paracoccidiodomicose (Machado et al., 2011; Almeida Junior et al., 2015).

4.1.2. Amostras de *P. brasiliensis*

Foram utilizadas duas amostras de *P. brasiliensis*, a saber:

1. Cepa B-339 isolada em São Paulo, Brasil de paciente portador da forma crônica de paracoccidiodomicose. Esta amostra encontra-se registrada junto ao *Mycology and Botany Department, American Culture*

Colletion, ATCC, USA, sob o nº 32069. Por apresentar grande quantidade da glicoproteína de 43 kDa (gp43), a mesma tem sido utilizada como amostra de referência para a produção de diversos tipos de antígenos obtidos a partir de células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Blumer et al., 1984; Camargo et al., 1989; Camargo et al., 1991; Panuto-Castelo et al., 2003; Camargo et al., 2003; Batista et al., 2010; Silveira-Gomes et al., 2012; Perenha-Viana et al., 2012; Machado et al., 2013; Gegembauer et al., 2014; Vidal et al., 2014; dos Santos et al., 2015; Kamikawa e Vicentini, 2015; Kamikawa et al., 2017)

2. Amostra 113: isolada em Manaus, Brasil em 1971 de paciente com lesão bucal. Por apresentar grande quantidade das glicoproteínas de 43 kDa (gp43) e 70 kDa (gp70), a mesma tem sido utilizada, também, para a produção de antígenos obtidos a partir de células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Mendes-Gianinni et al, 1984; Mendes-Gianinni et al., 1989; Del Negro et al., 1995; Silva et al., 1989; Assis et al., 1997; Del Negro et al., 2000; Silva et al., 2008).

As amostras de *P. lutzii* utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Gilda Maria Barbaro del Negro do Laboratório de Micologia Médica (LIM-53) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A cepa B-339 e a amostra 113 de *P. brasiliensis* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Para a obtenção dos antígenos de *Paracoccidioides* spp, foram utilizados os meios de cultura ágar Fava-Netto modificado **Anexo B, item 1** e ágar Sabouraud-Dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) **Anexo B, item 2**.

4.2. Obtenção de Antígenos de *Paracoccidioides* spp

4.2.1. Exoantígeno de *Paracoccidioides* spp, segundo Freitas (2005)

Cada uma das três amostras de *P. lutzii* foi semeada em tubos de ensaio 20x200 mm, contendo 20,0 mL de ágar Fava-Netto modificado ou ágar Sabouraud-Dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). As culturas foram mantidas em estufa bacteriológica (Fanem modelo 002 CB, São Paulo, Brasil) a 37°C por 5, 10 e 20 dias. Finalizado o período de incubação as culturas foram cobertas com 10,0 mL de solução thimerosal-borato a 1:5000 (**Anexo C**) e deixadas em repouso por 24 horas a temperatura ambiente. Após este período, a solução foi cuidadosamente aspirada com o auxílio de uma pipeta sorológica estéril de 10,0 mL em capela de segurança biológica e posteriormente filtrada em unidade filtrante estéril de 0,22 µm (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). O produto resultante foi concentrado 10 e 20 vezes por liofilização (Edwards, Dongen, Netherlands) e armazenado a - 20°C até o momento do uso.

A obtenção dos exoantígenos empregando-se a cepa B-339 e a amostra 113 de *P. brasiliensis* foi realizada nas mesmas condições descritas acima, porém considerando-se a experiência prévia do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, as leveduras permaneceram em cultura por um período de sete (7) dias.

4.2.2. Componente Solúvel da Superfície Externa de *Paracoccidioides* spp (CSSEPC de *Paracoccidioides* spp)

A obtenção do antígeno denominado Componente Solúvel da Superfície Externa de *Paracoccidioides* spp foi realizada empregando-se dois protocolos distintos, o primeiro descrito por Assis et al. (1989) e o segundo a partir de uma versão modificada do mesmo.

4.2.2.1. Componente Solúvel da Superfície Externa de *Paracoccidioides* spp (CSSEPC de *Paracoccidioides* spp), segundo Assis et al. (1989)

Cada uma das três amostras de *P. lutzii*, foi semeada em tubos de ensaio 20x200 mm, contendo 20,0 mL de ágar Fava-Netto modificado ou ágar Sabouraud-Dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C por 5, 10 e 20 dias. Após o tempo de crescimento as células leveduriformes foram delicadamente retiradas do meio de cultura com o auxílio de alça de inoculação descartável (Global Plast, China) e ressuspensas em solução salina 0,85%, utilizando-se a proporção de dois tubos de cultura para 1,0 mL de salina 0,85%. Essa solução foi vigorosamente agitada em vórtex (Agitador de tubos-TE162, Phoenix, Brasil) por 5 minutos e centrifugada a 3000 rpm (Super T 21, Sorvall, Miami, FL, USA) por 30 minutos. O sobrenadante, contendo as proteínas fúngicas fracamente ligadas à parede celular de cada uma das amostras, foi coletado e filtrado em unidade filtrante estéril de 0,22 µm (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e armazenado em geladeira (6 a 10°C) até o momento do uso.

4.2.2.2. Componente Solúvel da Superfície Externa de Modificado de *Paracoccidioides* spp

Cada uma das três amostras de *P. lutzii*, foi semeada em tubos de ensaio 20x200 mm, contendo 20,0 mL de ágar Fava-Netto modificado ou ágar Sabouraud-Dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C por 5, 10 e 20 dias. Após o tempo de crescimento as células leveduriformes foram delicadamente retiradas do meio de cultura com o auxílio de alça de inoculação descartável (Global Plast, China) e ressuspensas em solução aquosa de thimerosal-borato (1:5.000), utilizando-se a proporção de dois tubos de cultura para 1,0 mL de solução aquosa de thimerosal-borato. Essa solução foi vigorosamente agitada em vórtex (Agitador de tubos-TE162, Phoenix, Brasil) por 5 minutos

e centrifugada a 3000 rpm (Super T 21, Sorvall, Miami, FL, USA) por 30 minutos. O sobrenadante, contendo as proteínas fúngicas fracamente ligadas à parede celular de cada uma das amostras, foi coletado e filtrado em unidade filtrante estéril de 0,22 µm (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e armazenado em geladeira (6 a 10°C) até o momento do uso.

Nota: Os procedimentos descritos foram executados igualmente para todos os isolados, diferindo que para o meio ágar Sabouraud-Dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) as amostras fúngicas foram previamente adaptadas por meio de repiques no mesmo.

4.2.3. Antígeno de referência de *P. lutzii*

Foi utilizado como antígeno de referência para *P. lutzii*, o extrato livre de células (CFA) obtido a partir da amostra EPM 208 por Gegembauer et al. (2014). Este antígeno foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

4.3. Liofilização

As preparações antigênicas produzidas empregando-se o método proposto por Freitas (2005) foram aliqüotadas em frascos do tipo penicilina (2,5 mL/frasco) previamente esterilizados em forno Pasteur (Precision Scientific Co, Tamilnadu, Índia) a 180°C por 1h. Os frascos foram selados com Parafilm M® (Bemis NA, Neenah, WI, USA) que foi inteiramente furado com o auxílio de uma agulha, a fim de permitir a formação de vácuo. Os antígenos foram primeiramente congelados por 24 horas a - 20°C, sendo posteriormente transferidos para freezer a - 80°C durante 24 horas, de onde foram retirados apenas no exato momento da liofilização (Edwards, Dongen, Netherlands). Após a disposição dos frascos na plataforma do equipamento,

uma cuba de acrílico foi acondicionada sobre os frascos contendo as preparações antigênicas congeladas, isolando-as do ambiente externo e a bomba de vácuo foi acionada. A pressão negativa criada dentro do sistema fez com que a água presente no material, ainda em estado sólido, passasse ao estado gasoso, realizando a desidratação dos antígenos com a manutenção de seu soluto. Passado o período de 24h o material foi retirado do aparelho e armazenado a - 20°C até o momento do uso. Cada antígeno obtido foi avaliado *in natura* e 10 e 20 vezes concentrados, sendo, neste caso, reconstituído em 125 µl ou 250 µl de água destilada, respectivamente.

Em razão da grande quantidade de amostras, a liofilização foi gentilmente realizada, com mesmo rigor e método, no Núcleo de Coleção de Microorganismos e no Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, e também no Laboratório de Investigação Médica em Micologia (LIM-53) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.4. Dosagem Proteíca

O conteúdo protéico dos antígenos foi determinado pelo método de Bradford (1976), através do equipamento NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, DE, USA). Foram realizadas três dosagens para cada preparação antigênica e a concentração proteica foi determinada pela média aritmética dos valores encontrados.

4.5. Aspectos morfológicos das amostras de *Paracoccidioides* spp

Tubos de ensaio 20x200 mm, contendo 20,0 mL de ágar Fava-Netto modificado ou ágar Sabouraud-Dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), foram inoculados com *P. lutzii* e *P. brasiliensis* e mantidos a 37°C, durante 5, 10 e 20 dias. Células leveduriformes cultivadas nestas condições

foram avaliadas quanto aos aspectos macromorfológicos e micromorfológicos.

A análise macromorfológica foi realizada através da observação a olho nú das colônias leveduriformes, sendo observados os seguintes parâmetros: pigmentação, textura e relevo das colônias.

Para a análise das características micromorfológicas, as células leveduriformes de cada um dos isolados foram coletadas cuidadosamente da superfície dos meios de cultura com o auxílio de alça de inoculação descartável (Global Plast, China), sendo colocadas na superfície de uma lâmina para microscopia, contendo uma gota de corante azul de algodão. (Inlab, São Paulo, SP, Brasil), sendo homogeneizado cuidadosamente. Em seguida, uma lamínula foi colocada sobre a mistura “células leveduriformes e corante”, sendo selada com a aplicação de esmalte. Lâminas assim preparadas foram examinadas em microscópio óptico (Olympus Bx40, Latin American Inc) empregando objetivas de 10 e 40 vezes.

4.6. Amostras de soro

4.6.1. Soros Humanos

Foram analisados quanto à presença de anticorpos circulantes anti-*Paracoccidioides* spp um total de 150 amostras de soros assim distribuídas:

- 24 amostras de soro de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada, residentes no estado de São Paulo e encaminhadas ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, para acompanhamento sorológico;
- 10 amostras de soro de pacientes com histórico de reatividade para *P. brasiliensis*, residentes no estado de São Paulo, porém com ausência de reatividade na última avaliação sorológica; encaminhadas ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, para acompanhamento sorológico;

- 10 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose, residentes no estado de São Paulo, porém, com ausência de reatividade frente ao antígeno de *P. brasiliensis* (filtrado de cultura obtido a partir de leveduras da cepa B-339), encaminhadas ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*;
- 51 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose, residentes nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, regiões consideradas “potencialmente” endêmicas para *P. lutzii* e encaminhadas ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública dos respectivos estados para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*;
- 05 amostras de soro de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada por métodos micológicos e/ou histopatológico residentes no estado de Mato Grosso do Sul, região considerada “potencialmente” endêmica para *P. lutzii* e gentilmente cedidas pela Prof^a Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul;
- 21 amostras de soro de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada por métodos micológicos e/ou histopatológico residentes no estado de Rondônia, região considerada “potencialmente” endêmica para *P. lutzii* e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rui Durlacher do Centro de Medicina Tropical de Rondônia (CEMETRON);
- 20 amostras de soro de pacientes com confirmação sorológica de histoplasmose (10) e aspergilose (10), encaminhados ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, para acompanhamento sorológico;
- 9 amostras de soro de indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de banco de sangue.

4.6.2. Anticorpos policlonais anti-exoantígeno de *Paracoccidioides* spp

Empregou-se como controle positivo das reações (imunodifusão dupla em gel de agarose e *immunoblotting*), os seguintes anticorpos policlonais: a) anti-exoantígeno de *P. brasiliensis* obtido em coelho e produzido pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses e b) anti-exoantígeno de *P. lutzii* obtido em coelho e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gil Benard do Laboratório de Investigação Médica em Micologia (LIM-53), Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

4.6.3. Anticorpos policlonais anti-exoantígeno de *Histoplasma capsulatum* e *Aspergillus fumigatus*

Visando avaliar a especificidade das preparações antigênicas de *Paracoccidioides* spp, anticorpos policlonais anti-exoantígenos de *H. capsulatum* e *A. fumigatus* também foram utilizados para o desenvolvimento das provas sorológicas, com ênfase na reação de imunodifusão dupla em gel de agarose.

4.7. Caracterização dos Antígenos de *Paracoccidioides* spp

4.7.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamina contendo Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Os procedimentos para eletroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-AldrichCo., St. Louis, MO, USA) foram conduzidos segundo metodologia proposta por Laemmli (1970), com gel de separação linear a 10% e gel de empilhamento a 3% de acrilamida com espessura de 1,5 mm; empregando equipamento Mini-

Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Com o objetivo de tornar as proteínas provenientes dos antígenos de *Paracoccidioides sp* lineares, as diferentes preparações antigênicas foram aquecidas por três minutos a 100°C com tampão de ruptura (62 mM de Tris- HCl pH 6,8 contendo 0,2% (p/v) de SDS, 50 mM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 0,005% de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) e 10% (v/v), de glicerol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), em água deionizada), sendo aplicados 20 µL de cada preparação antigênica por *slot*. A visualização do perfil eletroforético se deu por meio da coloração dos géis empregando-se nitrato de prata (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), segundo protocolo descrito por Ansorge (1985).

A corrida eletroforética foi realizada com diferença de potencial de 80 volts para percorrer o gel de empilhamento e 100 volts para percorrer o gel de separação, empregando-se fonte (Hofer Power Supply, modelo SX 250, Hofer Pharmacia Biotech Inc., São Francisco, CA, USA). Para cada corrida foi utilizado padrão de peso molecular (Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range, Bio-Rad, Inc., Hercules, CA, USA), composto por oito (8) proteínas com massa molecular entre 6 a 211 kDa.

4.7.2. Western Blotting

A transferência eletroforética de proteínas contidas em géis de poliacrilamida para as membranas de nitrocelulose foi executada conforme metodologia padronizada por Passos (2012) a partir dos protocolos estabelecidos por Towbin et al. (1979) e Vicentini (1997), usando equipamento Trans-Blot System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Após a eletroforese, os géis foram apostos sobre membranas de nitrocelulose de 0,22 µm (Sigma-AldrichCo. St. Louis, MO, USA), recobertos com papel de filtro e comprimidos com esponjas de poliuretano. Todo o material utilizado foi previamente embebido em tampão de transferência constituído por 25 mM de Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20% (v/v), sendo em seguida, encaixados em placas acrílicas perfuradas e mergulhadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão.

A transferência foi realizada empregando-se voltagem constante de 30 volts por 18 horas, a 4°C. Após a transferência, a fim de verificar a eficácia do processo, as membranas foram coradas com Ponceau-S (Sigma-AldrichCo. St. Louis, MO, USA) por cinco minutos e descoradas em água destilada.

As soluções, tampões e corantes utilizados na técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e *western blotting* encontram-se descritas no **Anexo D**.

4.7.3. Imudifusão Dupla em Gel de Agarose (ID)

A ID foi proposta por Ouchterlony (1949), e foi utilizada no presente trabalho para verificar a reatividade das preparações antigênicas frente aos diferentes soros.

Neste ensaio, lâminas de vidro (26x75 mm) foram limpas com solução de álcool-éter e cobertas completamente com 1,0 mL de ágar bacteriológico 1%. Após 24 horas, desidratando, na estufa (FABBE, modelo 116, Fábrica de Aparelhos Bacteriológicos e Esterelizadores Ltda, São Paulo, SP, Brasil) a 60°C as lâminas foram forradas com 3,0 mL de ágar citrato de sódio sendo armazenadas em câmara úmida a temperatura de 6 a 10°C até o momento do uso. Utilizando um molde em forma de roseta, um orifício central e seis laterais, foram escavados no gel formando os orifícios

em que os antígenos, controles positivos e soros testes foram aplicados. A reação antígeno-anticorpo ocorreu durante 48h em câmara úmida a temperatura ambiente. Após esse período foi realizada, com a ajuda de um negatoscópio, uma leitura prévia das linhas de precipitação. As lâminas foram lavadas em solução citrato de sódio 5% por 45 minutos seguindo-se de sucessivas lavagens em solução salina 0,85% por 24 horas. Ao fim das lavagens os orifícios foram cobertos com ágar bacteriológico 1% e as lâminas, após serem envelopadas com papel filtro, foram colocadas em estufa a 60°C durante no mínimo 18h. A leitura definitiva das linhas de precipitação foi realizada após a coloração das lâminas com Coomassie Brilliant Blue R (Sigma-AldrichCo., St. Louis, MO, USA), durante 05 minutos, e descoradas por 10 minutos, utilizando-se solução descorante (10% de ácido acético glacial, 45% de álcool etílico, 45% de água destilada).

Todas as soluções, tampões e corantes usados na ID encontram-se descritas no **Anexo E**

4.7.4. Immunoblotting

Membranas de nitrocelulose contendo as proteínas fúngicas transferidas conforme descrito no **item 4.7.2** foram identificadas, cortadas em fitas, de aproximadamente 0,5 cm, e incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, em solução salina tamponada com fosfatos acrescida de 5% de leite desnatado (PBS -L 5%) a fim de bloquear os sítios de ligação inespecíficos.

As fitas contendo as preparações antigênicas de *P. lutzii* foram incubadas com 2,0 mL de cada um dos soros testes e soro controle-positivo, ambos, diluídos na proporção de 1:100 em solução salina tamponada com fosfatos acrescida de 3% de leite desnatado (PBS-L 3%). Esta etapa do ensaio foi realizada a temperatura ambiente sob agitação constante, por duas (2) horas. Finalizado o período de incubação, as fitas de nitrocelulose

foram lavadas seis vezes, por 10 minutos cada, em solução salina tamponada com fosfatos acrescida de 0,1% de Tween 20 (PBS-T 0,1%). Posteriormente, as membranas foram incubadas com 2,0 mL de anti- IgG humana conjugada à peroxidase (Sigma-AldrichCo. St. Louis, MO, USA), diluído a 1:3000 em solução PBS-L 3%, sendo mantidas por uma (1) hora e 30 minutos sob agitação constante, a temperatura ambiente, protegidas da luz, e em seguida, novamente lavadas por seis vezes, 10 minutos cada, em solução PBS-T 0,1%.

A reação foi revelada empregando-se solução de 4-cloro-1-naftol (Sigma- Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) e o bloqueio feito por lavagens sucessivas em água destilada.

Todas as soluções, tampões e corantes usados no *immunoblotting* encontram-se descritas no **Anexo F**.

4.8. Determinação de Peso Molecular

Os pesos moleculares (PMs) das bandas protéicas de interesse foram determinados colocando seus Rf(s) (*Reference front*) na equação da reta obtida através da curva de calibração construída com os padrões de PMs de cada corrida em programa Excel.

$Rf = \frac{\text{distância em mm da migração de cada padrão ou amostra}}{\text{distância em mm da migração total do gel}}$

4.9. Estudo da estabilidade dos antígenos de *Paracoccidioides spp*

A estabilidade das preparações antigênicas foi avaliada em dois (2) aspectos, (1) a estabilidade ao longo do tempo de obtenção e (2) o comportamento dos antígenos a condições adversas de temperatura.

1. Os antígenos selecionados no *screening* foram avaliados quanto a estabilidade após, 3, 6, e 9 meses de sua obtenção, por ID, frente ao soro policlonal anti-antígeno de *P.lutzii* .

2. Os antígenos obtidos segundo os métodos de Freitas (2005), Assis et al. (1989) e sua versão modificada foram deixados sob a bancada, a temperatura ambiente, por 48h, em duas situações distintas: apenas liofilizados ou reconstituídos em água destilada. Passado esse período, a estabilidade das preparações antigênicas foi avaliada, por ID, frente a anticorpo policlonal anti-antígeno de *P.lutzii*.

5.0. Resultados

5.1. Aspectos macromorfológicos e micromorfológicos de *P. lutzii*.

Isolado 01 de *P. lutzii*

Cultura em ágar Fava-Netto modificado

A avaliação dos aspectos macromorfológicos das células leveduriformes do isolado 01 de *P. lutzii*, demonstrou que quando cultivadas a 37°C em ágar Fava-Netto modificado as colônias eram cerebriiformes, distribuindo-se de forma homogênea pela superfície do meio de cultura. De crescimento rápido, apresentaram pigmentação creme claro que escureceu gradativamente com o tempo de cultivo (10 e 20 dias). Durante os repiques observou-se que apresentou textura cremosa sendo pouco aderida ao meio, característica comum observada para todos os pontos analisados, ou seja, cinco (5), 10 e 20 dias. Entre os isolados avaliados, este foi o que apresentou crescimento mais rápido. Verificou-se que com 20 dias de cultivo as colônias tomaram toda a superfície do meio, formando camadas de células gerando grande volume de massa fúngica (**Figura 5 A**).

Microscopicamente, observou-se a presença de células mães globosas a sub-globosas, birrefringentes, com brotamentos clavados e/ou alongados de base estreita. Verificou-se com 10 dias de cultivo, uma diminuição no número de brotamentos, sendo que estes apresentaram morfologia piriforme de base estreita, quando comparados às culturas de cinco (5) dias, indicando se tratar de células jovens. A análise das leveduras cultivadas durante 20 dias permitiu a visualização de células mães globosas com brotamentos piriformes. Observou-se para todos os pontos avaliados, a presença de pseudohifas, sendo que as culturas de 20 dias apresentaram maior quantidade destas estruturas quando comparada aos demais tempos de cultivo. Quanto à dimensão das leveduras, observou-se que as mesmas apresentaram variação no diâmetro, alcançando até 19,38 µm (**Figura 2**).

Cultura em ágar Sabouraud-dextrose

A avaliação dos aspectos macromorfológicos das células leveduriformes do isolado 01 de *P. lutzii*, demonstrou que quando cultivadas a 37°C em ágar Sabouraud-dextrose as colônias mostraram-se cerebriformes, com textura cremosa e pigmentação creme, revelando discreto escurecimento durante o tempo de cultivo. As culturas apresentaram crescimento homogêneo, sendo pouco aderidas ao meio. Notou-se, entretanto, que a velocidade de crescimento foi inferior quando comparada àquela observada para as células cultivadas em ágar Fava-Netto modificado (**Figura 5 A**).

Microscopicamente, as células leveduriformes, do isolado 01 cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose, durante cinco (5) dias apresentaram-se pleomórficas. Observou-se, porém, o predomínio de células com dimensões inferiores as observadas quando as leveduras foram cultivadas em ágar Fava-Netto modificado. Verificou-se que células mães alongadas produziram brotamentos filiformes, enquanto que células mães globosas apresentaram células filhas globosas a piriformes, tanto de base estreita, como de base larga, ou seja, pode-se observar a presença de células em diferentes estágios de maturação. Notou-se aumento da esporulação das células quando cultivadas neste meio de cultura. Por outro lado, com 10 dias de cultivo verificou-se o predomínio de células maduras soltas, e contrastando ao observado com cinco (5) dias de cultura, as que possuíam brotamentos, na sua maioria eram de base larga e globosa. Em relação às pseudohifas, apesar de existentes eram raramente visualizadas. Apesar de ainda apresentarem leveduras brotantes, observou-se que as culturas de 20 dias apresentaram grandes quantidades de células com aspecto morfológico de meia lua e com parede celular enrugada/distorcida, indicando estarem em processo de morte celular. Nos períodos avaliados observou-se que as leveduras apresentaram variação no diâmetro, alcançando até 20,53 µm (**Figura 2**).

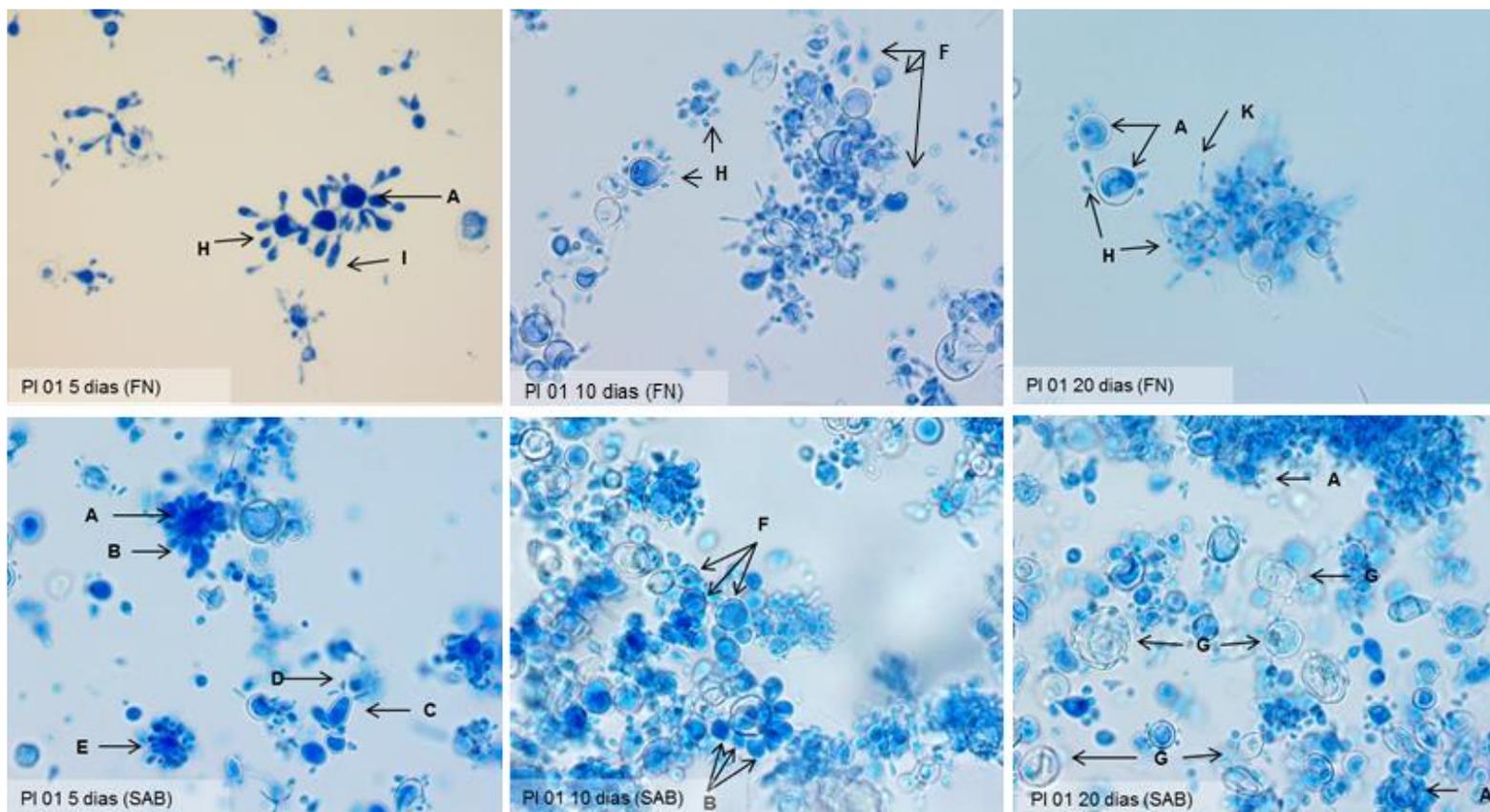


Figura 2. Análise micromorfológica do isolado 01 de *P. lutzii* cultivado em ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose durante cinco (5), 10 e 20 dias. A) célula mãe globosa, B) brotamento globoso de base larga, C) célula mãe alongada, D) brotamento filiforme, E) brotamentos, F) células soltas, G) degeneração celular, H) brotamento piriforme, I) brotamento alongado, K) pseudohifa. Aumento de 400 vezes.

Isolado 66 de *P. lutzii*

Cultura em ágar Fava-Netto modificado

A avaliação dos aspectos macromorfológicos das células leveduriformes do isolado 66 de *P. lutzii* cultivado durante cinco (5), 10 e 20 dias a 37°C em ágar Fava-Netto modificado revelou a presença de colônias cerebriformes, com textura cremosa e úmida. Inicialmente, pode-se observar que as colônias desenvolveram-se separadamente e que com o tempo a colônia tomou conta de toda a superfície do meio, porém de forma heterogênea, pois em alguns pontos pareceu ocorrer um pequeno acúmulo de células, como se as leveduras tivessem se desenvolvido mais naquele local (**Figura 5 B**).

Microscopicamente, as leveduras do isolado 66 cultivadas durante cinco (5) dias revelaram a presença de células mães birrefringentes, multinucleadas, com brotamentos alongados filiformes de base estreita. Observou-se neste período, a presença de tubos germinativos e pseudohifas. As leveduras apresentaram-se pleomórficas, tanto em dimensão, quanto em formato. Observou-se a presença de células mães tanto alongadas como globosas, bem como brotamentos alongados e/ou clavados, de base estreita. Com 10 dias de cultivo, verificou-se que as células apresentaram uma grande quantidade de brotamentos. Por outro lado, com 20 dias de cultivo foi possível observar a presença de leveduras com retração citoplasmática e parede celular degenerada; contrastando com a visualização de células jovens com brotamentos clavados de base estreita. As dimensões das células alcançaram 27,71µm (**Figura 3**).

Cultura em ágar Sabouraud-dextrose

Os aspectos macromorfológicos das células leveduriformes do isolado 66 de *P. lutzii* cultivado durante cinco (5), 10 e 20 dias a 37°C em ágar Sabouraud-dextrose foi semelhante às observadas em ágar Fava-Netto modificado, ou seja, as colônias eram cerebriformes, de pigmentação em

tom bege mais escuro daquele observado em ágar Fava-Netto modificado, cremosas, úmidas e pouco aderidas ao meio de cultura. Deve-se ressaltar que este isolado também apresentou diferença na cinética de crescimento em ágar Sabouraud-dextrose. Além de crescer mais lentamente, observou-se que a massa fúngica desenvolvida nesse meio de cultura foi inferior aquela obtida quando cultivado em ágar Fava-Netto modificado, sendo que a distribuição das colônias no meio foi heterogênea (**Figura 5 B**).

Micromorfológicamente, o isolado 66 cultivado durante cinco (5) dias em ágar Sabouraud-dextrose revelou a exemplo do observado para o isolado 01 mantido nas mesmas condições, aumento no mecanismo de esporulação. Verificou-se com cinco (5) dias de cultivo, a presença de células mães globosas, birrefringentes, com diâmetros maiores e riqueza de brotamentos piriformes a levemente alongados de base estreita. Observou-se também a presença de células com parede degenerada, algumas em meia lua. Leveduras cultivadas durante 10 dias apresentaram padrão morfológico similar ao descrito anteriormente, entretanto, notou-se a presença de tubos germinativos. Observou-se nas culturas de 20 dias diminuição do número de brotamentos e aumento do número de células com retração citoplasmática e degeneração celular. As dimensões das células alcançaram 19,47 μm (**Figura 3**).

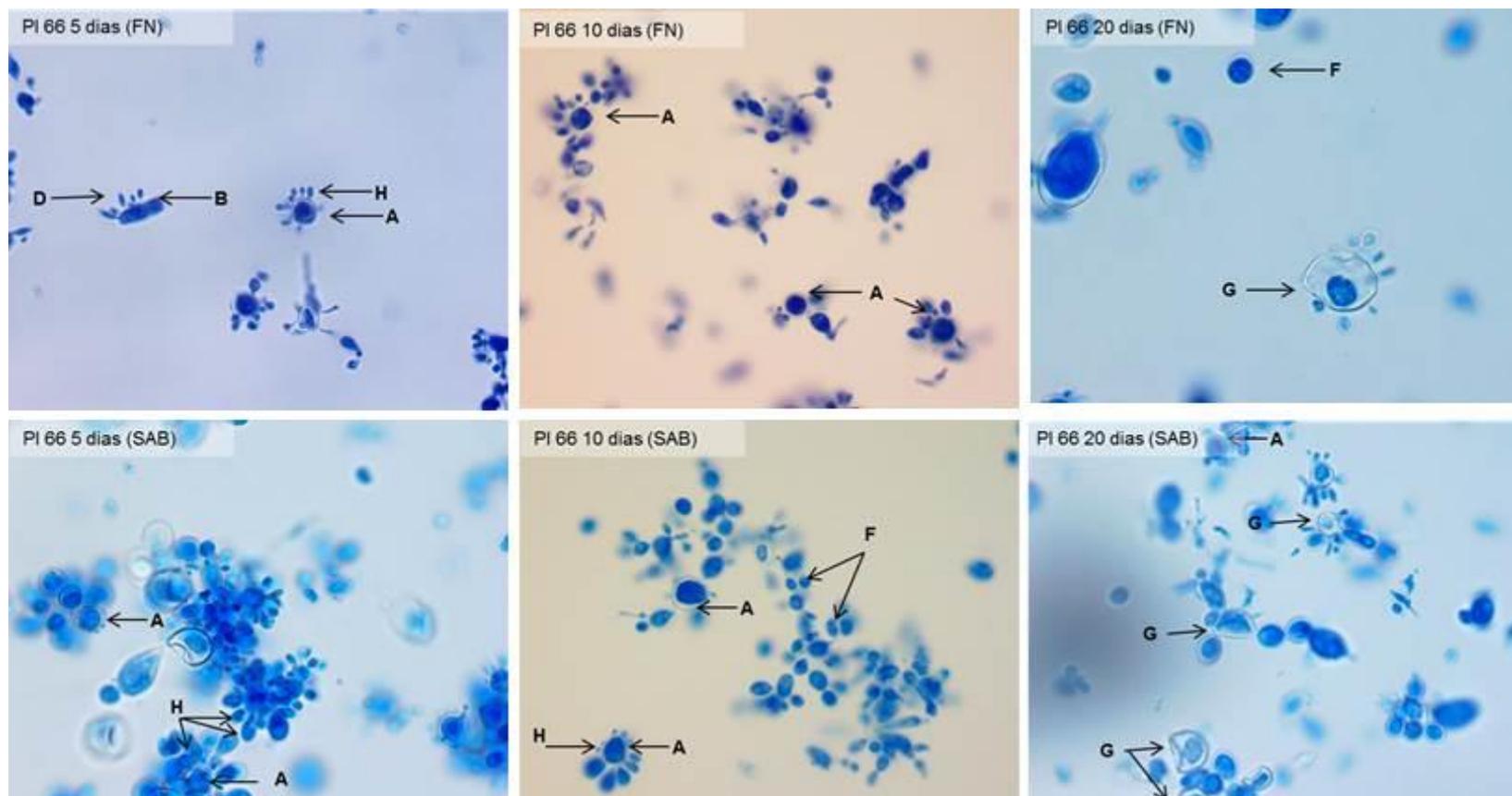


Figura 3. Análise micromorfológica do isolado 66 de *P. lutzii* cultivada em ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose durante cinco (5), 10 e 20 dias. A) célula mãe globosa, B) célula mãe alongada D) brotamento filiforme, F) células soltas, G) degeneração celular, H) brotamento piriforme. Aumento de 400 vezes.

Isolado 8334 de *P. lutzii*

Cultura em ágar Fava-Netto modificado

A avaliação dos aspectos macromorfológicos das células leveduriformes do isolado 8334 de *P. lutzii* cultivado a 37°C em ágar Fava-Netto modificado demonstrou que as colônias eram cerebriformes de pigmentação bege, secas e aderidas à superfície do meio de cultura distribuindo-se em grupos compactos **(Figura 5 C)**.

A avaliação micromorfológica deste isolado cultivado por cinco (5) dias revelou grande quantidade de pseudohifas, além da presença de células mães birrefringentes e pleomórficas, com poucos brotamentos, que variaram de piriformes a alongados de base estreita. Com 10 dias de cultivo não se observou alterações morfológicas relevantes. A análise microscópica das células cultivadas durante 20 dias demonstrou aumento do número de brotamentos. Mereceu destaque, para todos os tempos de cultivo avaliados, a tendência deste isolado na formação de agrupamento celular, portanto, poucas células isoladas foram observadas. As dimensões das células alcançaram 14,0 µm **(Figura 4)**.

Cultura em ágar Sabouraud-dextrose

Observou-se macroscopicamente que as colônias apresentaram, a exemplo ao observado quando cultivadas em ágar Fava-Netto modificado, aspecto cerebriforme e pigmentação bege, porém, com 20 dias de crescimento as colônias, antes dispostas individualmente, coalesceram em um bloco único apresentando formação exuberante. As colônias, apesar de visualmente, aparentarem textura mais cremosa e úmida em ágar Sauboraud-dextrose, eram secas e aderidas ao meio, destacando-se aos blocos **(Figura 5 C)**.

Microscopicamente, observou-se que as leveduras do isolado 8334 cultivadas com cinco (5), 10 e 20 dias de cultivo, apresentaram grande

quantidade de pseudohifas, bem como de células mães com paredes birrefringentes e irregulares, na maioria das vezes apresentando aspecto sub globoso e catenulado, com brotamentos laterais variando de piriformes a filiformes de base estreita. Observou-se tendência de agrupamento celular deste isolado. As dimensões das células alcançaram 14,23 μm (**Figura 4**).

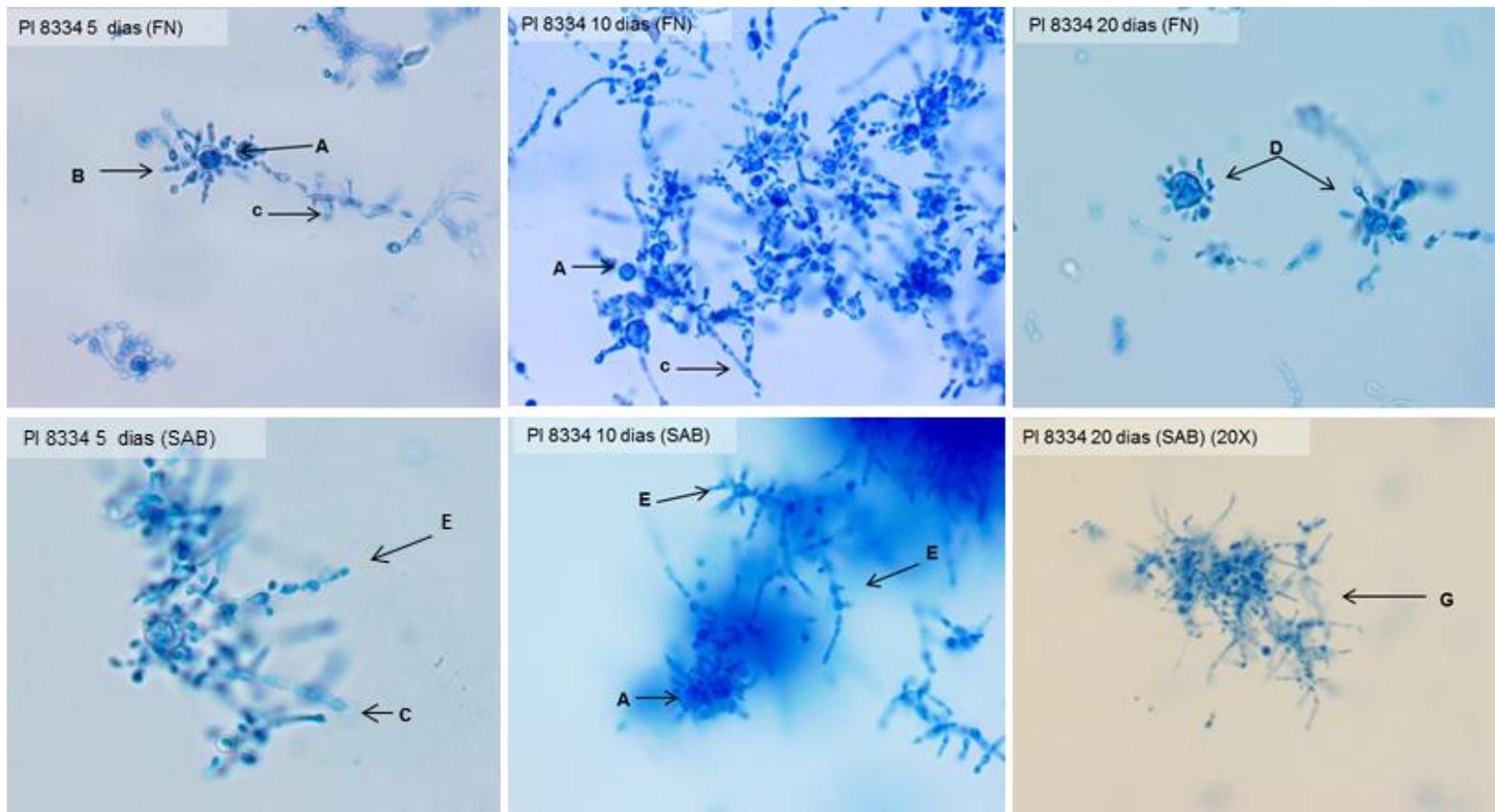


Figura 4. Análise micromorfológica do isolado 8334 de *P. lutzii* cultivado em ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose durante cinco (5), 10 e 20 dias. A) célula mãe globosa, B) brotamento alongado, C) pseudohifa, D) múltiplos brotamentos, E) células catenuladas, G) agrupamento celular. Aumento de 400 vezes.

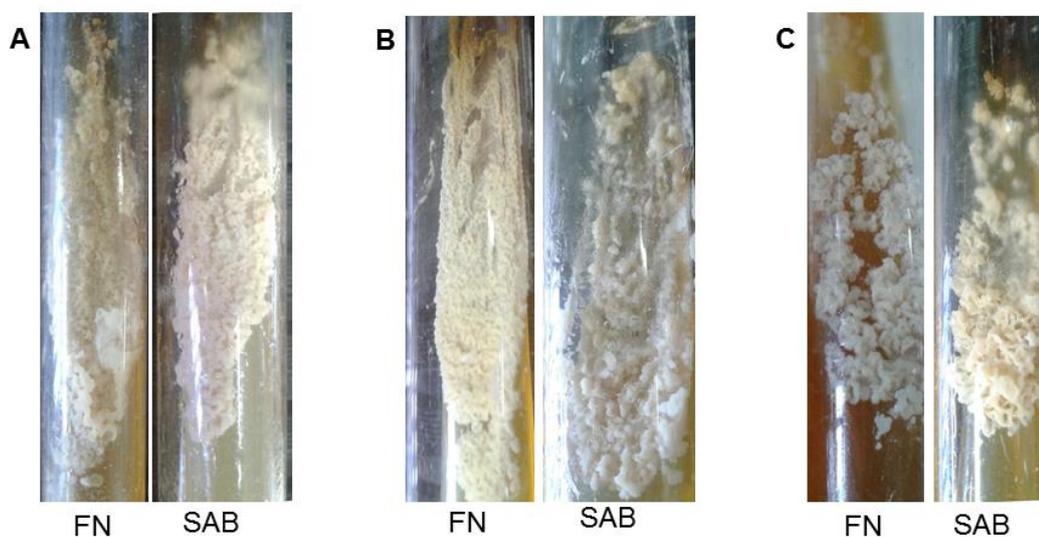


Figura 5. Macromorfologia dos isolados 01(A), 66(B) e 8334(C) de *P. lutzii* cultivados durante 20 dias. FN) ágar Fava-Netto modificado, SAB) ágar Sabouraud-dextrose.

O resumo de todas as características observadas nos isolados 01, 66 e 8334 de *P. lutzii* cultivados em ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose a 37°C, bem como o resultado da quantificação de células utilizando a escala 1.0 de McFarland podem ser consultadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Principais características macro e microformofógicas observadas nos isolados 01, 66, e 8334 de *P. lutzii* cultivados a 37°C, por 5, 10 e 20 dias em ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose

Tempo de Crescimento	Quantificação : Escala 1,0 McFarland FN / SAB	Diâmetro das células FN / SAB	Característica micromorfológica FN	Característica micromorfológica SAB	Característica macromorfológica FN	Característica macromorfológica SAB
01						
05 dias	$8,8 \times 10^5 / 8,7 \times 10^5$	19,38µm / 20,53 µm	<ul style="list-style-type: none"> • Cél. mães globosas e subglobosas. • Brotamentos de base estreita. • Presença de pseudohifa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cél.pleomórficas. • Brotamentos de base larga e estreita. • Raras pseudohifas. • Presença de cel.catenuladas 	<ul style="list-style-type: none"> • Col. Cerebriformes. • Textura cremosa. • Distribuição homogênea. • Pigmentação inicialmente clara com escurecimento gradativo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Col. Cerebriformes. • Textura cremosa. • Distribuição homogênea. • Pigmentação inicialmente clara com escurecimento gradativo. • Velocidade de crescimento inferior.
10 dias	$8,7 \times 10^5 / 12,7 \times 10^5$					
20 dias	$10,9 \times 10^5 / 11,9 \times 10^5$					
66						
05 dias	$7,2 \times 10^5 / 5,7 \times 10^5$	27,71 µm / 19,47	<ul style="list-style-type: none"> • Cél. Pleomórficas. • Brotamentos de base estreita. • Presença de tubo germinativo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cél, mães globosas. • Riqueza de brotamentos de base estreita. 	<ul style="list-style-type: none"> • Col. Cerebriformes. • Textura Cremosa. • Colônias distribuem-se por todo o meio com alguns acúmulos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Col. cerebriformes. • Textura cremosa. • Pigmento em tom bege mais escuro do que em Fava-Netto modificado. • Velocidade de crescimento inferior.
10 dias	$5,3 \times 10^5 / 6,5 \times 10^5$					
20 dias	$3,3 \times 10^5 / 3,9 \times 10^5$					
8334						
05 dias	$5,2 \times 10^5 / 3,5 \times 10^5$	14,0 µm / 14,23 µm	<ul style="list-style-type: none"> • Grande quantidade de pseudohifas. • Cél. Mães pleomórficas com poucos brotamentos. • Grande quantidade de agrupamentos celulares. 	<ul style="list-style-type: none"> • Grande quantidade de pseudohifas. • Cél. Mães com parede irregular. • Presença de cél. catenuladas. • Grande quantidade de agrupamentos celulares 	<ul style="list-style-type: none"> • Col. Cerebriformes. • Textura seca. • Colônias bem aderidas ao meio. • Col. distribuem-se em grupos compactos de forma heterogênea. 	<ul style="list-style-type: none"> • Col. Cerebriformes. • Textura seca. • Col. bem aderidas ao meio. • Col. inicialmente distribuem-se em grupos compactos, porém com 20 dias de cultivo elas coalescem em um bloco único.
10 dias	$12,5 \times 10^5 / 5,6 \times 10^5$					
20 dias	$8,4 \times 10^5 / 10,5 \times 10^5$					

FN: Fava-Netto Modificado SAB: Sabouraud-dextrose Cél.: células Col.: colônias.

5.1.2. Aspectos macromorfológicos e micromorfológicos de *Paracoccidioides brasiliensis*.

A avaliação macroscópica do isolado 113 de *P. brasiliensis* cultivado durante sete (7) dias em ágar Fava-Netto modificado revelou que as colônias eram cerebriformes, apresentando aspecto cremoso e úmido, pigmentação bege, distribuindo-se de forma homogênea pelo meio sendo pouco aderidas ao mesmo. Por outro lado, a avaliação da cepa B-339 cultivada nas mesmas condições, revelou a presença de colônias secas e aderidas ao meio. Da mesma forma ao observado para o isolado 113, as colônias da cepa B-339 eram cerebriformes e de pigmentação bege.

A análise micromorfológica do isolado 113 revelou a presença de células leveduriformes pequenas, pleomórficas e birrefringentes. As células mães globosas possuíam brotamentos que variaram de piriformes a globosos, por outro lado, as células mães com aspecto disforme apresentavam brotamentos alongados. Notou-se ainda, grande quantidade de pseudohifas bem como a presença de tubos germinativos. Quanto à dimensão das leveduras, observou-se que as mesmas apresentaram variação no diâmetro, alcançando até 16,16 μm (**Figura 6**).

Microscopicamente, observou-se que as leveduras da cepa B-339 apresentaram células mães globosas e soltas e os brotamentos variaram de piriformes a globosos. Além de tubos germinativos, observou-se a presença de grande quantidade de pseudohifas que conferiram a este isolado uma tendência a agrupar-se. As células apresentaram diâmetro de até 15,07 μm (**Figura 6**). O resumo de todas as características observadas nos isolados de *P. brasiliensis* pode ser consultado na **Tabela 2**

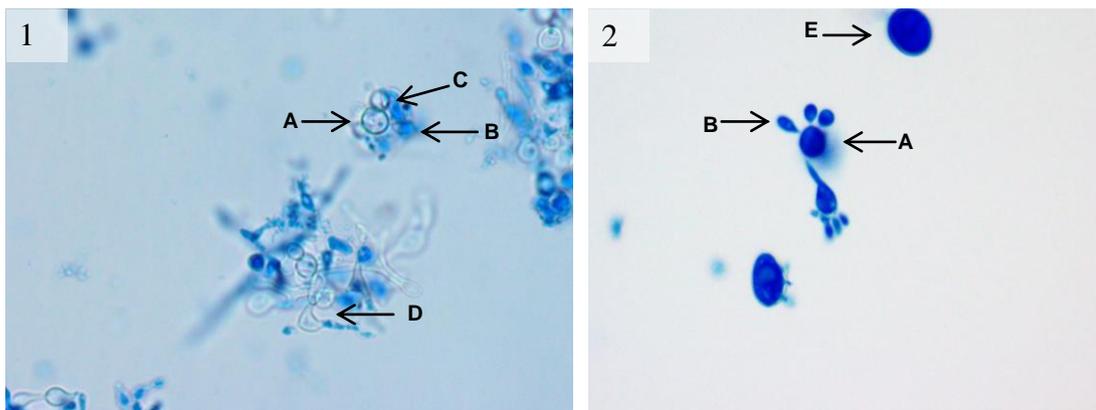


Figura 6. Análise micromorfológica das amostras de *P. brasiliensis* cultivadas em ágar Fava-Netto modificado durante sete (7) dias. Onde: 1) isolado 113, 2) cepa B339, A) célula mãe globosa, B) brotamento piriforme, C) brotamento de base larga, D) célula pleomórfica, E) célula solta. Aumento de 400 vezes.

Tabela 2. Principais das características macro e micromorfológicas observadas nos isolados 113 e B-339 de *P. brasiliensis* cultivados a 37°C. por 7 dias em ágar Fava-Netto modificado.

Isolado de <i>P. brasiliensis</i>	Característica micromorfológica FN	Característica macromorfológica FN	Diâmetro máximo observado
113	<ul style="list-style-type: none"> • Cél. Pleomórficas birrefringentes • Grande quantidade de pseudohifas • Presença de tubos germinativos 	<ul style="list-style-type: none"> • Col. Cerebriformes. • Textura cremosa. • Aspecto úmido • Distribuição homogênea. • Pigmentação bege 	16,16 μm
B-339	<ul style="list-style-type: none"> • Grande quantidade de pseudohifas • Presença de tubos germinativos • Tendência a agrupar-se 	<ul style="list-style-type: none"> • Col. Cerebriformes. • Textura seca e aderida ao meio de cultura • Pigmentação bege 	15,07 μm

FN: Fava-Netto modificado Col: Colônias Cél: Células

5.2. Screening dos Antígenos de *Paracoccidioides lutzii*

Considerando-se os diferentes pontos avaliados para obtenção de antígenos de *P. lutzii* a partir dos isolados 01, 66 e 8334, ou seja, meios de cultura distintos (ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose), protocolos de obtenção [Freitas et al (2005), Assis et al. (1989) e sua versão modificada)], tempo de cultura das células fúngicas (5, 10 e 20 dias) e concentração dos antígenos (*in natura*, 10 e 20 vezes concentrados), o desenvolvimento deste projeto gerou a produção de 90 preparações antigênicas.

Para a seleção das preparações antigênicas com potencial aplicabilidade no imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose causada por *P. lutzii*, os mesmos tiveram seu conteúdo proteico avaliado pela metodologia proposta por Bradford (1976), foram avaliados pelo ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose (ID) e o perfil eletroforético analisado por SDS-PAGE.

A fim de facilitar a leitura do presente trabalho, visto a grande quantidade de antígenos obtidos, propusemos uma nomenclatura simplificada para a identificação dos mesmos. A identificação de cada preparação antigênica foi composta primeiramente pela metodologia de obtenção, sendo os antígenos obtidos segundo Freitas (2005) denominados de (Th) e os antígenos obtidos segundo Assis et al. (1989) de CSSEPC convencional (CSSEPC-C) e sua versão modificada (CSSEPC-M) seguido do isolado utilizado, do tempo de cultivo e a respectiva concentração, quando aplicável, e por último do meio de cultura abreviado.

A título de ilustração, tomou-se, como exemplo todas as preparações antigênicas originadas a partir do isolado 01 com cinco (5) dias de cultivo.

Th 01 5d *in natura* (FN)

Th 01 5d 10x [] (FN)

Th 01 5d 20x [] (FN)
CSSEPC-C 01 5d (FN)
CSSEPC-M 01 5d (FN)
Th 01 5d *in natura* (SAB)
Th 01 5d 10x [] (SAB)
Th 01 5d 20x [] (SAB)
CSSEPC-C 01 5d (SAB)
CSSEPC-M 01 5d (SAB)

5.2.1. Dosagem de Proteínas

A dosagem proteica foi realizada, empregando-se o NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, DE, USA), o resultado final foi expresso como a média aritmética do valor obtido a partir de três medidas.

Observou-se que nenhum dos antígenos *in natura*, ou seja, não concentrados, obtidos em ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose, segundo protocolo descrito por Freitas (2005) apresentou valores com padrão de leitura.

Verificou-se que os antígenos obtidos segundo protocolo descrito por Freitas (2005), cultivados em ágar Fava-Netto modificado e concentrados 10 vezes, por liofilização, demonstraram variabilidade na concentração proteica entre 58,07 mg/mL a 159,09 mg/mL, para as preparações antigênicas obtidas com cinco (5) e 20 dias a partir dos isolados 66 e 8334, respectivamente. Preparações antigênicas obtidas destes mesmos isolados e cultivadas nas mesmas condições, porém, concentrados 20 vezes, apresentaram valores protéicos entre 133,16 mg/mL a 274,85 mg/mL. Verificou-se que os antígenos produzidos a partir dos isolados 01 e 66 cultivados em ágar Sabouraud-Dextrose, durante cinco (05) e 20 dias, e concentrados 10 vezes apresentaram concentração proteica entre 25,2 mg/mL a 39,1 mg/mL. Já as preparações antigênicas, obtidas nas mesmas

condições, porém concentradas 20 vezes demonstraram variação do conteúdo proteico entre 44,97 mg/mL a 132,94 mg/mL.

Os antígenos do tipo CSSEPC obtidos segundo Assis et al. (1989) em ágar Fava-Netto modificado apresentaram variação proteica entre 8,82 mg/mL a 19,36 mg/mL para os antígenos de cinco (5) e 10 dias obtidos a partir dos isolados 01 e 8334, respectivamente. Por outro lado, os antígenos do tipo CSSEPC modificado, nos quais, para a remoção das frações proteicas fracamente ligadas a superfície da parede celular, a solução salina 0,85% foi substituída pela solução thimerosal-borato (1:5.000), a variação proteica foi de 8,82 mg/mL a 24,94 mg/mL para os antígenos de cinco (5) e 20 dias obtidos a partir dos isolados 01 e 8334, respectivamente.

Para as preparações antigênicas derivadas do cultivo de leveduras em ágar Sabouraud-dextrose, os antígenos CSSEPC obtidos segundo protocolo proposto por Assis et al. (1989) a partir do isolado 8334, apresentaram valores protéicos (mínimo e máximo) entre 3,48 mg/mL a 9,12 mg/mL. Já os antígenos CSSEPC modificado apresentaram intervalo de concentração protéica entre 2,46 mg/mL a 11,50 mg/mL para antígenos de cinco (5) e 20 dias dos isolados 66 e 8334, respectivamente.

As tabelas contendo as dosagens individuais de todas as preparações produzidas podem ser consultadas no **Anexo G**.

5.2.2. Imunodifusão dupla em gel de agarose

O padrão de reatividade dos antígenos obtidos a partir dos isolados 01, 66 e 8334 de *P. lutzii* cultivados a 37°C durante cinco (5), 10 e 20 dias em ágar Fava-Netto modificado e em ágar Sabouraud-dextrose segundo a metodologia proposta por Freitas (2005), *in natura*, 10 e 20 vezes concentrados foram analisadas por imunodifusão dupla em gel de agarose (ID) frente a anticorpos policlonais produzidos em coelho anti-antígeno de *P.*

lutzii, anti-antígeno de *P. brasiliensis*, anti-antígeno de *anti-H. capsulatum*, anti-antígeno de *A. fumigatus*, bem como frente a soros de indivíduos saudáveis.

As preparações antigênicas do tipo CSSEPC convencional obtidos segundo protocolo proposto por Assis et al. (1989), bem como sua versão modificada a partir dos isolados 01, 66 e 8334 de *P. lutzii* cultivados a 36° C durante cinco (5), 10 e 20 dias em ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose, *in natura*, foram avaliadas seguindo os mesmos critérios descritos acima.

5.2.2.1. Anticorpo policlonal anti-antígeno de *Paracoccidioides lutzii*

Nenhum antígeno *in natura* obtido segundo metodologia descrita por Freitas (2005) em ágar Fava-Netto modificado e em ágar Sabouraud-dextrose apresentou reatividade frente ao anticorpo policlonal espécie específico, por outro lado, observou-se que os antígenos cultivados a 37°C durante 5, 10 e 20 dias em ágar Fava-Netto modificado e concentrados 10 e 20 vezes, por liofilização, foram reconhecidos pelo anticorpo policlonal.

Com exceção do antígeno Th66 10d 20x[] (SAB), que apresentou duas linhas de precipitação, os demais antígenos obtidos a partir dos isolados 66 e 8334 e cultivados em ágar Sabouraud-dextrose apresentaram reação de fraca intensidade, já o antígeno obtido a partir do isolado 01 de *P. lutzii* não apresentou reatividade.

A avaliação dos antígenos obtidos do isolado 01, cultivados em ágar Fava-Netto modificado, segundo metodologia proposta por Assis et al. (1989) bem como sua versão modificada, demonstrou reatividade frente ao soro policlonal espécie específico com destaque para as preparações antigênicas produzidas com 20 dias de cultivo que apresentaram duas linhas de precipitação de forte intensidade. Em relação as preparações antigênicas obtidas a partir dos isolados 66 e 8334, cultivadas nas mesmas condições,

durante cinco (5), 10 e 20 dias verificou-se que todos apresentaram reatividade frente ao soro controle positivo.

Verificou-se que as preparações antigênicas obtidas segundo metodologia proposta por Assis et al. (1989) bem como sua versão modificada a partir do isolado 8334 cultivadas durante cinco (5), 10 e 20 dias, em ágar Sabouraud-dextrose foram reconhecidas pelo anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. lutzii*. Observou-se ainda, que o anticorpo policlonal espécie específico apresentou reatividade de fraca intensidade frente às preparações antigênicas obtidas a partir do isolado 66 e ausência de reatividade frente aos antígenos obtidos do isolado 01.

5.2.2.2. Anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis*

Nenhum antígeno *in natura* obtido segundo metodologia descrita por Freitas (2005) em ágar Fava-Netto modificado e em ágar Sabouraud-dextrose apresentou reatividade frente ao anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis*.

Todos os antígenos cultivados a 37°C durante cinco (5), 10 e 20 dias em ágar Fava-Netto modificado e 10 e 20 vezes concentrados foram reagentes frente a anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis*, já os antígenos cultivados nas mesmas condições, porém em ágar Sabouraud-dextrose apresentaram ausência de reatividade.

Observou-se que os antígenos obtidos do isolado 01, cultivados em ágar Fava-Netto modificado durante 10 e 20 dias, segundo metodologia proposta por Assis et al. (1989) apresentaram reatividade frente ao soro policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis* enquanto que sua versão modificada apresentou reatividade apenas para a preparação antigênica obtida com 20 dias de cultivo. As preparações antigênicas produzidas nas mesmas condições empregando-se os isolados 66 e 8334 não apresentaram reatividade.

Observou-se ausência de reatividade de todos os antígenos (isolados 01, 66 e 8334) obtidos com cinco (5), 10 e 20 dias de cultivo produzidos segundo Assis et al. (1989) e sua versão modificada, frente ao anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis* quando os mesmos foram produzidos em ágar Sabouraud-dextrose.

5.2.2.3. Anticorpo policlonal anti-antígeno de *H. capsulatum* e anti-antígeno de *A. fumigatus*

Apenas os antígenos obtidos segundo Assis et al. (1989) e sua versão modificada cultivados por cinco (5), 10 e 20 dias em ágar Sabouraud-dextrose a partir do isolado 8334 apresentaram reação de fraca intensidade frente ao soro policlonal anti-antígeno de *H. capsulatum*. A avaliação dos demais antígenos produzidos nas diferentes condições revelou ausência de reatividade frente aos anticorpos policlonais anti-antígeno de *H. capsulatum* e anti-antígeno de *A. fumigatus*.

As **Tabelas 3, 4, 5 e 6** resumem o padrão de reatividade das preparações antigênicas avaliadas frente aos anticorpos policlonais anti-antígeno de *P. lutzii*, anti-antígeno de *P. brasiliensis*, anti-antígeno de *H. capsulatum* e anti-antígeno de *A. fumigatus*.

Tabela 3. Padrão de reatividade, por imunodifusão dupla, dos antígenos de *P. lutzii* obtidos segundo Freitas (2005), em ágar Fava-Netto modificado, 37°C, durante 5, 10 e 20 dias, *in natura*, 10 e 20 vezes concentrados.

Antígeno de <i>P. lutzii</i>	Ac poli anti-antígeno de <i>P. lutzii</i>	Ac poli anti-antígeno de <i>P. brasiliensis</i>	Ac poli anti-antígeno de <i>H. capsulatum</i>	Ac poli anti-antígeno <i>A. fumigatus</i>
01 <i>in natura</i> 5 dias	NR	NR	NR	NR
01 5 dias, 10x[]	R	R	NR	NR
01 5 dias, 20x[]	R	R	NR	NR
01 <i>in natura</i> 10 dias	NR	NR	NR	NR
01 10 dias, 10x[]	R	R	NR	NR
01 10 dias, 20x[]	R	R	NR	NR
01 <i>in natura</i> 20 dias	NR	NR	NR	NR
01 20 dias, 10x[]	R	R	NR	NR
01 20 dias, 20x[]	R	R	NR	NR
66 <i>in natura</i> 5 dias	NR	NR	NR	NR
66 5 dias, 10x[]	R	R	NR	NR
66 5 dias, 20x[]	R	R	NR	NR
66 <i>in natura</i> 10 dias	NR	NR	NR	NR
66 10 dias, 10x[]	R	R	NR	NR
66 10 dias, 20x[]	R	R	NR	NR
66 <i>in natura</i> 20 dias	NR	NR	NR	NR
66 20 dias, 10x[]	R	R	NR	NR
66 20 dias, 20x[]	R	R	NR	NR
8334 <i>in natura</i> 5 dias	NR	NR	NR	NR
8334 5 dias, 10x[]	R	R	NR	NR
8334 5 dias, 20x[]	R	R	NR	NR
8334 <i>in natura</i> 10dias	NR	NR	NR	NR
8334 10 dias, 10x[]	R	R	NR	NR
8334 10 dias, 20x[]	R	R	NR	NR
8334 <i>in natura</i> 20 dias	NR	NR	NR	NR
8334 20 dias, 10x[]	R	R	NR	NR
8334 20 dias, 20x[]	R	R	NR	NR

Ac poli : Anticorpos policlonais

10x[] : 10 vezes concentrado

20x[] : 20 vezes concentrado

R: Reagente

NR: Não Reagente

R*: Fracamente Reagente

Tabela 4. Padrão de reatividade, por imunodifusão dupla, dos antígenos de *P. lutzii* obtidos segundo Freitas (2005), em ágar Sabouraud-dextrose, 37°C, durante 5, 10 e 20 dias, *in natura*, 10 e 20 vezes concentrados.

Antígeno de <i>P. lutzii</i>	Ac poli anti-antígeno de <i>P. lutzii</i>	Ac poli anti-antígeno de <i>P. brasiliensis</i>	Ac poli anti-antígeno de <i>H. capsulatum</i>	Ac poli anti-antígeno <i>A. fumigatus</i>
01 <i>in natura</i> 5 dias	NR	NR	NR	NR
01 5 dias, 10x[]	NR	NR	NR	NR
01 5 dias, 20x[]	NR	NR	NR	NR
01 <i>in natura</i> 10 dias	NR	NR	NR	NR
01 10 dias, 10x[]	NR	NR	NR	NR
01 10 dias, 20x[]	NR	NR	NR	NR
01 <i>in natura</i> 20 dias	NR	NR	NR	NR
01 20 dias, 10x[]	NR	NR	NR	NR
01 20 dias, 20x[]	NR	NR	NR	NR
66 <i>in natura</i> 5 dias	NR	NR	NR	NR
66 5 dias, 10x[]	R*	NR	NR	NR
66 5 dias, 20x[]	R*	NR	NR	NR
66 <i>in natura</i> 10 dias	NR	NR	NR	NR
66 10 dias, 10x[]	R*	NR	NR	NR
66 10 dias, 20x[]	R	NR	NR	NR
66 <i>in natura</i> 20 dias	NR	NR	NR	NR
66 20 dias, 10x[]	R*	NR	NR	NR
66 20 dias, 20x[]	R*	NR	NR	NR
8334 <i>in natura</i> 5 dias	NR	NR	NR	NR
8334 5 dias, 10x[]	R*	NR	NR	NR
8334 5 dias, 20x[]	R*	NR	NR	NR
8334 <i>in natura</i> 10 dias	NR	NR	NR	NR
8334 10 dias, 10x[]	R*	NR	NR	NR
8334 10 dias, 20x[]	R*	NR	NR	NR
8334 <i>in natura</i> 20 dias	NR	NR	NR	NR
8334 20 dias, 10x[]	R*	NR	NR	NR
8334 20 dias, 20x[]	R*	NR	NR	NR

Ac poli : Anticorpos policlonais

10x[]: 10 vezes concentrado

20x[]: 20 vezes concentrado

R: Reagente

NR: Não Reagente

R*: Fracamente Reagente

Tabela 5. Padrão de reatividade, por imunodifusão dupla, dos antígenos de *P. lutzii* obtidos segundo Assis et al. (1989) e sua versão modificada em ágar Fava-Netto modificado, 37°C, durante 5, 10 e 20 dias.

Antígeno de <i>P. lutzii</i>	Ac poli anti-antígeno de <i>P. lutzii</i>	Ac poli anti-antígeno de <i>P. brasiliensis</i>	Ac poli anti-antígeno de <i>H. capsulatum</i>	Ac poli anti-antígeno <i>A. fumigatus</i>
01, 5 dias C	R	NR	NR	NR
01, 10 dias C	R	R	NR	NR
01, 20 dias C	R	R	NR	NR
01, 5 dias M	R	NR	NR	NR
01, 10 dias M	R	NR	NR	NR
01, 20 dias M	R	R	NR	NR
66, 5 dias C	R	NR	NR	NR
66, 10 dias C	R	NR	NR	NR
66, 20 dias C	R	NR	NR	NR
66, 5 dias M	R	NR	NR	NR
66, 10 dias M	R	NR	NR	NR
66, 20 dias M	R	NR	NR	NR
8334, 5 dias C	R	NR	NR	NR
8334, 10 dias C	R	NR	NR	NR
8334, 20 dias C	R	NR	NR	NR
8334, 5 dias M	R	NR	NR	NR
8334, 10 dias M	R	NR	NR	NR
8334, 20 dias M	R	NR	NR	NR

Ac poli : Anticorpos policlonais

R: Reagente

NR: Não Reagente

R*: Fracamente Reagente

C :Convencional : Obtido pelo método de Assis et al. (1989)

M: Modificado

Tabela 6. Padrão de reatividade, por imunodifusão dupla, dos antígenos de *P. lutzii* obtidos segundo Assis et al. (1989) e sua versão modificada em ágar Sabouraud-dextrose, 37°C, durante 5, 10 e 20 dias

Antígeno de <i>P.lutzii</i>	Ac poli anti-antígeno de <i>P.lutzii</i>	Ac poli anti-antígeno De <i>P.brasiliensis</i>	Ac poli anti-antígeno de <i>H.capsulatum</i>	Ac poli anti-antígeno <i>A.fumigatus</i>
01, 5 dias C	NR	NR	NR	NR
01, 10 dias C	NR	NR	NR	NR
01, 20 dias C	NR	NR	NR	NR
01, 5 dias M	NR	NR	NR	NR
01, 10 dias M	NR	NR	NR	NR
01, 20 dias M	NR	NR	NR	NR
66, 5 dias C	R*	NR	NR	NR
66, 10 dias C	R*	NR	NR	NR
66, 20 dias C	R*	NR	NR	NR
66, 5 dias M	R*	NR	NR	NR
66, 10 dias M	R*	NR	NR	NR
66, 20 dias M	R*	NR	NR	NR
8334, 5 dias C	NR	NR	R*	NR
8334, 10 dias C	R	NR	R*	NR
8334, 20 dias C	R	NR	R*	NR
8334, 5 dias M	NR	NR	R*	NR
8334, 10 dias M	R	NR	R*	NR
8334, 20 dias M	R	NR	R*	NR

Ac poli : Anticorpos policlonais

R: Reagente

NR: Não Reagente

R*: Fracamente Reagente

C :Convencional: Obtido pelo método de Assis et al. (1989)

M: Modificado

Visto que os antígenos obtidos dos isolados 01 e 66 cultivados em ágar Sabouraud-dextrose segundo Assis et al. (1989) bem como sua versão modificada apresentaram ausência e fraca reatividade respectivamente, frente ao anticorpo espécie específico, os mesmos foram retirados das avaliações posteriores. Da mesma forma, não foram analisados outros parâmetros dos antígenos produzidos a partir dos isolados 01 e 8334 obtidos segundo metodologia descrita por Freitas (2005) em ágar Sabouraud-dextrose, visto que o primeiro apresentou reatividade de fraca intensidade e o segundo ausência de reatividade.

5.2.2.4. Soros de indivíduos saudáveis

Foram avaliados frente a nove amostras de soro de indivíduos saudáveis sem histórico de contato prévio com *Paracoccidioides* spp as seguintes preparações antigênicas: antígenos obtidos a partir das amostras 01, 66 e 8334 cultivadas em ágar Fava-Netto modificado, antígeno obtido a partir do isolado 66 cultivado em ágar Sabouraud-dextrose segundo metodologia descrita por Freitas (2005) e antígenos CSSEPC obtidos segundo metodologia proposta por Assis et al. (1989) e sua versão modificada obtidos a partir dos isolados 01 e 8334 e cultivados em ágar Fava-Netto modificado.

A leitura das lâminas de imunodifusão dupla revelou que todas as amostras de soro avaliadas apresentaram ausência de reatividade frente aos antígenos analisados, bem como frente ao antígeno Th 339 7d 10x[] (FN) de *P. brasiliensis*, obtido segundo Freitas (2005).

5.3. Perfil eletroforético dos antígenos de *P. lutzii*

5.3.1. Antígenos obtidos em ágar Fava-Netto modificado

A separação eletroforética sob condição denaturante, empregando-se 10% de acrilamida, revelou que os antígenos produzidos segundo metodologia descrita por Freitas (2005) apresentaram frações proteicas com

massa molecular aparente migrando entre 14 a 106 kDa. As imagens dos géis podem ser consultadas no **Anexo H**.

A coloração por nitrato de prata do antígeno obtido a partir do isolado 01 possibilitou a identificação de 13 frações para os antígenos de cinco (5) e 10 dias e de 16 frações para o antígeno de 20 dias, com massa molecular aparente entre 16 a 72 kDa. Verificou-se que 12 frações com intervalo de 16 a 72 kDa eram comuns entre as três (3) preparações antigênicas.

A avaliação do perfil eletroforético das preparações antigênicas obtidas a partir do isolado 66 com cinco (5) dias de cultivo revelou a presença de 18 frações protéicas com massa molecular aparente migrando entre 14 a 106 kDa; para o antígeno obtido com 10 dias de cultura observou-se 17 frações protéicas entre 14 a 80 kDa e para o antígeno de 20 dias verificou-se uma diminuição significativa do número de frações protéicas sendo possível identificar apenas oito (8) frações com massa molecular aparente entre 14 a 55 kDa.

A análise do perfil eletroforético dos antígenos obtidos a partir do isolado 8334 possibilitou a identificação de 16 frações, com massa molecular aparente entre 19 a 56 kDa para o antígeno de cinco (5) dias, 16 frações, com massa molecular entre 15 a 74 kDa para o antígeno de dez (10) dias e 16 frações entre 15 a 80 kDa para o antígeno de 20 dias. Observou-se que 14 frações com intervalo de 15 a 56 kDa eram comuns entre as três (3) preparações antigênicas.

Por outro lado, verificou-se que independentemente do isolado utilizado e do tempo de cultivo, as únicas diferenças entre os antígenos 10 e 20 vezes concentrados obtidos em ágar Fava-Netto modificado estavam relacionadas à intensidade e espessura das frações protéicas visualizadas.

A **Tabela 7** resume as frações proteicas compartilhadas entre os antígenos avaliados. Todas as frações identificadas podem ser consultadas no **Anexo L item A**

Tabela 7. Massas moleculares estimadas, em kDa, das frações proteicas compartilhadas entre os antígenos obtidos segundo Freitas (2005) em ágar Fava-Netto modificado

Th 01	Th 66	Th 8334
~60	~61	~64
~53	~55	~56
~48	~49	~51
~39	~40	~40
~27	~27	~26
~24	~24	~22
~22	~21	~21
~20	-	~19
~16	~16	~17

A avaliação eletroforérica dos antígenos obtidos segundo Assis et al. (1989), bem como sua versão modificada possibilitou a visualização de frações proteicas com massa molecular aparente entre 12 a 116 kDa. As imagens dos géis podem ser consultadas no **Anexo I**.

Em relação aos antígenos tipo CSSEPC convencional, a avaliação do perfil proteico/glicoproteico após a impregnação do gel de poliacrilamida com nitrato de prata, permitiu a identificação de 28 frações para o antígeno obtido a partir do isolado 01, cultivado durante cinco (5) dias. Destes, 23 tiveram sua massa molecular estimada migrando entre 13 a 116 kDa. Verificou-se que o antígeno CSSEPC-C 01 10d (FN) apresentou 13 frações com massa molecular entre 13 a 62 kDa. A preparação antigênica obtida com 20 dias de cultura revelou oito (8) frações entre 17 a 62 kDa, que também foram identificadas nas preparações antigênicas obtidas com 5 e 10 dias

A análise do perfil antigênico das preparações tipo CSSEPC modificado revelou a presença de várias frações. Onze frações com massa

molecular estimada entre 17 a 62 kDa foram identificadas para o antígeno CSSEPC-M 01 5d (FN). Verificou-se para o antígeno CSSEPC-M 01 10d (FN) a presença de 14 frações com massas moleculares entre 15 a 62 kDa. A preparação antigênica obtida com 20 dias de cultura apresentou inúmeras frações próximas de modo que a delimitação de cada uma foi prejudicada em alguns pontos do gel. Porém, foram visualizadas e claramente determinadas 19 frações com massa molecular aparente entre 13 a 62 kDa. Observou-se ainda, que nove (9) frações eram comuns entre as três (3) preparações antigênicas avaliadas.

A comparação entre as massas moleculares estimadas das preparações antigênicas do isolado 01 obtidas segundo metodologia proposta por Assis et al. (1989) e sua versão modificada permitiu a identificação de oito (8) frações comuns entre os antígenos.

A avaliação eletroforética dos antígenos obtidos a partir do isolado 66 empregando-se a metodologia de Assis et al. (1989) cultivados em durante cinco (5), 10 e 20 dias possibilitou a identificação de 26, 27 e 21 frações respectivamente, que migraram entre 12 a 112 kDa. Por outro lado, os antígenos CSSEPC-M de cinco (5) e 10 dias revelaram um padrão proteico/glicoproteico distinto, com a visualização de apenas seis (6) frações com massa molecular entre 17 a 101 kDa. O antígeno obtido nas mesmas condições, porém com 20 dias de crescimento apresentou cinco (5) frações migrando entre 24 a 101 kDa cuja presença foi encontrada nos três (3) antígenos de CSSEPC-M.

Observou-se que 21 frações protéicas foram comuns entre os antígenos obtidos segundo Assis et al. (1989) e cultivados durante cinco (5), 10 e 20 dias. Em contrapartida, verificou-se que apenas três (3) frações puderam ser identificadas em todas as preparações antigênicas obtidas segundo Assis et al. (1989) e sua versão modificada do isolado 66.

A análise do perfil eletroforético do antígeno obtido com cinco (5) dias e 10 dias de cultura do isolado 8334 através da metodologia proposta por Assis et al (1989) revelou 13 frações protéicas com intervalo de 14 a 63 kDa. Já o antígeno obtido nas mesmas condições, porém com 20 dias de crescimento demonstrou amplo perfil eletroforético, sendo nitidamente identificados pelo menos 15 frações protéicas com intervalo entre 14 a 116 kDa. O CSSEPC-M 8334 10d (FN) apresentou um perfil glicoproteico variado, sendo que a abundância e proximidade de frações dificultou a estimativa da massa molecular. Porém, claramente foram identificadas 10 frações com intervalo entre 16 e 60 kDa. Já na preparação antigênica obtida com 20 dias somente três (3) frações foram observadas em um intervalo entre 16 a 44 kDa.

A **Tabela 8** resume as frações proteicas compartilhadas entre os antígenos avaliados.

Tabela 8. Massas moleculares estimadas, em kDa, das frações proteicas compartilhadas entre os antígenos obtidos segundo Assis et al (1989) e sua versão modificada produzidos em ágar Fava-Netto modificado

CSSEPC-C 01	CSSEPC-M 01	CSSEPC-C 66	CSSEPC-M 66	CSSEPC-C 8334	CSSEPC-M 8334
~62	~62	~62	-	~63	~60
~55	~54	~56	-	~58	~54
~52	~52	-	-	-	-
~49	~50	~49	-	-	-
~42	~42	~41	-	-	-
~37	~37	~37	~39	~39	-
~34	~34	~35	~35	~34	~35
~30	~31	~30	-	~30	~30
~29	~28	~28	-	-	~27
~23	~24	~23	~24	~23	-
~21	~22	~22	-	~21	~22
~17	~17	~18	~17	-	~18
~16	~16	~16	-	~16	~16
~13	~13	-	-	-	-

O perfil eletroforético completo dos antígenos obtidos em ágar Fava-Netto modificado pode ser consultado no **Anexo M item A**.

5.3.2. Antígenos obtidos em ágar Sabouraud-dextrose

A análise do perfil eletroforético, empregando-se 10% de acrilamida revelou que os antígenos produzidos segundo metodologia de Freitas (2005) em ágar Sabouraud-dextrose apresentaram frações protéicas como massa molecular aparente entre 18 a 64 kDa. As imagens dos géis podem ser consultadas no **Anexo J**.

Utilizando a coloração de nitrato de prata foi possível observar para a preparação antigênica obtida a partir do isolado 01, duas (2) frações para o antígeno de cinco (5) dias, nove (9) frações o de 10 dias e cinco (5) frações o de 20 dias, sendo que três (3) frações com intervalo de 41 a 19 kDa eram comuns entre as três (3) preparações.

A análise o perfil eletroforético dos antígenos obtidos a partir do isolado 66 revelaram 2 (duas), 1 (uma) e 3 (três) frações para os antígenos de cinco (5), 10 e 20 dias respectivamente. As frações observadas nos antígenos de cinco (5) e 20 dias apresentaram massa molecular aparente entre 37 a 53 kDa e apenas a fração de 41 kDa foi comum a todas as preparações antigênicas desse isolado.

A avaliação dos antígenos obtidos do isolado 8334 com 5 (cinco) e 10 dias revelaram cinco (5) frações glicoprotéicas com massa molecular aparente entre 18,5 a 64 kDa. Verificou-se somente quatro (4) frações glicoprotéicas na preparação antigênica de 20 dias de obtenção dentro do mesmo intervalo.

A **Tabela 9** resume as frações proteicas compartilhadas entre os antígenos obtidos segundo Freitas(2005) obtidos em ágar Sabouraud-dextrose. O perfil eletroforético completo dessas preparações podem ser consultadas no **Anexo L item B**

Tabela 09. Massas moleculares estimadas das frações protéicas em comum entre os antígenos obtidos segundo Freitas (2005) obtidos em ágar Sabouraud-dextrose

Th 01	Th66	Th 8334
-	53	53
41	41	-
37	37	-
35	-	36
23	-	23
19	-	18

A avaliação eletroforetica dos antígenos obtidos segundo Assis et al. (1989), bem como sua versão modificada em ágar Sabouraud-dextrose permitiu a visualização de frações proteicas/glicoproteicas com massa molecular aparente entre 8 a 144 kDa. As imagens dos géis podem ser consultadas no **Anexo K**.

A impregnação com nitrato de prata revelou um variado perfil eletroforético dos antígenos do tipo CSSEPC convencional, desta forma, na análise das preparações antigênicas do isolado 01, nitidamente foram observadas três (3) frações para o antígeno de cinco (5) dias, 30 frações para o de 10 dias e 24 frações para o de 20 dias. Por outro lado, a versão modificada, nos mesmos períodos de obtenção, apresentou três (3), uma (1) e cinco (5) frações respectivamente. O intervalo proteico das frações dos antígenos de cinco (5) dias da versão modificada e convencional foi semelhante (19 a 40 kDa). Porém as frações obtidas com 10 e 20 dias da versão convencional apresentaram frações entre 8 a 139 kDa enquanto o intervalo das frações da versão modificada foi menor, apenas entre 19 a 40 kDa.

A avaliação eletroforética dos antígenos obtidos a partir do isolado 66 empregando-se a metodologia proposta por Assis et al. (1989) cultivados durante cinco (5), 10 e 20 dias possibilitou a identificação de 21,18 e 23 frações respectivamente, migrando entre 11 a 121 kDa. Em contrapartida, os

antígenos de cinco (5) e 10 dias obtidos segundo a versão modificada apresentaram sete (7) e oito (8) frações respectivamente com migração aparente entre 13 a 45 kDa. Já para o antígeno CSSEPC-M 66 20 d (SAB) verificou-se 12 frações entre 13 a 55 kDa.

A análise do perfil eletroforético do antígeno obtido com cinco (5), 10 e 20 dias de cultura do isolado 8334 através da metodologia proposta por Assis et al. (1989) revelou 28, 28 e 27 frações respectivamente, com frações proteicas/glicoproteicas migrando entre 8 a 144 kDa. Já as preparações antigênicas obtidas segundo a versão modificada, apresentaram uma redução no perfil proteico, sendo identificadas 12 frações no antígeno de cinco (5) dias, migrando entre 8 a 50 kDa e 14 e 10 frações para as antígenos de 10 e 20 dias, respectivamente, apresentando intervalo entre 8 a 42kDa.

A **Tabela 10** resume as frações proteicas compartilhadas entre os antígenos obtidos segundo Assis et al. (1989) e sua versão modificada em ágar Sabouraud-dextrose. Todas as frações identificadas nestas preparações antigênicas podem ser consultadas no **Anexo M item B**

Tabela 10. Massas moleculares estimadas, em kDa, das frações proteicas compartilhadas entre os antígenos obtidos segundo Assis et al (1989) e sua versão modificada produzidos em ágar Sabouraud-dextrose

CSSEPC- C 01	CSSEPC- M 01	CSSEPC- C 66	CSSEPC- M 66	CSSEPC- C 8334	CSSEPC- M 8334
~81	-	-	-	~81	-
~80	-	~80	-		-
~58	-	~59	-	~58	-
-	-	~54	~55	~56	-
~50	-	~51	-	~50	~50
~48	-	~47	~47	~47	-
~40	~40	~42	~41	~39	~39
~37	-	~36	~35	~36	-
~32	~34	~33	-	~33	-
~30	~30	-	~30	~30	~31
~27	~28	~28	-	~28	~28
~25	~26	~26	-	~25	-
~23	~23	~23	~22	~23	~23
~21	-	~21	-	-	~21
~20	-	~20	~20	~20	-
~19	~19	~19	-	~21	~19
~16	-	~16	~15	-	~15
~14	~14	~14	~14	~14	~14
~13	~13	~13	~13	~13	~13
~12	-	~12	-	-	~12
~10	-	~11	-	~11	~10
~9	-	-	-	~9	~9

5.4. Antígenos selecionados

A partir da interpretação do conjunto de resultados obtidos pela dosagem proteica, avaliação do perfil eletroforético e perfil de reatividade dos antígenos, por ID, frente a anticorpos policlonais anti-antígeno de *P. lutzii*, anti-antígeno de *P. brasiliensis*, anti-antígeno de *H. capsulatum*, anti-antígeno de *A. fumigatus* e soros de indivíduos saudáveis as seguintes preparações antigênicas foram selecionadas:

Tabela 11. Antígenos selecionados:

Antígenos selecionados	Dosagem Proteica	Reatividade, por ID, frente a Ac poli anti- antígeno de <i>P. lutzii</i>	Reatividade, por ID, frente a Ac poli anti- antígeno de <i>P. brasiliensis</i>	Reatividade, por ID, frente a Ac poli anti- antígeno de <i>H. capsulatum</i> e <i>A. fumigattus</i>	Reatividade, por ID, frente a soros saudáveis	Intervalo de Peso Molecular/ Número de frações por SDS-PAGE
Th 01 20d 10x [] (FN)	71,09 mg/mL	R	R	NR	NR	16 a 72 kDa (16 frações)
Th 66 5d 20x [] (FN)	65,34 mg/mL	R	R	NR	NR	14 a 106 kDa (18 frações)
Th 66 10d 20x [] (SAB)	65,34 mg/mL	R	NR	NR	NR	41 kDa (1 fração)
Th 8334 10d 20x [] (FN)	230,19 mg/mL	R	R	NR	NR	93 a 18 kDa (14 frações)
CSSEPC-M 01 20d (FN)	17,70 mg/mL	R	R	NR	NR	14 a 62 kDa (19 frações)
CSSEPC-M 8334 10d (FN)	13,77 mg/mL	R	NR	NR	NR	16 a 60 kDa (10 frações)

FN: ágar Fava-Netto modificado

SAB: ágar Sabouraud-dextrose

CFA-M: CFA modificado

10x []: 10 vezes concentrado

20x []: 20 vezes concentrado

R: reagente

NR: Não reagente

-: Não realizado

Desta forma os antígenos selecionados foram reavaliados, por ID, frente a: **a)** amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e com reatividade frente ao filtrado de cultura da cepa B-339 de *P. brasiliensis* residentes em região de alta endemicidade para *P. brasiliensis*, **b)** amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose, porém com ausência de reatividade frente ao filtrado de cultura da cepa B-339 de *P. brasiliensis*, **c)** soro de pacientes com histórico de reatividade para antígeno de *P. brasiliensis*, porém, com a última amostra não reagente, ou seja, em processo de cura clínica e/ou sorológica, **d)** amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose comprovada por meio de exame micológico direto e/ou histopatológico, porém sem avaliação sorológica para *Paracoccidioides* spp e residentes em região potencialmente endêmica (Rondônia) para *P. lutzii*, **e)** amostras de soro de pacientes com PCM comprovada por meio de avaliação histopatológica, porém, com ausência de reatividade para *P. brasiliensis* residentes em região potencialmente endêmica (Mato Grosso do Sul) para *P. lutzii*, **f)** amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose residentes em regiões potencialmente endêmicas (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) para *P. lutzii* e **g)** amostras de soro de pacientes com histórico sorológico (acompanhamento) para histoplasmose e aspergilose.

5.4.1. Soros de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e com reatividade frente ao filtrado de cultura da cepa B-339 de *P. brasiliensis* residentes em região de alta endemicidade para *P. brasiliensis*.

Os antígenos selecionados foram avaliados frente a 24 amostras de soro de pacientes com PCM comprovada e com histórico sorológico de reatividade, por ID, empregando-se como antígeno, filtrado de cultura da cepa B-339 de *P. brasiliensis*. A descrição das amostras utilizadas para a realização deste ensaio pode ser consultada no **Anexo L**.

A avaliação das preparações antigênicas obtidas em ágar Fava-Netto modificado cultivadas durante cinco (5), 10 e 20 dias, a 37°C, segundo metodologia proposta por Freitas (2005) e pela versão modificada do protocolo proposto por Assis et al. (1989), revelou que do total de amostras avaliadas, 21(87,5%) apresentaram reatividade frente ao antígeno Th 01 20d 10x [] (FN), 16 (66,66%) ao antígeno Th 66 5d 20x [] (FN), 14 (58,33%) ao antígeno Th 66 10d 20x [] (SAB), 20 (83,33%) ao antígeno Th 8334 10d 20x [] (FN), enquanto 21 (87,5%) amostras apresentaram reatividade frente ao antígeno CSSEPC-M 01 20d (FN) e 16 (66,66%) amostras ao antígeno CSSEPC-M 8334 10d (FN) (Figura 7).

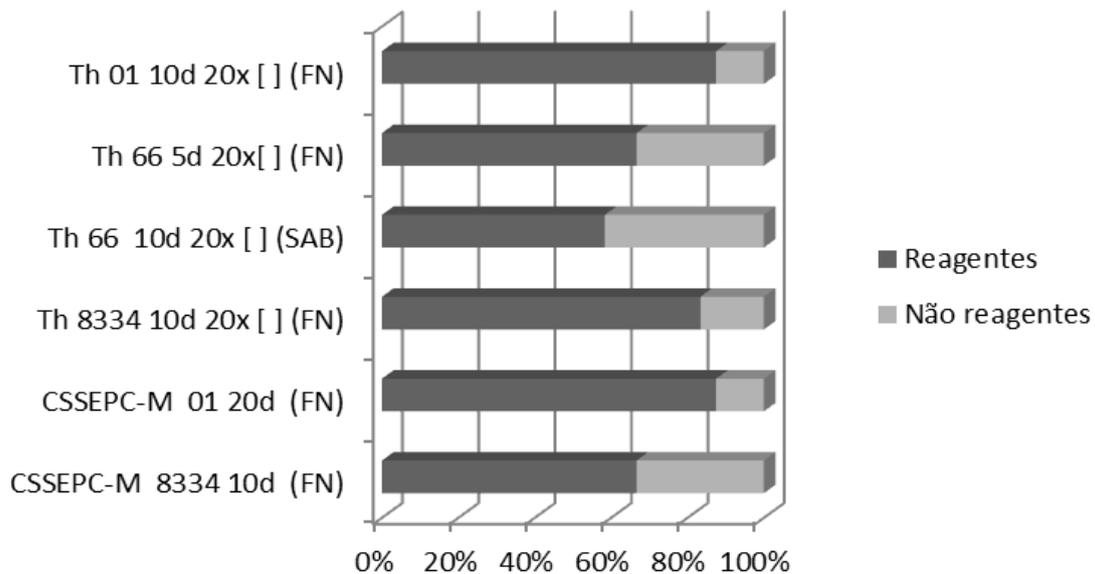


Figura 7. Padrão de reatividade, por imunodifusão dupla, das 24 amostras de soro de pacientes com reatividade sorológica para *P. brasiliensis* frente aos antígenos de *P. lutzii*.

Três amostras de soro foram selecionadas aleatoriamente a fim de que pudéssemos avaliar o título de anticorpos circulantes anti-*Paracoccidioides* spp. As amostras foram diluídas em solução salina 0,85% na razão dois (2) até o título de 1:1024 e avaliadas frente ao antígeno de *P. brasiliensis* [(Th 339 7d

10 x[] FN)] obtido segundo metodologia proposta por Freitas (2005) e as seis (6) preparações antigênicas de *P. lutzii*.

Os títulos de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* obtidos para as três amostras (AM1, AM2 e AM3) foi de 1:32, 1:128 e 1:256, ou seja, considerados segundo Moreto (2010) como pacientes com altos títulos de anticorpos circulantes para esta espécie fúngica. Quando estes soros foram avaliados frente às preparações antigênicas de *P. lutzii*, observou-se que os títulos variaram de 1:16 (moderado) a 1:256 (alto) (**Tabela 12**).

O conjunto de resultados demonstra que as amostras de soros de pacientes com PCM com histórico sorológico de reatividade ao antígeno de *P. brasiliensis* também apresentaram reatividade frente aos antígenos de *P. lutzii*. A avaliação dos ensaios qualitativo e semi-quantitativo, sugerem fortemente, que ambas as espécies, ou seja, *P. brasiliensis* e *P. lutzii* apresentem frações antigênicas comuns.

Tabela 12. Comparação, por imunodifusão dupla, do título de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* e *P. lutzii* em amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada.

Antígenos de <i>Paracoccidioides</i> spp	AM1	AM2	AM3
Th 339 7d (FN)	1:32	1:128	1:256
Th 01 20d 10x [] (FN)	1:64	1:128	1:256
Th 66 5d 20x [] (FN)	1:16	1:128	1:64
Th 66 10d 20x [] (SAB)	1:16	1:128	1:64
Th 8334 10d 20x [] (FN)	1:16	1:16	1:128
CSSEPC-M 01 20d (FN)	1:64	1:64	1:128
CSSEPC-M 8334 10d (FN)	1:16	1:128	1:128

5.4.2. Soros de pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose, porém com ausência de reatividade frente ao filtrado de cultura da cepa B-339 de *P. brasiliensis*

Para este ensaio foram selecionados 10 soros de pacientes com suspeita clínica de PCM que possuíam histórico, no mínimo, de duas (2) sorologias com ausência de reatividade para *P. brasiliensis*. Tais amostras foram avaliadas, por ID, frente aos antígenos Th 01 20d 10x [] (FN); Th 8334 10d 20x [] (FN); Th 66 5d 20x [] (FN) e CSSEPC-M 01 20d (FN) de *P. lutzii*. A descrição das amostras utilizadas para a realização deste ensaio pode ser consultada no **Anexo M**.

Observou-se que apenas uma (1) amostra apresentou reatividade frente aos antígenos Th 01 20d 10x [] (FN) e Th 66 5d 20x [] (FN) de *P. lutzii*. Esta única amostra reagente aos antígenos de *P. lutzii*, aqui identificada de NEG8, apresentava histórico sorológico prévio demonstrando ausência de reatividade, por ID, para *P. brasiliensis* em três avaliações sorológicas.

Visando confirmar o resultado sorológico obtido pelo ensaio de ID, a amostra foi avaliada por *immunoblotting* (IB) empregando-se os antígeno Th 01 20d 10x [] (FN) e CSSEPC-M 01 20d (FN) e o filtrado de cultura da amostra 113 de *P. brasiliensis*. A análise dos resultados revelou o reconhecimento, mesmo que de fraca intensidade, de quatro (4) e três (3) frações antigênicas, respectivamente, para Th 01 20d 10x [] (FN) e CSSEPC-M 01 20d (FN), evidenciando-se que as frações proteicas identificadas distribuíam-se em um intervalo entre 36 e 78 kDa. Por outro lado, quando avaliada por IB a amostra reconheceu de forma específica a fração de 43 kDa, conhecida por ser imunodominante em *P. brasiliensis*.

5.4.3 Soros de pacientes com histórico de reatividade frente ao antígeno de *P. brasiliensis*, porém, com a última amostra não reagente, ou seja, em processo de cura clínica e/ou sorológica.

Foram avaliadas, por ID e frente aos antígenos Th 01 20d 10x[] (FN), 66 5d 20x[] (FN), Th 8334 10d 20x[] (FN) e CSSEPC-M 01 20d (FN), 10 amostras de soro de pacientes com histórico sorológico de reatividade para *P. brasiliensis*, porém com ausência de reatividade na última avaliação sorológica, ou seja, soros de pacientes que possivelmente encontram-se em processo de cura clínica e/ou sorológica. A descrição das amostras utilizadas para a realização deste ensaio pode ser consultada no **Anexo N**.

Observou-se que uma amostra (AM5H) apresentou reatividade apenas frente ao antígeno Th 01 20d 10x[] (FN). Por outro lado, uma amostra (AM2H) foi reagente frente a todas as preparações antigênicas de *P. lutzii*. As demais amostras de soro, a exemplo do observado para *P. brasiliensis*, não apresentaram reatividade para *P. lutzii*.

Diante deste resultado, optou-se por avaliar, por *immunoblotting*, a resposta sorológica da amostra AM2H, aos antígenos Th 01 20d 10x[] (FN) e CSSEPC-M 01 20d (FN), bem como frente ao filtrado de cultura de *P. brasiliensis*. A interpretação dos resultados revelou reatividade sorológica aos antígenos de *P. lutzii*, sendo possível identificar o reconhecimento de quatro (4) frações proteicas distribuídas em um intervalo entre 36 e 78 kDa para ambos os antígenos. Observou-se, que esta amostra reconheceu, independentemente da intensidade da reação, a fração com massa molecular estimada de 60 kDa presente em ambas preparações de *P. lutzii*, entretanto, para CSSEPC-M 01 20d (FN) apenas a fração de 60 kDa pode ser visualizada com nitidez. Verificou-se ainda, reatividade frente à fração de 43 kDa de *P. brasiliensis*, evidenciando-se que mesmo após a cura clínica e/ou sorológica, empregando-se técnicas mais sensíveis, ainda é possível a detecção da mesma (**Figura 8**).

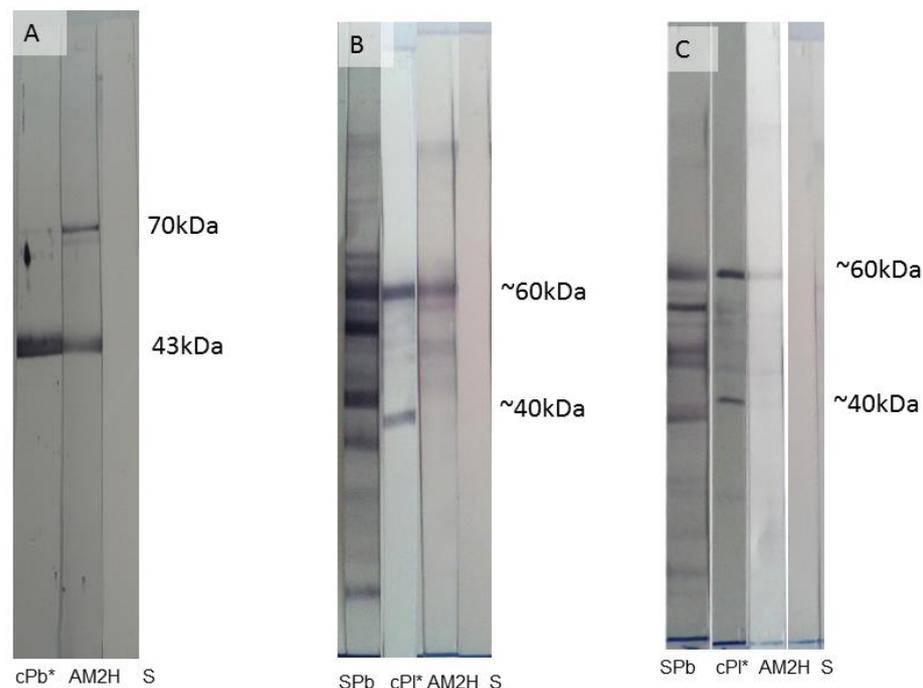


Figura 8. Avaliação, por *immunoblotting*, da amostra de soro (AM2H) de paciente com histórico de reatividade sorológica frente a antígeno de *P. brasiliensis*, porém com ausência de reatividade na última avaliação sorológica. A) filtrado de cultura de *P. brasiliensis*, B) antígeno Th 01 20d 10x [] (FN), C) antígeno CSSEPC-M 01 20d (FN). Onde: cPb*: anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis*, cPI*: anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. lutzii*, SPb: soro reagente de paciente com paracoccidiodomicose por *P. brasiliensis* e S: amostra de soro de indivíduo saudável

5.4.4. Soros de pacientes com paracoccidiodomicose comprovada por meio de exame micológico direto e/ou histopatológico, porém sem avaliação sorológica para *Paracoccidioides* sp e residentes em região potencialmente endêmica para *P. lutzii*

As 21 amostras de soro de pacientes residentes no estado de Rondônia, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rui R. Durlacher do Centro de Medicina Tropical de Rondônia (CEMETRON) foram avaliadas frente a dois (2)

antígenos de *P. brasiliensis*, a saber: Th 339 7d 10 x[] (FN) e Th 113 7d 10 x[] (FN) e cinco (5) antígenos de *P. lutzii*, quatro produzidos no presente trabalho, ou seja, Th 01 20d 10x[] (FN), 66 5d 20x [] (FN), Th 8334 10d 20x [] (FN) e CSSEPC-M 01 20d (FN) e um produzido por Gegembauer et al., (2014), considerado neste estudo, como antígeno de referência para *P. lutzii*. A descrição das amostras utilizadas para a realização deste ensaio pode ser consultada no **Anexo O**.

Do total de amostras avaliadas frente às preparações antigênicas de *P. brasiliensis*, 16 (76,19%) foram reagentes ao antígeno Th 113 7d 10 x[] (FN) e 13 (61,90%) para Th 339 7d 10 x[] (FN). Em relação ao padrão de reatividade destas amostras frente às preparações antigênicas de *P. lutzii*, observou-se que 18 (85,71%) amostras apresentaram reatividade aos antígenos Th 01 20d 10x[] (FN), Th 66 5d 20x[] (FN), CSSEPC-M 01 20d (FN), 16 (76,19%) ao antígeno Th 8334 10d 20x[] (FN) e 17 (80,05%) frente ao antígeno de referência para *P. lutzii* (**Figura 9**).

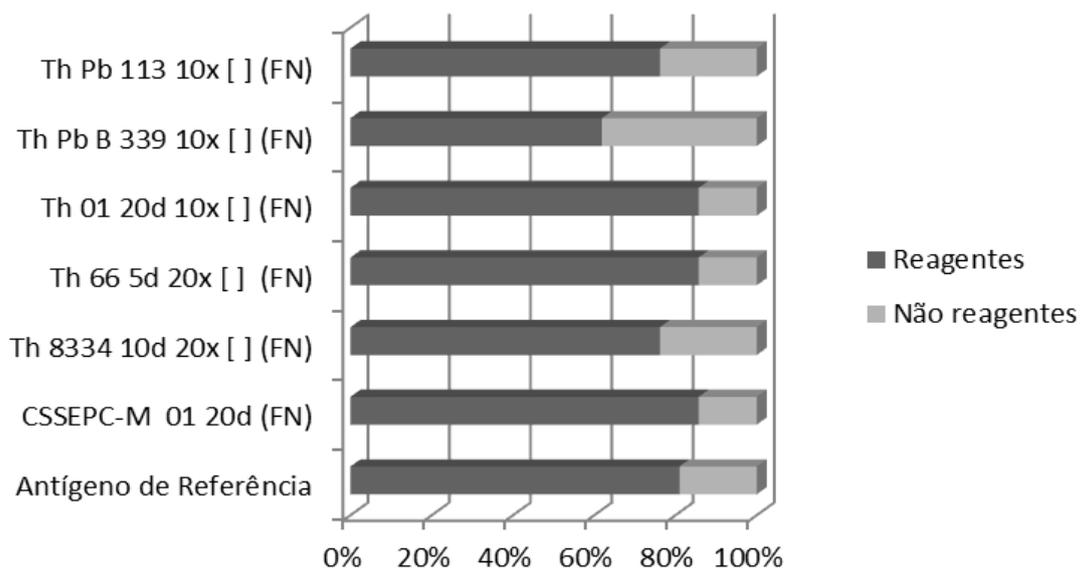


Figura 9. Padrão de reatividade por imunodifusão das 21 amostras de soro de pacientes com PCM comprovada oriundos de uma região potencialmente endêmica para *P. lutzii* frente aos antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.

Verificou-se ainda que duas (2) amostras (2RO e 18RO), não apresentaram, por ID, reatividade frente a nenhuma das preparações antigênicas avaliadas (**Tabela 13**).

A fim de verificar se estes pacientes realmente não apresentavam infecção por *Paracoccidioides* spp, ambas as amostras foram avaliadas pela metodologia de *immunoblotting*, empregando-se como antígeno filtrado de cultura da amostra 113 de *P. brasiliensis*. Após a revelação das fitas de nitrocelulose, comprovou-se que a amostra 2RO apresentava ausência de reatividade para *P. brasiliensis* e a amostra 18RO apresentava reatividade frente à glicoproteína de 43 kDa de *P. brasiliensis*, sugerindo fortemente que este paciente tenha sido exposto ao patógeno em algum momento da sua vida.

Por outro lado, três (3) amostras de soro (1RO, 13RO e 21RO), foram reagentes, por ID, apenas frente às preparações antigênicas de *P. lutzii*. Estas amostras também foram avaliadas, por *immunoblotting*, empregando-se como antígeno filtrado de cultura de *P. brasiliensis*. A análise dos resultados demonstrou que a amostra de soro 1RO reconheceu de forma específica a fração de 43 kDa, enquanto a amostra de soro 13RO reconheceu as frações de 43 e 70 kDa, ambas consideradas marcadoras sorológicas de *P. brasiliensis*. Em relação à amostra 21RO observou-se ausência de reatividade frente à preparação antigênica de *P. brasiliensis*, sugerindo que este paciente possa estar infectado por *P. lutzii* (**Tabela 13**).

Diante do resultado obtido frente ao filtrado de cultura de *P. brasiliensis*, o padrão sorológico da amostra 21RO (**Figura 10 A**), foi avaliado, por *immunoblotting*, empregando-se duas preparações antigênicas de *P. lutzii*, sendo possível verificar reatividade frente a quatro frações para o antígeno Th 01 20d 10x[] (FN) e cinco (5) frações para CSSEPC-M 01 20d (FN), todas distribuídas em um intervalo entre 36 e 78 kDa, em ambos os antígenos avaliados (**Figura 10 B e C**).

Observou-se ainda, que do total de amostras avaliadas, 12 (57,14%) foram reagentes a todos os antígenos avaliados, ou seja, antígenos de *P. brasiliensis* e de *P. lutzii*. Quatro (19,04%) amostras apresentaram ausência de reatividade frente a pelo menos um antígeno avaliado, entretanto, apresentaram reatividade para outras preparações obtidas a partir da mesma espécie (3RO, 7RO, 9RO e 12RO). Nenhuma das amostras avaliadas apresentou reatividade apenas para antígenos obtidos a partir de isolados de *P. brasiliensis*. Os resultados detalhados de cada amostra de soro nos ensaios de ID e *immunoblotting* podem ser consultados na **Tabela 13** e o padrão de reatividade das amostras de soro, por ID, podem ser observadas nas **Figuras 11, 12 e 13**.

Entre as 12 amostras de soros reagentes (4RO, 5RO, 6RO, 8RO, 10RO, 11RO, 14RO, 15RO, 16RO, 17RO, 19RO e 20RO) frente a todas as preparações antigênicas de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, verificou-se que oito (67,67%) amostras apresentaram títulos de anticorpos circulantes maiores para *P. lutzii* do que para *P. brasiliensis*; duas (16,67%) apresentaram títulos iguais para ambas às espécies de *Paracoccidioides* e duas (16,67%) apresentaram títulos maiores para *P. brasiliensis* (**Figura 14**).

Analisando-se os oito casos em que o título de anticorpos circulantes anti-*Paracoccidioides* spp foi maior para *P. lutzii* do que para *P. brasiliensis*, verificou-se que para cinco (5) amostras essa diferença foi de dois (2) títulos, para duas (2) amostras a diferença foi de apenas um (1) título, enquanto que para uma (1) amostra observou-se quatro (4) títulos de diferença sendo 1:16 para *P. brasiliensis* e 1:256 para *P. lutzii*.

Foram escolhidas aleatoriamente, para serem avaliadas por *immunoblotting* empregando-se o antígeno CSSEPC-M 01 20d (FN), duas amostras de soro que apresentaram reatividade, por ID, para as preparações antigênicas de ambas as espécies de *Paracoccidioides*. A análise do padrão de reatividade da amostra 5RO revelou a presença de 17 frações protéicas com

massa molecular aparente distribuídas entre 78 e abaixo de 17 kDa, já na amostra 15RO foi possível identificar reatividade de nove (9) frações distribuídas entre 78 e 17 kDa (**Figura 10 C**)

As amostras avaliadas por IB frente às preparações antigênicas de *P. lutzii*, ou seja, 5RO, 15 RO e 21RO, bem como o anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. lutzii*, utilizado como controle positivo da reação apresentaram reconhecimento de forte intensidade frente à fração antigênica com massa molecular estimada de 60 kDa. Entretanto, merece destaque especial o fato de que a amostra de soro de paciente com alto título (1:1024) de anticorpo circulante oriundo de região endêmica para *P. brasiliensis* também apresentar reatividade frente a fração de 60 kDa de *P. lutzii* (**Figura 10 B e C**)

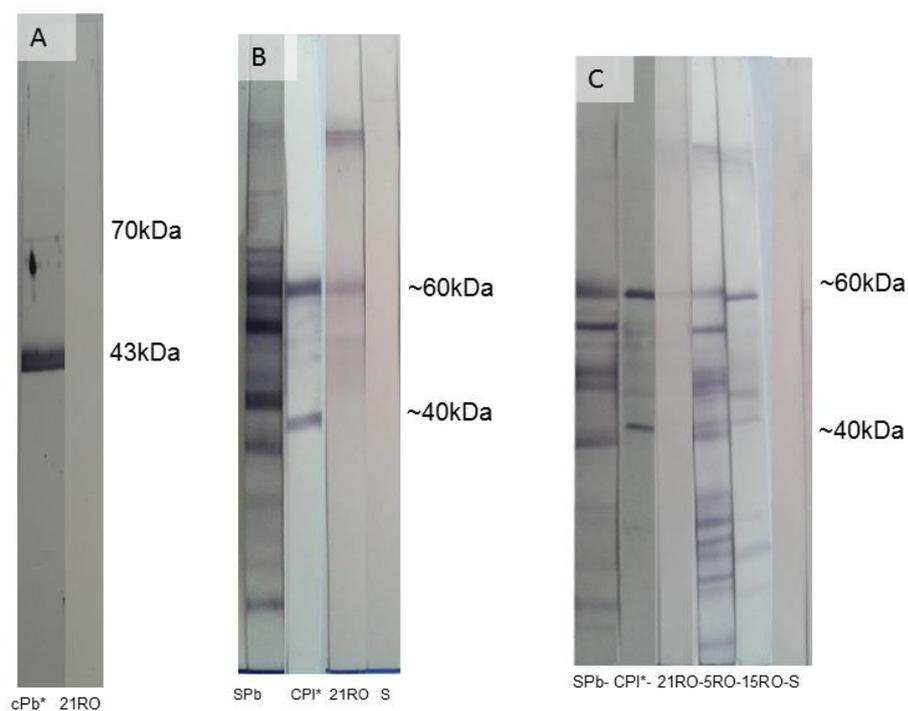


Figura 10. Avaliação, por *immunoblotting*, das amostras de soro (5RO, 15RO e 21RO) de pacientes de região potencialmente endêmica para *P. lutzii*. A) filtrado de cultura de *P. brasiliensis*, B) antígeno Th 01 20d 10x [] (FN), C) antígeno CSSEPC-M 01 20d (FN). Onde: cPb*:anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis*, cPI*:anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. lutzii*, S: amostra de soro de indivíduo saudável

Tabela 13. Análise da reatividade de soros de pacientes com PCM comprovada residentes em área potencialmente endêmica para *P. lutzii* por imunodifusão dupla e *immunoblotting*, frente a antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

Soros	ID							ID titulação			IB
	Th 339 7d 10x [] (FN)	Th 113 7d 10x [] (FN)	Th 01 20d 10x [] (FN)	Th 66 5d 20x [] (FN)	Th 8334 10d 20X [] (FN)	CSSEPC -M 01 20d FN	Antígeno de referência	Th 113 7d 10x [] (FN)	CSSEP C-M 01 20d (FN)	Antígeno de referência	Filtrado de cultura Pb113
1 RO	NR	NR	NR	R	NR	R	R	-	1:2	1:2	43
2 RO	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-	-	-
3 RO	R	R	R	NR	NR	R	NR	1:8	1:2	-	43+70
4 RO	R	R	R	R	R	R	R	1:4	1:16	-	43+70
5 RO	R	R	R	R	R	R	R	1:8	1:16	-	43+70
6 RO	R	R	R	R	R	R	R	1:64	1:64	-	43+70
7 RO	NR	R	R	R	R	R	R	1:64	1:128	-	43
8 RO	R	R	R	R	R	R	R	1:4	1:16	-	43
9 RO	NR	R	R	R	NR	R	R	1:4	1:32	-	43+70
10 RO	R	R	R	R	R	R	R	1:8	1:16	-	-
11 RO	R	R	R	R	R	R	R	1:128	1:32	-	43+70
12 RO	NR	R	R	R	R	NR	NR	1:64	1:8		43+70
13 RO	NR	NR	R	R	R	R	R	-	1:32	1:16	43+70
14 RO	R	R	R	R	R	R	R	1:8	1:32	-	43+70
15 RO	R	R	R	R	R	R	R	1:16	1:256	-	43
16 RO	R	R	R	R	R	R	R	1:2	1:8	-	43
17 RO	R	R	R	R	R	R	R	1:8	1:8	-	43
18 RO	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-	-	43
19 RO	R	R	R	R	R	R	R	1:4	1:2	-	43
20 RO	R	R	R	R	R	R	R	1:2	1:8	-	43
21 RO	NR	NR	R	R	R	R	R	-	1:8	1:8	-

(R) Reagente; (NR) Não Reagente; - (não realizado); (FN) ágar Fava Netto (CSSEPC-M) CFA modificado

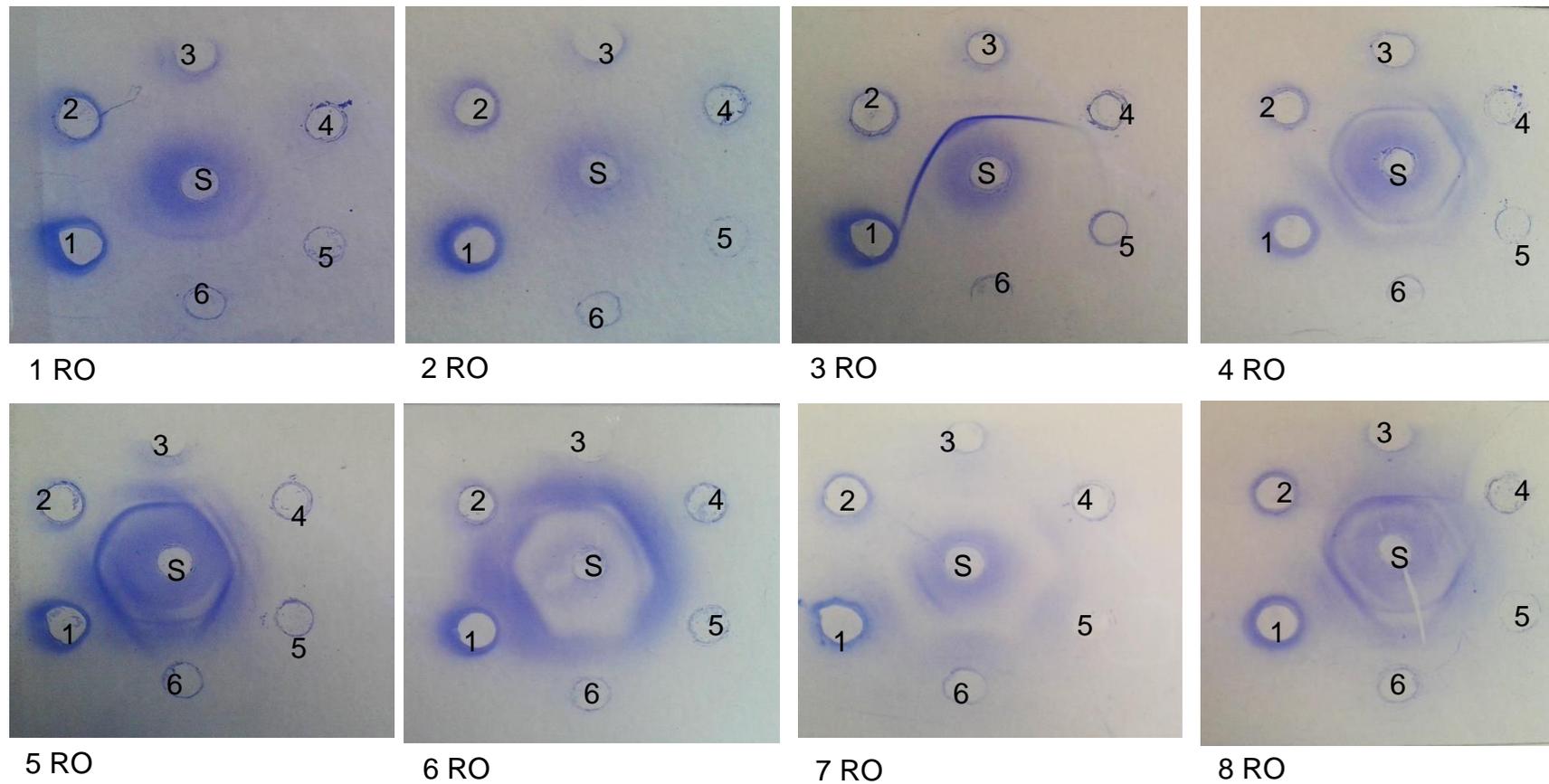


Figura 11. Reatividade por imunodifusão dupla das amostras de soro (1RO a 8RO) de pacientes com PCM confirmada, residentes em área potencialmente endêmica para *P. lutzii* frente a antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Onde: 1) CSSEPC-M 01 20d (FN), 2) Th 113 7d 10x[] (FN), 3) Th 339 7d 10x[] (FN), 4) Th 8334 10d 20x[] (FN), 5) Th 66 5d 20x[] (FN), 6) Antígeno de referência, e S) amostra de soro avaliada

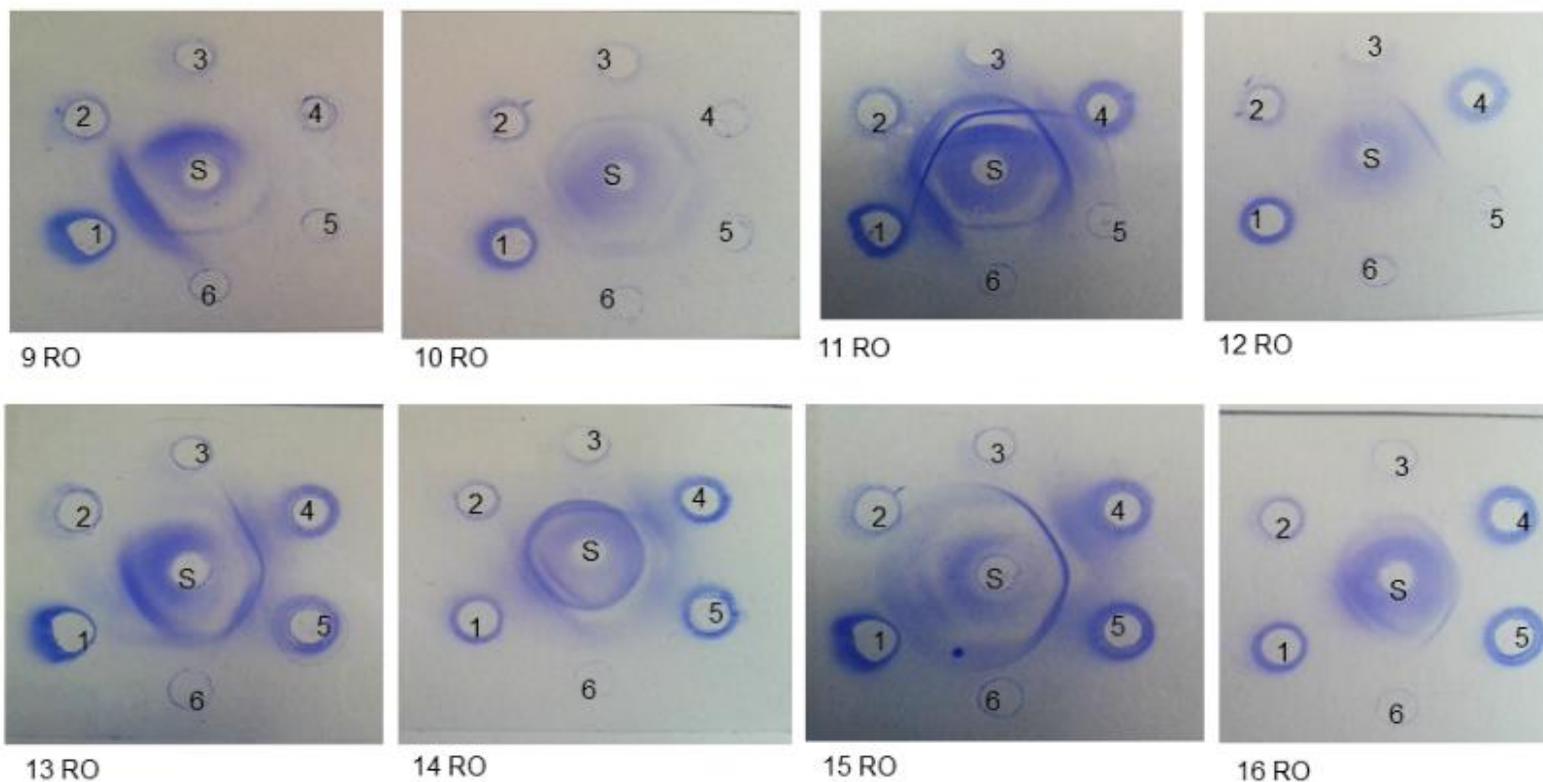


Figura 12. Reatividade por imunodifusão dupla das amostras de soro (9RO a 16RO) de pacientes com PCM confirmada, residentes em área potencialmente endêmica para *P. lutzii* frente a antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Onde: 1) CSSEPC-M 01 20d (FN), 2) Th 113 7d 10x [] (FN), 3) Th 339 7d 10x [] (FN), 4) Th 8334 10d 20x [] (FN), 5) 66 5d 20x [] (FN), 6) Antígeno de referência, e S) amostra de soro avaliada.

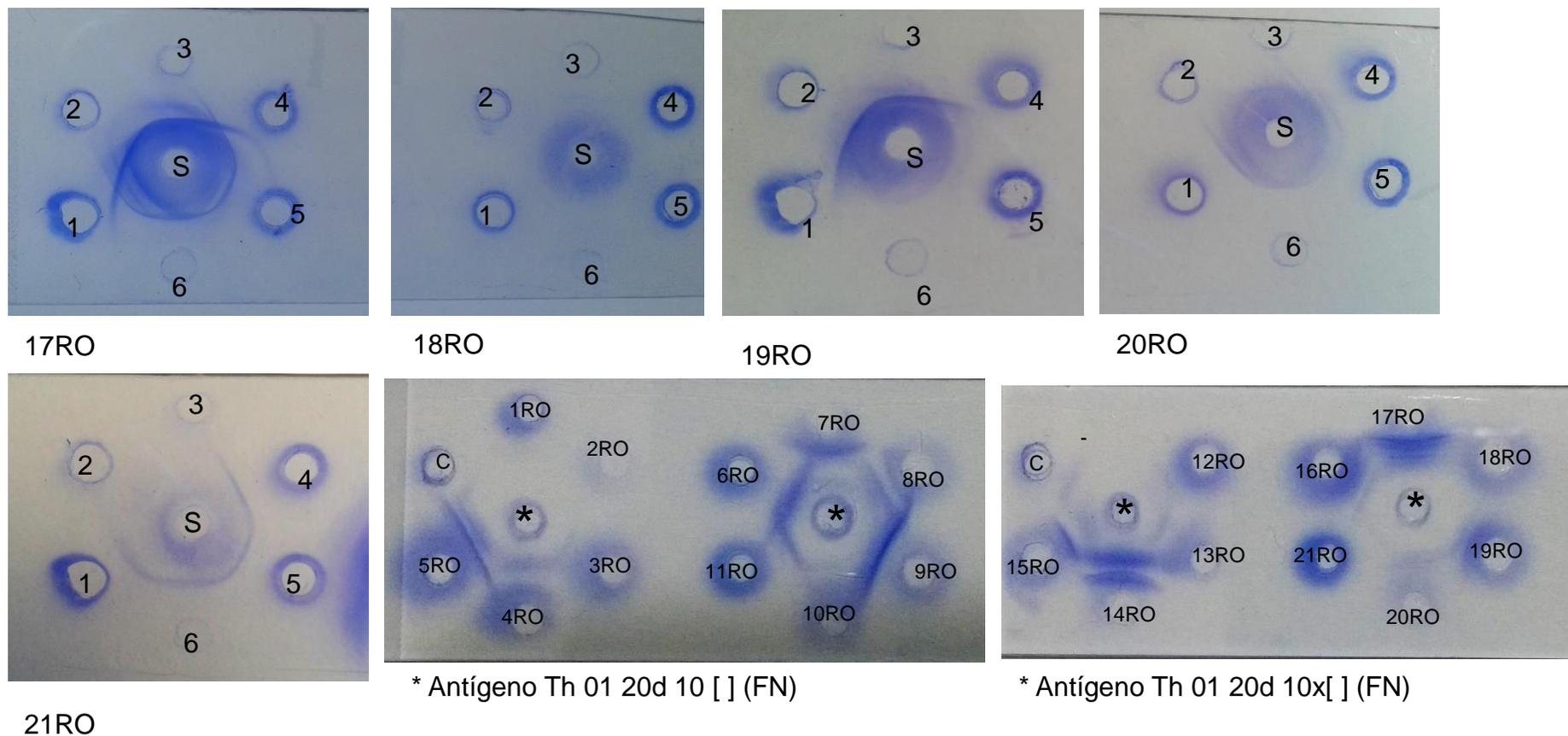


Figura 13. Reatividade por imunodifusão dupla das amostras de soro (17RO a 21RO) de pacientes com PCM confirmada, residentes em área potencialmente endêmica para *P. lutzii* frente a antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Onde: 1) CSSEPC-M 01 20d (FN), 2) Th 113 7d 10x [] (FN), 3) Th 339 7d 10x [] (FN), 4) Th 8334 10d 20x [] (FN), 5) Th 66 5d 20x [] (FN), 6) Antígeno de referência, e S) amostra de soro avaliada.

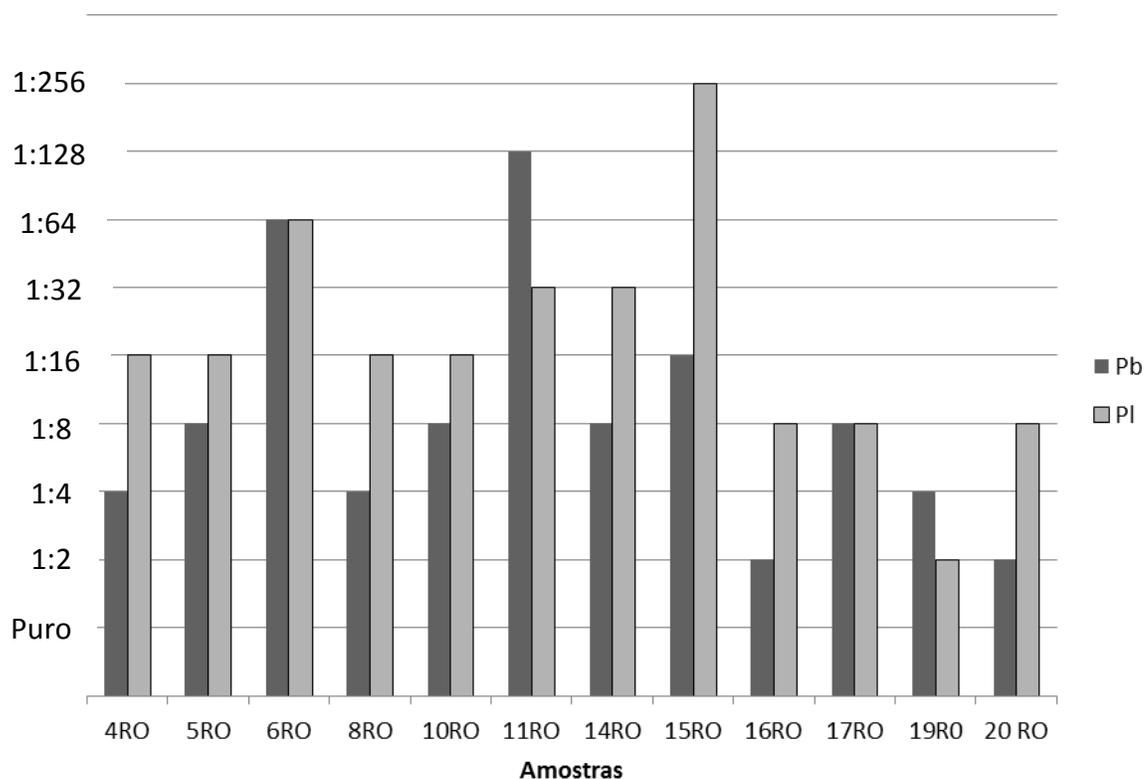


Figura 14. Comparação do título de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* (Pb) e *P. lutzii* (Pl), das 12 amostras de soro de pacientes com PCM comprovada e reagente frente aos antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* por imunodifusão dupla.

5.4.5. Soros de pacientes com PCM comprovada por meio de avaliação histopatológica, porém, com ausência de reatividade para *P. brasiliensis* residentes em região potencialmente endêmica (Mato Grosso do Sul) para *P. lutzii*

Foram avaliadas cinco (5) amostras de soro de pacientes com PCM comprovada, residentes em região potencialmente endêmica para *P. lutzii*, porém com histórico sorológico de ausência de reatividade, por ID, frente ao filtrado de cultura do isolado 113 de *P. brasiliensis*, gentilmente cedidas pela Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). A descrição das amostras utilizadas para a realização deste ensaio pode ser consultada no **Anexo P**.

Sabendo-se que estas amostras apresentavam ausência de reatividade sorológica para *P. brasiliensis*, todas foram primeiramente reavaliadas, por ID, empregando-se os antígenos Th 339 7d 10 x[] (FN) e Th 113 7d 10 x[] (FN) de *P. brasiliensis* e posteriormente frente às preparações antigênicas Th 01 20d 10x[] (FN), 66 5d 20x[] (FN), Th 8334 10d 20x[] (FN) e CSSEPC-M 01 20d (FN), bem como ao antígeno de referência de *P. lutzii*.

Observou-se, por ID, que duas (2) amostras (J e L) apresentaram reatividade frente aos antígenos de ambas as espécies de *Paracoccidioides*. A determinação do título de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* e anti-*P. lutzii* revelou que a amostra J apresentou título de anticorpos de 1:512 tanto para *P. brasiliensis* como para *P. lutzii*. Por outro lado, a amostra L apresentou títulos distintos, sendo possível observar uma diferença de dois (2) títulos, entre as duas espécies, ou seja, detectou-se título de 1:8 para *P. brasiliensis* e de 1:2 para *P. lutzii* (**Tabela 14**).

Quando avaliadas por *immunoblotting*, uma metodologia mais sensível, todas as amostras de soro, com exceção do soro N, apresentaram, majoritariamente, reatividade frente à fração de 60 kDa de *P. lutzii* bem como frente a glicoproteína de 43 kDa de *P. brasiliensis* (**Figura 15**).

Deste modo, devido à presença de reações cruzadas, mesmo em soros provenientes de áreas potencialmente endêmicas para *P. lutzii*, não foi possível determinar por métodos sorológicos se os pacientes apresentam paracoccidioidomicose por *P. brasiliensis* ou *P. lutzii*.

Tabela 14. Análise do padrão de reatividade, por imunodifusão dupla e *immunoblotting*, das amostras de soro de pacientes com PCM comprovada residentes em área potencialmente endêmica para *P. lutzii*, frente a antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.

Soros	ID							ID titulação		IB	
	Th Pb 339 7d 10X [] (FN)	Th Pb 113 7d 10X [] (FN)	Th 01 20D 10X [] (FN)	Th 66 5d 20x [] (FN)	Th 8334 10d 20x [] (FN)	CSSEPC -M 01 20d (FN)	Ag de referênci a	Th Pb 113 10X [] (FN)	CSSEPC -M 01 20d M (FN)	Filtrado de Pb 113	PI Th 01 20D 10X [] FN e CFA-M 01 20d (FN)
J	R	R	R	R	R	R	R	1:512	1:512	43	R
L	R	NR	R	NR	NR	R	NR	1:8	1:2	43 +70	R
M	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-	43*	R
N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-	NR	NR
O	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-	43	R

(R): Reagente (NR): Não Reagente (-): não realizado (*): Fraca intensidade

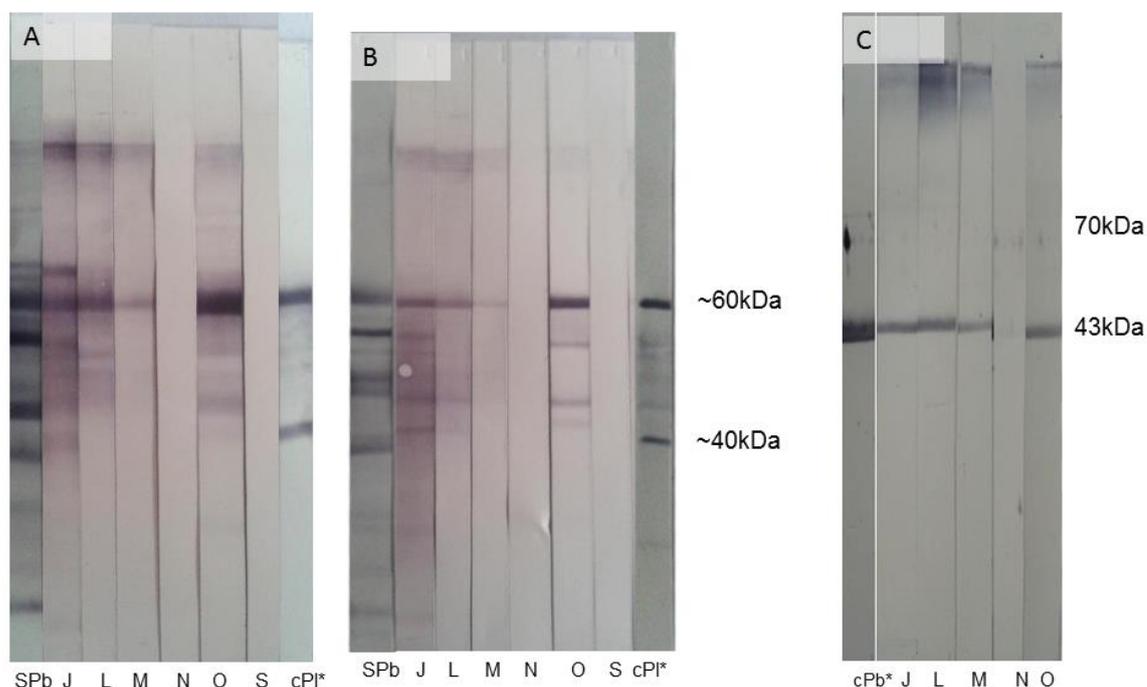


Figura 15. Avaliação, por *immunoblotting*, das amostras de soro (J, L, M, N e O) de pacientes com PCM confirmada e residentes em região potencialmente endêmica para *P. lutzii*. A) antígeno Th 01 20d 10x[] (FN), B) Antígeno CSSEPC-M 01 20d (FN), C) Filtrado de cultura *P. brasiliensis*. Onde: cPb*:anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis*, cPI*:anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. lutzii*, SPb: amostra de soro de paciente com reatividade para *P. brasiliensis* e S: amostra de soro de indivíduo saudável.

5.4.6. Soros de pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose residentes em região potencialmente endêmica para *P. lutzii*

Foram analisadas 51 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM oriundos dos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, considerados como regiões potencialmente endêmicas para

P. lutzii. Todas as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) dos respectivos estados para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* no período de 2002 a 2008 e encontravam-se armazenadas a -20°C, na soroteca do referido laboratório. A descrição das amostras utilizadas para a realização deste ensaio pode ser consultada no **Anexo Q**.

Todas as amostras foram avaliadas, por ID, frente ao antígeno Th 339 7d 10 x[] (FN) de *P. brasiliensis* e frente às preparações antigênicas Th 01 20d 10x[] (FN), 66 5d 20x[] (FN), Th 8334 10d 20x[] (FN) e CSSEPC-M 01 20d (FN) de *P. lutzii*.

Verificou-se por ID, que 12 (23,52%) amostras de soro apresentaram reatividade ao antígeno de *P. brasiliensis*, porém, como demonstrado na **Tabela 15**, somente sete (13,72%) soros foram reagentes pelo menos a uma preparação antigênica de *P. lutzii*. Por essa razão, oito (8) amostras, incluindo os cinco (5) soros reagentes apenas para *P. brasiliensis*, foram avaliadas, por *immunoblotting*, empregando-se os antígenos Th 01 20d 10x [] (FN) e CSSEPC-M 01 20d (FN).

Na **Figura 16** observa-se que todas as amostras de soro avaliadas, mesmo aquelas que apresentaram ausência de reatividade, por ID, frente aos antígenos de *P. lutzii*, mostraram-se reagentes quando avaliados através de uma técnica mais sensível, sendo que a maioria apresentou reconhecimento de múltiplas frações.

Mais uma vez, as reações cruzadas entre as preparações antigênicas de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, impediu a determinação sorológica da espécie causal do agravo.

Tabela 15. Análise do padrão de reatividade, por imunodifusão dupla e *immunoblotting*, das amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM residentes em área potencialmente endêmica para *P. lutzii*, frente a antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

Soros	ID					IB	
	Pb B-339	Th 01 20D 10X [] (FN)	Th 66 5d 20x [] (FN)	Th 8334 10d 20x [] (FN)	CSSE PC-M 01 20d (FN)	Th 01 20d 10X [] (FN)	CSSEP C-M 01 20d (FN)
1M	R	NR	NR	NR	NR	R	R
2M	R	R	R	R	R	R	R
3M	R	NR	NR	NR	NR	R	R
4M	R	R	R	R	R	R	R
5M	R	R	R	R	R	R	R
6M	R	R	R	R	R	-	-
7M	R	NR	NR	NR	NR	R	-
8M	R	R	NR	NR	R	-	-
9M	R	R	R	R	R	-	-
10M	R	NR	NR	NR	NR	R	-
11M	R	R	NR	R	R	-	-
12M	R	NR	NR	NR	NR	-	R

(R) Reagente (NR) Não Reagente - (não realizado)

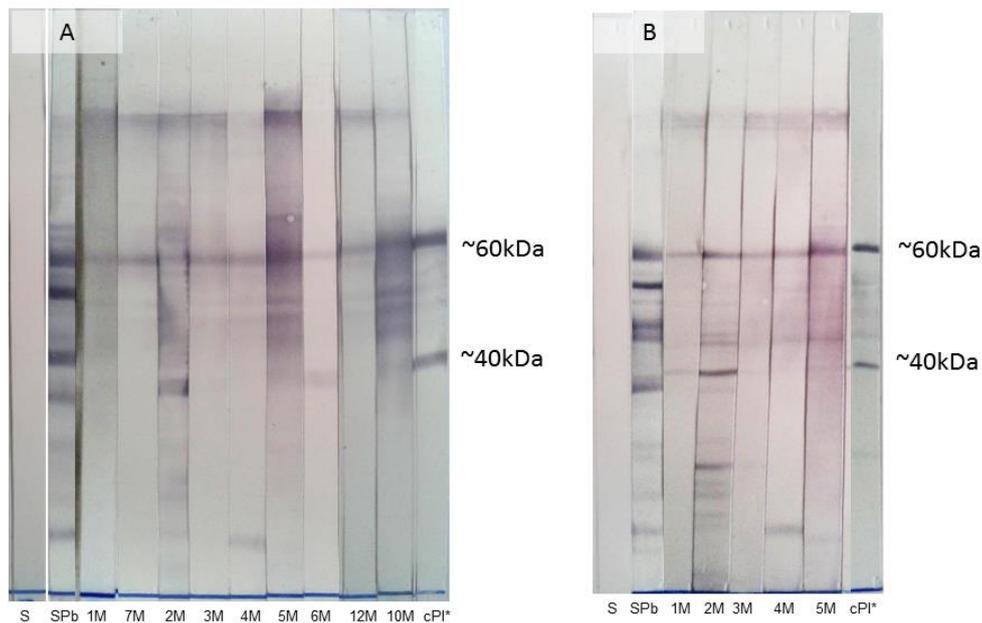


Figura 16. Avaliação por *immunoblotting*, das amostras de soro de pacientes (1M, 2M, 3M 4M, 5M, 6M, 7M, 10M, 12M) com suspeita clínica de PCM e residentes em região potencialmente endêmica para *P. lutzii*. A) antígeno Th 01 20d 10x[] (FN) e B) Antígeno CSSEPC-M 01 20d (FN). Onde: cPI*:anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. lutzii*, SPb: amostra de soro de paciente com reatividade para *P. brasiliensis* e S: amostra de soro de indivíduo saudável.

5.4.7 Soros de pacientes provenientes de região potencialmente endêmica para *P. lutzii* e endêmica para *P. brasiliensis* com resultado discordante, frente a *poll* de antígenos

Visto que, apesar dos antígenos apresentarem claramente determinantes antigênicos semelhantes e a reatividade cruzada ser uma realidade em sorologia, algumas amostras de pacientes provenientes tanto de região potencialmente endêmica para *P. lutzii*, neste caso específico, amostras de soro de pacientes de Rondônia, quanto endêmica para *P.*

brasiliensis apresentaram reatividade somente a uma espécie de *Paracoccidioides sp* ou somente a algum antígeno da espécie.

Com o objetivo de avaliar se a “formulação” de um *pool* antígenos poderia diminuir os resultados falso negativos de amostras com esse perfil sorológico, 12 amostras de soro foram reavaliadas, por imunodifusão dupla, frente a diferentes combinações de antígenos.

Todos os soros avaliados e os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 16**. Observou-se que para os soros de região endêmica para *P. brasiliensis* o uso de *pool* apresentou resultados satisfatórios, pois todos os cinco (5) soros reavaliados dessa região foram reagentes a todas as combinações de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Por outro lado, os sete (7) soros de região potencialmente endêmica para *P. lutzii* apresentaram reatividade variável de acordo com o antígeno de *P. lutzii* presente na associação antigênica. Neste grupo analisado a “formulação antigênica” que apresentou melhor desempenho foi o aquela composta por todos os antígenos.

Tabela 16. Padrão de reatividade de soros de região endêmica para *P. brasiliensis* e potencialmente endêmica *P. lutzii*, por ID, frente a antígenos das duas espécies isoladamente e *pool* de antígenos

Amostras avaliadas	Th 01 20d 10X [] (FN)	Th 8334 10d 20 X [] (FN)	CCEPC- M 01 20d (FN)	Th 339 7 d 10X [] (FN)	Th 01 20d 10X [] (FN) + Th 339 7 d 10X [] (FN)	Th 8334 10d 20 X [] (FN) + Th 339 7 d 10X [] (FN)	CCEPC- M 01 20d (FN) + Th Th 339 7 d 10X [] (FN)	<i>Pool</i> de todos os antígenos
10 Pb	R	NR	R	R	R	R	R	R
11 Pb	R	NR	R	R	R	R	R	R
14 Pb	NR	NR	NR	R	R	R	R	R
15 Pb	NR	NR	NR	R	R	R	R	R
19 Pb	NR	NR	R	R	R	R	R	R
1 RO	NR	NR	R	NR	R	NR	NR	R
7 RO	R	R	R	NR	R	R	R	R
9 RO	R	NR	R	NR	-	NR	R	-
12 RO	R	R	NR	NR	NR	R	NR	R
13 RO	R	R	R	NR	-	R	R	-
18 RO	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
21 RO	R	R	R	NR	R	R	R	R

(R): Reagente (NR): Não Reagente -: (não realizado)

5.4.8 Comparação do perfil antigênico dos antígenos selecionados de *P. lutzii* frente a antígenos de *P. brasiliensis*

A reatividade cruzada das amostras de soro de pacientes residentes em região endêmica para *P. brasiliensis* e daqueles residentes em região potencialmente endêmica para *P. lutzii*, por imunodifusão dupla e *immunoblotting*, observada frente as preparações antigênicas obtidas de ambas as espécies de *Paracoccidioides*, sugere fortemente que os isolados de *Paracoccidioides* compartilham determinantes antigênicos e que a produção de preparações antigênicas segundo Freitas (2005), Assis et al. (1989) e sua versão modificada, extraem tais frações.

Com o objetivo de elencar e identificar as frações protéicas e/ou glicoprepteicas semelhantes as duas espécies, um SDS-PAGE comparativo foi realizado.

Em relação a *P. brasiliensis*, excetuando-se o filtrado de cultura, que apresenta apenas a molécula de 43 kDa, pode-se observar, por SDS-PAGE que existe grande semelhança entre os antígenos Th 113 7d 10x [] (FN) e Th B-339 7d 10 x [] (FN). Verifica-se ainda, semelhança no padrão de migração protéica entre as preparações Th 01 20d 10X [] (FN), Th 8334 10 20X [] (FN) e CSSEPC-M 01 20d (FN) e uma sutil diferença de Th 66 5d 20X [] (FN) perante a estes. Identificamos, visualmente, a existência de 9 (nove) frações semelhantes entre os antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, sendo elas as frações de massa molecular aparente de ~60,~55,~50,~45, ~40,~28,~22,~17 e~15kDa

O perfil eletroforético das preparações antigênicas pode ser consultado na **Figura 17**.

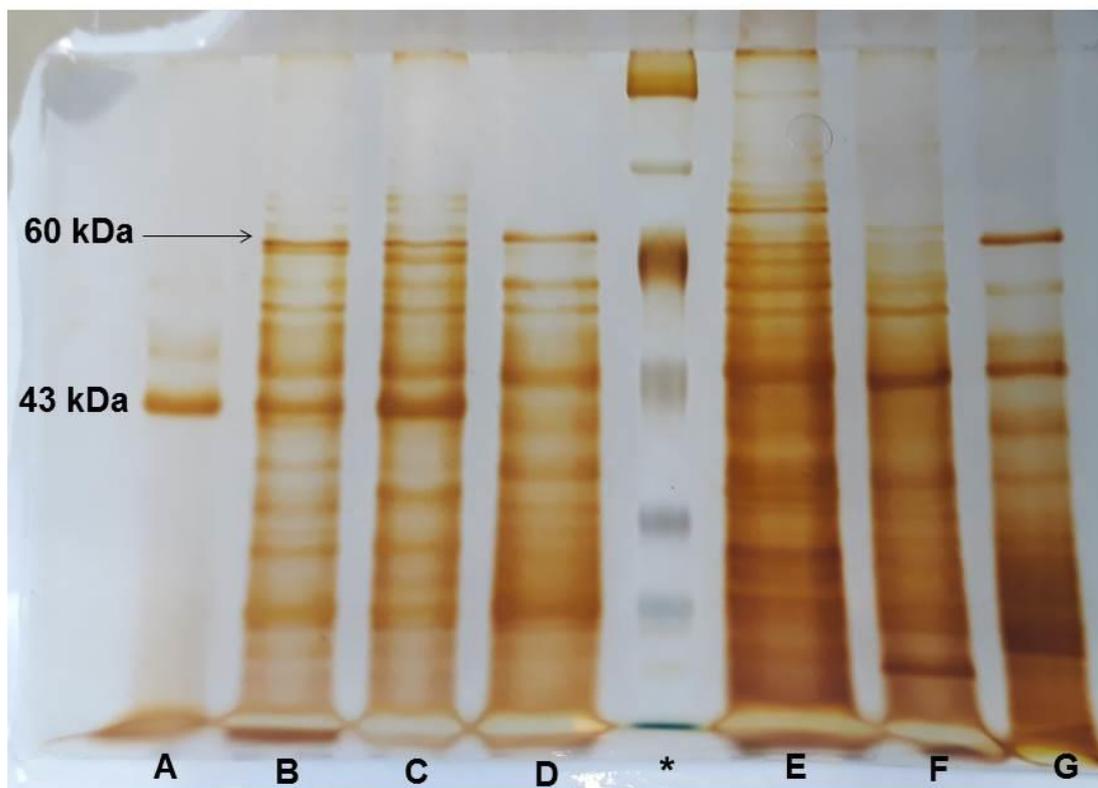


Figura 17. Perfil eletroforético dos antígenos selecionados de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* por SDS-PAGE. A) Filtrado de cultura de *P. brasiliensis* 113. B) Th 113 7d 10X [] (FN), C) Th 339 7d 10X [], D) Th 01 20d 10X [] (FN), E) Th 66 5d 20X [] (FN), F) Th 8334 10 20X [] (FN), G) CSSEPC-M 01 20d (FN) e * Padrão de peso molecular

5.4.9. Soros de pacientes com histórico sorológico para histoplasmose e aspergilose.

Foram avaliados, por ID, frente a 20 amostras de soro de pacientes com histórico e acompanhamento sorológico para histoplasmose (10 amostras) e para aspergilose (10 amostras). A descrição das amostras utilizadas para a realização deste ensaio pode ser consultada nos **Anexos R e S**.

Do total de amostras reagentes para *H. capsulatum* três (30%) apresentaram reatividade frente aos antígenos Th 01 20d 10x [] (FN), Th 66 5d 20x [] (FN) e Th 8334 10d 20x [] (FN). Verificou-se que duas (20%) amostras apresentaram reatividade frente aos antígenos CSSEPC-M 01 20d (FN) e CSSEPC-M 8334 10d (FN). Em relação as preparações antigênicas obtidas a partir do isolado 66, verificou-se que o antígeno Th 66 10d 20x [] (SAB) apresentou o menor índice de reatividade cruzada, uma vez que apenas uma amostra (10%) apresentou reatividade frente ao mesmo (**Figura 18**).

Dos dez soros reagentes para *A. fumigatus*, dois (20%) foram reagentes para todos os antígenos avaliados (**Figura 18**).

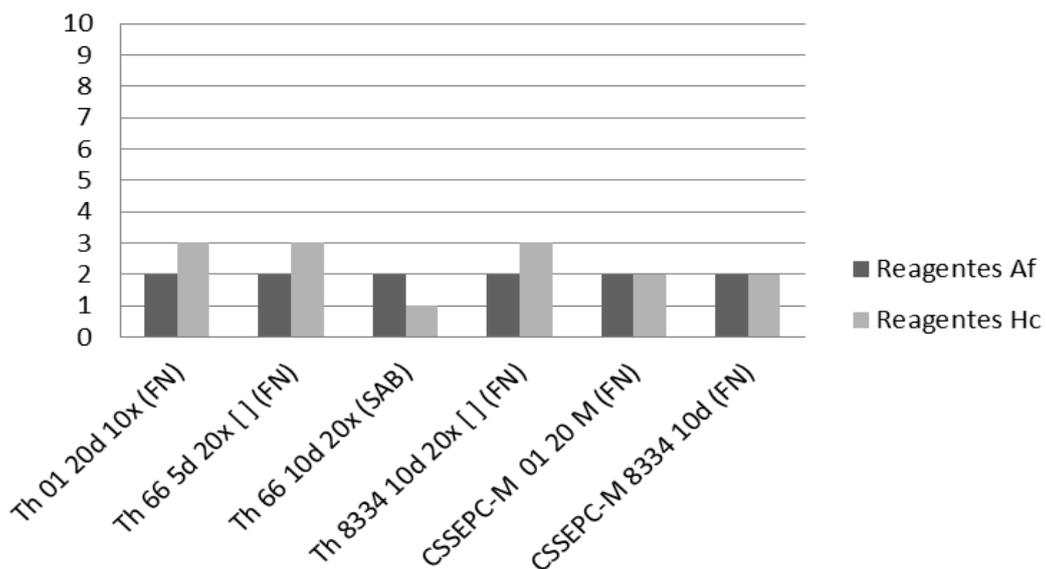


Figura 18. Reatividade, por imunodifusão dupla, das amostras de soro de pacientes com histoplasmosse e aspergilose frente às preparações antigênicas de *P. lutzii*.

5.4.10. Avaliação da estabilidade antigênica

A avaliação, por ID, dos antígenos Th 01 20d 10x [] (FN), Th 66 5d 20x [] (FN), Th 66 10d 20x [] (SAB), Th 8334 10d 20x [] (FN), CSSEPC-M 01 20d (FN) e CSSEPC-M 8334 10d (FN) frente ao anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. lutzii*, após 3, 6 e 9 meses de obtenção e que encontravam-se liofilizados e armazenados a -20°C, revelou presença de reatividade em todos os pontos avaliados e com intensidade de reatividade semelhante aquela apresentada em sua primeira avaliação, ou seja, logo após a obtenção das preparações antigênicas, revelando portanto, os mesmos podem ser armazenadas e utilizadas após longo período de armazenamento.

Verificou-se também, que não houve prejuízo da estabilidade antigênica, quando estes imunobiológicos foram mantidos a temperatura ambiente, por 48 horas, liofilizados ou reconstituídos em água destilada.

6.0. Discussão

O estudo de antígenos fúngicos tem assumido notável importância, principalmente no que diz respeito à aplicabilidade dos mesmos, como reagentes biológicos na avaliação da resposta imune humoral de indivíduos infectados por *Paracoccidioides* sp (Peron et al, 2017).

Sabe-se que *P. brasiliensis* apresenta em sua constituição, uma multiplicidade de componentes antigênicos alguns próprios da espécie, e outros comuns às demais espécies fúngicas (Yarzabal, 1971; Valim et al., 2012), sendo que os mesmos podem ser extraídos da parede celular, obtidos do conteúdo citoplasmático, do produto do metabolismo fúngico (filtrado de cultura) ou podem ser proteínas purificadas ou ainda antígenos recombinantes (Restrepo et al., 1983; Assis, 1989, Camargo et al., 1988, Camargo et al., 1991, Pucia et al., 1991; Camargo et al., 2003, Camargo e Franco, 2000; Panunto-Castelo et al., 2003; Diez et al., 2003; Vicentini, 2008, Camargo, 2008; Fernandes et al., 2011; Vidal et al., 2014; Ferreira et al., 2016; Peron et al., 2017; Mendes et al., 2017).

Apesar da PCM ter sido descrita, por Adolpho Lutz há 110 anos, dos estudos relacionados aos antígenos de *P. brasiliensis* datarem do início do século passado (Silva, 2005), e dos inúmeros trabalhos que relatam o alto impacto sócio-econômico da doença, uma vez que afeta em sua grande maioria, homens trabalhadores rurais impedindo-os devido as imponentes sequelas causadas pela doença de retornar as suas atividades remuneradas (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Shikanai-Yasuda et al., 2017; Mendes et al., 2017), infelizmente, até o presente momento, não dispomos no Brasil de um protocolo padronizado e definido para a obtenção de antígenos de *P. brasiliensis* visando principalmente sua aplicabilidade na rotina diagnóstica.

Neste sentido, inúmeros artigos têm apontado e discutido sobre a enorme variabilidade nas metodologias que vem sendo utilizadas pelos diferentes centros de pesquisa com o objetivo de produzir antígenos de

Paracoccidioides sp. Entre estas pode-se citar: a escolha da amostra fúngica, tamanho do inóculo, meio de cultura, período de incubação, forma de incubação (com ou sem agitação), temperatura, entre outros (Camargo, 2008; Vicentini, 2008; Vidal et al., 2014; Ferreira et al., 2016). Desta forma, pode-se afirmar com grande grau de certeza que toda esta heterogeneidade interfere de forma expressiva no processo de obtenção do produto final, ou seja, antígenos que apresentem especificidade, estabilidade e reprodutibilidade adequadas, características de vital importância para o imunodiagnóstico da PCM.

O impacto desta heterogeneidade, foi novamente ilustrado por Vidal et al. (2014) ao avaliarem o desempenho de seis centros de referência brasileiros no imunodiagnóstico da PCM. Neste estudo, amostras de soro de 30 pacientes com doença comprovada, foram aliqüotadas e enviadas aos diferentes centros, sendo que estes tiveram a liberdade de avaliá-los frente à preparação antigênica rotineiramente utilizada em seus laboratórios. A análise dos resultados revelou e comprovou que há inconsistências entre os laboratórios, e que as mesmas são fortes o suficiente para resultar em informações conflitantes quanto ao tratamento dos pacientes.

A confirmação da existência de uma nova espécie, *P. lutzii*, dentro do gênero *Paracoccidioides* (Teixeira et al, 2014) trouxe a comunidade científica novos e grandes desafios, inclusive aqueles relacionados a caracterização antigênica para fins diagnóstico. Segundo Teixeira et al. (2014) *P. lutzii* apresenta uma composição antigênica extremamente complexa, apresentando componentes próprios da espécie e outros semelhantes aos de *P. brasiliensis*.

Nos últimos anos, alguns autores entre os quais pode-se citar, Batista et al., 2010, Marques-da-Silva et al., 2012 e Nunes, 2014 têm descrito o número crescente de casos de pacientes diagnosticados com PCM, especialmente aqueles residentes nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil, apontadas como potencialmente endêmicas para *P. lutzii*, e que

apresentam ausência de reatividade sorológica, por ID, frente ao antígeno de referência de *P. brasiliensis*, ou seja, filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 ou ainda frente a molécula purificada de 43 kDa de *P. brasiliensis*.

Leitão-Júnior et al. (2014) avaliaram 33 amostras de soro de pacientes com doença ativa, residentes na região Centro-Oeste do Brasil, verificando que as mesmas apresentaram ausência de reatividade frente a molécula nativa ou recombinante de 43 kDa, sugerindo portanto, que a gp43 não pode ser utilizada para a pesquisa de anticorpos circulantes em pacientes com PCM causada por *P. lutzii*. Entretanto, a ausência de reatividade frente ao antígeno de referência de *P. brasiliensis*, já havia sido relatada por Batista et al. (2010) ao avaliarem 65 amostras de soro de pacientes com PCM residentes no estado de Mato Grosso, verificando que apenas 26,2% (17/65) apresentaram reatividade frente ao antígeno de referência. Neste mesmo estudo, os autores mostraram que o índice de reatividade das amostras foi de 92,3% (60/65) quando o antígeno foi produzido a partir de um isolado regional de *P. brasiliensis*.

Estes trabalhos reforçam a necessidade da condução de novos estudos a fim de buscar melhor conhecimento e compreensão da composição antigênica de *P. lutzii* bem como das espécies crípticas de *P. brasiliensis*.

Entretanto, até o presente momento, são poucos os trabalhos que encontram-se disponíveis nas bases de dados e que abordam especificamente a caracterização de preparações antigênicas de *P. lutzii*. Somada a reduzida literatura sobre o assunto, enfrenta-se grande dificuldade na comparação dos resultados gerados nestas publicações, visto que a exemplo ao observado para *P. brasiliensis*, os protocolos descritos apresentam diferenças entre si, no que diz respeito aos: isolados e/ou cepas, meios de cultura, temperatura, tamanho do inóculo, tempo e forma de cultivo (Machado et al., 2013; Lenhard-Vidal et al., 2013; Queiroz Júnior et

al., 2014; Gegembauer et al., 2014; Pereira, 2015; Nunes, 2014; Morais, 2017).

Porém, deve-se lembrar de que além da possível diferença no perfil antigênico e peculiaridades filogenéticas entre *P. brasiliensis*, suas espécies crípticas e *P. lutzii* (Machado et al., 2013; Teixeira et al., 2014, Queiroz-Júnior et al., 2014; Gegembauer et al., 2014) existem outros fatores que podem contribuir, também, para a obtenção dos resultados falso negativos que têm sido descritos não apenas nas regiões Centro-Oeste e Norte, mas em todo o Brasil.

Sabe-se, que as condições envolvidas no crescimento dos microorganismos, incluindo *Paracoccidioides* sp, entre as quais pode-se citar: meio de cultura, temperatura e repiques contínuos afetam diretamente o conteúdo e qualidade dos antígenos, pois exposições a ambientes adversos, estressantes ou não, alteram a transcrição proteica (Ehrhard e Pine, 1972a; Ehrhard e Pine, 1972b).

Deste modo, um resultado falso negativo, muitas vezes, pode estar diretamente relacionado à qualidade e tipo da preparação antigênica utilizada (Vidal et al., 2014). Assim, para a obtenção de antígenos de qualidade e que possam ser utilizados em mais de uma técnica sorológica, é imprescindível que se realize uma avaliação criteriosa observando-se se o isolado ou cepa, meios de cultura, temperatura, tempo de crescimento, e forma de obtenção são ideais para a expressão de frações com capacidade antigênica.

A relevância da escolha do meio de cultura na produção de antígenos foi demonstrada e comprovada neste trabalho quando os isolados fúngicos foram cultivados em ágar Sabouraud-dextrose. A escolha do Sabouraud-dextrose como meio de cultura, sabidamente um meio mais pobre quando comparado ao Fava-Netto, deu-se por dois motivos: a) pela excelente qualidade dos antígenos de *H. capsulatum* obtidos pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses (Freitas, 2005; Freitas et al., 2018)

empregando-se este meio de cultura, e b) pensando na escassez orçamentária de muitos laboratórios, não apenas no Brasil, mas em outros países da América do Sul.

Inicialmente pensou-se que a exemplo do observado para *H. capsulatum*, o uso de um meio de cultura mais pobre, fosse causar um estresse sobre as células fúngicas, que responderiam aumentando a expressão de proteínas, como se o ambiente “ligeiramente” mais hostil desafiasse o fungo a responder com mais intensidade para garantir sua sobrevivência. No entanto, observou-se que para todos os isolados utilizados, o uso do ágar Sabouraud-dextrose, como fonte de nutriente e desenvolvimento, causou um estresse sobre o fungo, porém não relacionado ao aumento da expressão de proteínas com atividade antigênica.

Verificamos, por microscopia óptica, que os isolados 01 e 66 de *P. lutzii* cultivados a 37°C, durante 20 dias neste meio, apresentaram grande quantidade de células com aspecto de meia lua, parede celular enrugada, retração citoplasmática, características compatíveis com degeneração celular. Apesar de não dispormos de informações publicadas relacionadas aos possíveis efeitos do ágar Sabouraud-dextrose sobre o aspecto morfológico de *Paracoccidioides* sp, nossos resultados sugerem que o isolado 66 de *P. lutzii* foi o que mais se estressou com a mudança do meio, visto que o diâmetro das leveduras foi de 19,7 μm versus 27,7 μm quando cultivado em ágar Fava-Netto modificado. Ao compararmos a dimensão das células do isolado 01 observamos que não houve relação entre o meio de cultura e o tamanho das leveduras, visto que o mesmo apresentou dimensão de 19,4 μm em ágar Fava-Netto modificado e um discreto aumento (20,5 μm) quando cultivado em ágar Sabouraud-dextrose. Já o isolado 8334 parece ter se adaptado muito bem em ambos os meios de cultura, visto que praticamente não apresentou alteração de tamanho, ou seja, 14, 0 μm e 14,2 μm para as células cultivadas em ágar Fava-Netto modificado e ágar Sabouraud-dextrose, respectivamente.

A análise micromorfologia, empregando-se azul de algodão, das células cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose demonstrou um aumento visível na esporulação das leveduras dos isolados 01 e 66, sendo possível observar a presença de células filhas de base larga e de base estreita, indicando leveduras em diferentes estágios de maturação logo com cinco (5) dias de cultivo e a presença de células catenuladas nos isolados 01 e 8334, uma organização celular pouco comum em isolados de *P. brasiliensis*. Entretanto, não podemos afirmar se a presença de células catenuladas deu-se pelo cultivo destes isolados em um meio mais pobre, ou se estas estruturas podem ser típicas de *P. lutzii*.

As observações morfológicas associadas aos resultados de imunoreatividade, por ID, sugerem que a escolha do Sabouraud-dextrose como meio de cultura, estressou as leveduras, que em resposta, aumentaram sua divisão celular direcionando a maquinaria de transcrição, provavelmente, para proteínas estruturais com baixa ou sem atividade antigênica, o que explicaria a grande quantidade de células, em contraste com a baixa performance observada no ensaio de imunodifusão dupla.

Outro ponto, que fala a favor da importância da escolha do meio de cultura visando à produção de antígenos, foi a observação de que todos os antígenos obtidos de células leveduriformes cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose apresentaram conteúdo proteico inferiores quando comparado aos antígenos obtidos nas mesmas condições, porém a partir de isolados cultivados em ágar Fava-Netto modificado. Uma possível explicação para o baixo conteúdo proteico dos antígenos obtidos em ágar Sabouraud-dextrose estaria no fato de que o amadurecimento precoce das leveduras provocou um aumento da competição por nutrientes, culminando com a morte celular e consequente liberação de proteases no meio de cultura e, portanto, diminuindo as proteínas disponíveis. Diante do exposto, pode-se inferir que a baixa concentração proteica das preparações antigênicas cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose, não permitiu que os mesmos tivessem um desempenho satisfatório, por ID, frente ao anticorpo policlonal anti-antígeno

de *P. lutzii*. Ao contrario das preparações antigênicas obtidas em ágar Fava-Netto modificado seguindo os protocolos descritos por Freitas (2005), Assis et al. (1998) e sua versão modificada, onde observou-se intensa reatividade frente ao anticorpo policlonal espécie-específico, os antígenos do isolado 01 obtidos seguindo as mesmas condições, porém obtidos em ágar Sabouraud-dextrose, apresentaram ausência de reatividade assim como diminuição na intensidade da reação das preparações antigênicas obtidas a partir dos isolados 66 e 8334.

Corroborando também, para a afirmação que o meio de cultura altera a expressão ou composição proteica a ocorrência de reatividade cruzada observada nas preparações antigênicas obtidas segundo Assis et al. (1998) em suas versões convencional e modificada, produzidas empregando-se o isolado 8334 cultivado em ágar Sabouraud-dextrose, frente ao anticorpo policlonal anti-antígeno de *H. capsulatum*, fenômeno que não ocorreu quando antígenos produzidos em ágar Fava-Netto-modificado foram avaliados frente ao anticorpo policlonal heterólogo.

O tempo de cultivo é outro ponto importante que pode ter relação direta com a qualidade da preparação antigênica obtida. Sabe-se que para a obtenção de filtrado de *P. brasiliensis*, sete dias de cultura já são suficientes para a secreção da molécula de 43 kDa, permitindo portanto, a obtenção de preparações antigênicas de qualidade (Camargo et al., 1988; Camargo et al., 2003). Por outro lado, para *cell free antigen*, quantidades expressivas da molécula de 43 kDa podem ser obtidas a partir do terceiro dia de cultivo (Camargo et al., 1991). Já segundo Assis et al. (1989) quantidades expressivas das moléculas de 43 e 70 kDa tanto em filtrado de cultura como em CSSEPC de *P. brasiliensis* podem ser observadas até o 20º dia de cultura. Entretanto, deve-se salientar, como mencionado anteriormente, que pouco se sabe sobre o comportamento de *P. lutzii* em cultura e da sua composição antigênica. Da mesma forma, pouco se sabe sobre quais e quantas são as proteínas com capacidade antigênica e quais frações são ou

poderiam ser consideradas marcadores sorológicos da PCM causada por *P. lutzii*.

Queiroz Júnior et al. (2014) relataram a avaliação da composição antigênica de três amostras fúngicas isoladas de pacientes residentes no estado do Mato Grosso e identificadas molecularmente como sendo *P. lutzii*. Para tanto, os autores seguiram o mesmo protocolo adotado para a produção de antígeno padrão de *P. brasiliensis*, desta forma, os isolados fúngicos foram cultivados em caldo Fava-Netto, durante sete dias e posteriormente avaliados, por ID, frente aos soros dos pacientes dos quais *P. lutzii* foram isolados. Surpreendentemente, apenas uma amostra de soro apresentou reatividade frente ao antígeno produzido a partir de “seu próprio” isolado fúngico. Diante destes resultados, nos perguntamos será que o tempo de cultivo foi adequado para a expressão de componentes com potencial antigênico para todos os isolados deste estudo? Em relação à expressão de frações antigênicas, será que *P. lutzii* se comporta da mesma forma que *P. brasiliensis*? Neste sentido, salientamos que apesar do fato destes isolados terem sido identificados como pertencente ao gênero *Paracoccidioides*, cada espécie apresenta características e comportamento específicos, incluindo o tempo correto para a produção de proteínas com potencial antigênico, portanto, a nosso ver, a realização de uma curva de crescimento buscando a determinação do tempo ideal de cultivo visando a obtenção de proteínas antigênicas seria fundamental, no trabalho desenvolvido por Queiroz-Júnior et al. (2014). Fato semelhante foi observado por Gegembauer et al. (2014) que também adotaram o protocolo utilizado para a produção de antígeno de referência de *P. brasiliensis* para a obtenção de filtrado de cultura de *P. lutzii*, relatando baixo desempenho do mesmo.

Neste estudo, optamos, baseados no trabalho de Assis et al. (1989), em manter os isolados de *P. lutzii* por 5, 10 e 20 dias em cultura, sendo possível observar, para antígenos 10 e 20 vezes concentrados obtidos em ágar Fava-Netto, que quanto maior o tempo de cultura, maior a

concentração proteica, e portanto, melhor o desempenho, por ID, frente ao anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. lutzii*. Apesar do baixo desempenho, por ID, esta relação também foi observada para a maioria das preparações antigênicas obtidas em ágar Sabouraud-dextrose.

Além do meio de cultura e do tempo de cultivo, o tipo de antígeno, ou seja, exoantígenos (filtrado de cultura, metabólico), somático, de parede (*cell free antigen*, CSSEPC), purificado (gp43, gp70, p27) ou recombinante e da metodologia utilizada para a obtenção da preparação antigênica merecem especial atenção.

Neste sentido, Gegembauer et al. (2014) empregaram dois tipos de exoantígenos (filtrado de cultura e filtrado de cultura precipitado) e antígeno de parede (*cell free antigen*) obtidos a partir da amostra EPM 208 de *P. lutzii* para a avaliação de 17 amostras de soro de pacientes com PCM comprovada, residentes no estado de Mato Grosso, porém com ausência de reatividade frente ao antígeno de referência e a molécula de 43 kDa de *P. brasiliensis*. Para tanto, os autores utilizaram metodologias distintas para a obtenção do filtrado de cultura e antígeno precipitado com ácido tricloroacético, ambos obtidos a partir de leveduras cultivadas durante sete (7) dias a 37°C, sob agitação constante em caldo Fava-Netto. O *cell free antigen* obtido a partir de leveduras cultivadas durante três (3) dias, a 37°C em fase estacionária, em ágar Fava-Netto. Os autores observaram que 58,8% (10/17) das amostras apresentaram reatividade frente a filtrado de cultura e apenas 17,6% (3/17) reconheceram o antígeno precipitado com ácido tricloroacético, observando ainda que para ambas as preparações antigênicas, as linhas de precipitação formadas eram de fraca intensidade. Por outro lado, demonstram que 100% dos soros avaliados apresentaram reatividade frente ao *cell free antigen*. A análise do perfil eletroforético das preparações antigênicas obtidas em caldo Fava-Netto, revelou a presença de uma única fração com massa molecular aparente entre 50 a 60 kDa para o filtrado de cultura, por outro lado, revelou um perfil proteico complexo para o *cell free antigen*, com proteínas migrando entre 20 e 160 kDa.

Morais (2017) avaliou o perfil antigênico de duas preparações distintas a saber: filtrado de cultura e *cell free antigen*, obtidas a partir dos isolados 01 e 66 de *P. lutzii* e cultivadas em caldo ou ágar Fava-Netto, respectivamente. Segundo a autora, a análise do perfil eletroforético dos filtrados de cultura obtidos do isolados 01 e 66 revelaram a presença de cinco (05) frações com massa molecular aparente entre 20 a 81 kDa. Por outro lado, o perfil eletroforético dos *cell free antigens* permitiu a visualização de 14 frações migrando entre 19 a 111 kDa para o antígeno obtido a partir do isolado 01, e de 14 frações migrando entre 20 a 85 kDa para o antígeno obtido do isolado 66. Entretanto, contrariando o observado por Gegembauer et al (2012), Morais (2017) considerou que os filtrados de cultura obtidos de ambos os isolados de *P. lutzii*, apresentaram melhor desempenho no ensaio de ID, quando comparado aos *cell free antigens*.

No presente estudo, apesar dos antígenos produzidos derivarem da extração de proteínas solúveis presente na parede celular de *Paracoccidioides* sp, empregamos metodologias distintas para obtê-los, observando diferença entre o número de frações na dependência da metodologia utilizada para a obtenção de antígenos de *P. lutzii*. Por SDS-PAGE, foi possível verificar que as preparações antigênicas obtidas em ambos os meios de cultura, ou seja, Fava-Netto modificado e Sabouraud-dextrose, segundo a metodologia proposta por Freitas (2005) apresentaram menor número de frações proteicas quando comparadas as preparações antigênicas obtidas segundo Assis et al. (1989) e sua versão modificada. Uma possível explicação para esta observação seria o fato dos antígenos obtidos segundo Freitas (2005) não terem sofrido ação mecânica para a extração das proteínas solúveis presentes na parede celular de *P. lutzii*, visto que após a adição de solução aquosa de thimerosal-borato, as culturas permaneceram em repouso por 24 horas; enquanto no protocolo descrito por Assis et al. (1989) e em sua versão modificada a extração das proteínas solúveis, foi realizada por meio de agitação em vortex por cinco minutos, ou seja, houve uma ação mecânica, que possivelmente contribuiu para a extração de maior quantidade de componentes antigênicos.

Observamos que para os antígenos obtidos a partir de leveduras cultivadas em ágar Fava-Netto modificado, seguindo os três protocolos descritos, o número de frações proteicas não interferiu no padrão de reatividade, por ID, do anticorpo policlonal anti-antígeno de *P.lutzii*, visto que o mesmo apresentou reatividade frente aos antígenos cultivados por 5, 10 e 20 dias, 10 e 20 vezes concentrados. Por outro lado, observou-se que independentemente do número de frações antigênicas, todos os antígenos obtidos em ágar Sabouraud-dextrose a partir do isolados 01 apresentaram ausência de reatividade frente ao anticorpo policlonal espécie-específico, enquanto apenas os antígenos obtidos a partir dos isolados 66 e 8334, cultivados durante 10 e 20 dias, 10 e 20 vezes concentrados, segundo Freitas (2005) apresentaram reatividade de fraca intensidade frente ao anticorpo policlonal. Já os antígenos obtidos a partir dos isolados 66 e 8334 segundo Assis et al. (1989) e sua versão modificada apresentaram independentemente da intensidade da linha de precipitação, reatividade frente ao anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. lutzii*.

Em relação ao filtrado de cultura, preparação antigênica utilizada há seis anos no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses nos ensaios imunoenzimáticos, obtido do isolado 113 de *P. brasiliensis* cultivado em caldo NGTA (neopetona-glicose-tiamina-aspargina), a 37°C, por 20 dias sob agitação constante (50 rpm), verificou-se por SDS-PAGE, que o mesmo apresentou majoritariamente as frações de 43 e 70 kDa. Por outro lado, antígenos obtidos a partir do mesmo isolado empregando-se o protocolo descrito por Freitas (2005), apresentaram um padrão eletroforético de proteínas/glicoproteínas distinto aquele observado para o filtrado de cultura, sendo possível visualizar frações com massa molecular aparente variando entre 14 a 80 kDa, e entre estas, as moléculas de 43 e 70 kDa.

Esta grande diferença observada na composição antigênica entre ambos os antígenos, podem certamente explicar a diferença no padrão sorológico observado para as cinco (05) amostras de soro de pacientes com PCM comprovada, oriundas do estado do Mato Grosso do Sul, que foram

enviadas ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses com histórico de ausência de reatividade frente ao filtrado de cultura do isolado 113. A reavaliação destas amostras, por ID, empregando o antígeno Th 113 7d 10x [] (FN), revelou que duas (2) das cinco (5) amostras apresentaram reatividade para *P. brasiliensis*, contrariando o histórico sorológico de ausência de reatividade. Além disto, uma destas amostras quando titulada, apresentou níveis de anticorpos circulantes de 1:8 e a outra de 1:512, consideradas respectivamente, segundo Moreto (2010) como pacientes com baixo e alto título de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*. Quando este grupo de amostras foi avaliado empregando-se um ensaio mais sensível, ou seja, *immunoblotting*, observamos que somente uma amostra (10%) permaneceu com ausência de reatividade e que 4 (80%) apresentaram reatividade para *P. brasiliensis* sendo que três amostras reconheceram a gp43 e uma (1) reagiu concomitantemente frente as frações de 43 e 70 kDa.

O conjunto de resultados obtidos na reavaliação das amostras demonstra claramente a importância da escolha do tipo de antígeno e da metodologia empregada. Filtrados de cultura apresentam em sua composição produtos do metabolismo fúngico produzidos durante o período que estiver em cultura. Por outro lado, o emprego de solução-borato thimerosal (1.5000) como preconizado por Freitas (2005) promove a extração de proteínas solúveis ligadas à parede celular de *P. brasiliensis*, o que explicaria a grande diferença, por SDS-PAGE, no perfil protéico/glicoprotéico de ambas as preparações antigênicas conferindo, portanto, maior sensibilidade para os testes utilizados.

Outros fatores que podem contribuir para a ocorrência de resultados falso negativos podem estar relacionadas ao próprio paciente e incluem a forma clínica da doença e o *status* imunológico do mesmo. Sabe-se que indivíduos que encontram-se: no início do processo infeccioso, na vigência de terapia antifúngica ou em cura clínica ou sorológica, podem não apresentar quantidades suficientes de anticorpos circulantes, impedindo assim que os mesmos sejam detectados por métodos sorológicos,

especialmente aqueles menos sensíveis (Do Valle et al, 2001). Além disso, deve-se também levar em consideração, o fato de que imunoglobulinas da classe IgG2 não são precipitantes e por essa razão, pacientes que apresentam predomínio da mesma tendem a não apresentar reatividade sorológica quando avaliados empregando-se ensaios de precipitação (Neves et al, 2003).

Deve-se considerar ainda, que pacientes imunocomprometidos, pelo uso de drogas imunossupressoras, doenças imunes e pacientes com HIV-AIDS podem não apresentar uma resposta humoral satisfatória e detectável em testes sorológicos (Mendes et al, 2017). No caso específico da PCM, Bellissimo-Rodrigues et al (2010) demonstraram e comprovaram que pacientes com PCM associada à AIDS, apresentam uma resposta imune humoral menos efetiva, provavelmente associada a uma disfunção das células B devido a infecção pelo HIV quando comparados aos pacientes portadores de PCM endêmica, corroborando também com o já descrito por Marques et al. (2000) e Paniago et al. (2005) em relação a proporção significativa de resultados falso negativos em testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis*

Portanto, é imprescindível, a averiguação, se a causa dos resultados falso negativos além daqueles citados até o momento, não estariam associados também ao antecedente epidemiológico do paciente, ou seja, procedência remota e atual, atividade laboral; a estabilidade ou “tempo de prateleira” das preparações antigênicas; a fase pré-analítica dos ensaios que incluem principalmente as condições de transporte e armazenamento das amostras biológicas, a um diagnóstico micológico incorreto ou até mesmo a uma hipótese diagnóstica equivocada, uma vez que a PCM pode ser confundida com outras doenças, e ao ensaio sorológico escolhido para a realização da pesquisa de anticorpos circulantes.

Apesar da visualização do agente etiológico da PCM em exames micológicos diretos ou através de avaliação histopatológica, ser altamente

sugestiva do estabelecimento da doença, do encontro de estruturas fúngicas com parede celular dupla birrefringente e com aspecto de “roda de leme” ser patognomônico para o diagnóstico da micose, o diagnóstico de certeza da doença, deriva do isolamento, cultura e posterior reversão da fase de micélio para levedura. Entretanto, sabe-se que este procedimento além de demorado, raramente é realizado. Desta forma, na maioria dos casos, os ensaios sorológicos representam a única evidência “micológica” da doença. Neste sentido, fica evidente a importância da escolha do ensaio a ser utilizado, lembrando que a sensibilidade e especificidade das técnicas sorológicas encontram-se diretamente relacionadas a qualidade da preparação antigênica utilizada.

Gegembauer et al. (2014) utilizaram o ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose para classificar, amostras de soro de pacientes com PCM comprovada, entre pacientes com PCM por *P. brasiliensis* daqueles com PCM por *P. lutzii*. Inicialmente, as 89 amostras de soro (55 do estado de Mato Grosso e 34 do estado de Mato Grosso do Sul), foram avaliadas, por ID, frente ao antígeno de referência de *P. brasiliensis* e no caso de ausência de reatividade, as mesmas foram avaliadas frente a gp43. Desta forma, 72 (59 reagentes frente a antígeno de referência e 13 reagentes para gp43) amostras de soro foram classificadas como pertencentes a pacientes com PCM por *P. brasiliensis*. Os 17 soros que não apresentaram reatividade frente a ambas as preparações antigênicas de *P. brasiliensis* foram classificados como amostras de soro pertencentes a pacientes com PCM por *P. lutzii*. Entretanto existe uma questão que não ficou bem esclarecida no trabalho de Gegembauer et al. (2014), ou seja, as 72 amostras com reatividade para *P. brasiliensis* foram avaliadas frente a antígeno de *P. lutzii*?. A nosso ver, os autores não levaram em consideração o fato de *P. lutzii* apresentar uma composição antigênica complexa, que inclui inclusive, componentes presentes em *P. brasiliensis*. Esta avaliação, seria de vital importância para comprovar a ocorrência ou não de reatividade cruzada entre ambas as espécies, como demonstrado por Machado et al. (2013). Além disso, nos parece que o grupo, desconsiderou todos os fatores que

podem levar a errônea obtenção de resultados falso negativos, já apresentados anteriormente nesta discussão.

Julgamos extremamente importante comentar que temos plena consciência que este trabalho apresenta um grande vizez. Pois ao contrário do que imaginávamos, não conseguimos estabelecer parcerias com os pesquisadores que afirmam ter amostras de soro de pacientes com PCM por *P. lutzii*. Entretanto, conseguimos estabelecer parcerias com pesquisadores de regiões consideradas de alta endemicidade para esta espécie de *Paracoccidioides*, e portanto, doação de amostras de soro de pacientes residentes nos estados de Mato Grosso do Sul e Rondônia. Assim, visando minimizar os danos causados ao trabalho, utilizamos como soro controle positivo, soro de coelho imunizado com antígeno de *P. lutzii*.

Contrariamente ao observado por Gegembauer et al. (2014), ao avaliarmos, por ID, amostras de soro de pacientes com PCM confirmada ou com suspeita clínica da doença, oriundos tanto de região endêmica para *P. brasiliensis* como de região endêmica para *P. lutzii*, não conseguimos discriminar sorologicamente pacientes com PCM por *P. brasiliensis* daqueles com PCM por *P. lutzii*, uma vez que observamos reatividade cruzada entre ambas as espécies de *Paracoccidioides* sp.

Neste sentido ao avaliarmos 24 amostras de soro de pacientes com PCM comprovada, residentes no estado de São Paulo, região sabidamente endêmica para *P. brasiliensis* e que apresentavam histórico de reatividade sorológica, por ID, frente a filtrado de cultura da amostra B-339 de *P. brasiliensis*, verificamos alto índice de reatividade cruzada frente aos antígenos de *P. lutzii* obtidos neste trabalho, a saber: 87,5% para Th 01 20d 10x [] (FN), 66,7% Th 66 5d 20x [] (FN), 58,3% para Th 66 10d 20x [] (SAB), 83,3% para Th 8334 20d 20x [] (FN), e 87,5% para CSSEPC-M 01 20d (FN).

A reatividade cruzada entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, também foi observada ao avaliarmos amostras de soro de pacientes residentes nos

estados de Rondônia e Mato Grosso do Sul, regiões potencialmente endêmicas para *P. lutzii*. Verificamos que entre as 21 amostras de soro obtidas de pacientes de Rondônia, todos sem histórico de avaliação sorológica, 57,14% (12/21) apresentaram, por ID, reatividade frente a todas as preparações antigênicas estudadas, ou seja, *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. A avaliação, das cinco amostras de soro provenientes do estado do Mato Grosso do Sul, revelou que apenas uma amostra apresentou reatividade frente a todos os antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* e uma única amostra apresentou reatividade tanto para o antígeno Th 339 7d 10x [] (FN) como para o Th 01 20d 10x [] (FN), obtidos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, respectivamente.

As amostras de soro provenientes de Rondônia e do Mato Grosso do Sul, também foram avaliadas pela preparação antigênica produzida por Gegembauer et al. (2014), ou seja, *cell free antigen* obtida a partir do isolado EMP 208 de *P. lutzii*, considerada neste trabalho como antígeno de referência desta espécie. Verificamos para as amostras de Rondônia, que o percentual de reatividade frente ao antígeno de referência de *P. lutzii* quando comparado ao antígeno obtido a partir da amostra 113 de *P. brasiliensis* foi semelhante (80,05% [17/21] versus 76,19% [16/21]), porém, superior ao antígeno obtido a partir da amostra B-339 de *P. brasiliensis* (80,05% [17/21] versus 61,90% [13/21]). Em relação as amostras do Mato Grosso do Sul, das cinco amostras avaliadas apenas uma apresentou reatividade para *P. brasiliensis* e para todos os antígenos de *P. lutzii*, incluindo o antígeno produzido por Gegembauer et al. (2014). O conjunto de resultados demonstra de forma inequívoca que o antígeno de referência mesmo apresentando um melhor desempenho comparado ao antígeno Th B-339 7d 10x [] (FN), não há como discriminar sorologicamente pacientes com PCM por *P. lutzii* daqueles com PCM por *P. brasiliensis*.

Apesar de nossos resultados discordarem com Gegembauer et al. (2014), corroboram com Pereira (2015) e Morais (2017). Pereira (2015) ao avaliar a distribuição geográfica, epidemiológica e clínica dos casos de PCM

causados por *P. brasiliensis* e *P. lutzii* no estado do Mato Grosso do Sul, empregando a preparação antigênica obtida por Gegembauer et al. (2014), verificou que das 16 amostras de soro de pacientes com PCM por *P. lutzii*, 5 (31,3%) foram reagentes ao antígeno de referência de *P. brasiliensis*. Por outro lado, ao avaliar as 65 amostras de soro de pacientes com PCM causada por *P. brasiliensis*, verificaram que 14 (21,5%) foram reagentes frente ao referido antígeno, caracterizando, desta forma, a ocorrência de reatividade cruzada entre as espécies

Morais (2017) também relatou a ocorrência de reatividade cruzada entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii* ao avaliar 14 amostras de soro classificados como casos prováveis (8 amostras) e possíveis (6 amostras) de PCM por *P. lutzii* e 10 amostras de soro de pacientes com PCM por *P. brasiliensis*. Segundo a autora, todos os soros classificados como casos possíveis para PCM por *P. lutzii* apresentaram reatividade cruzada frente ao exoantígeno de *P. brasiliensis* e 50 % dos soros dos pacientes com PCM por *P. brasiliensis* reconheceram o exoantígeno obtido a partir do isolado 66 de *P. lutzii*. Por outro lado, a ocorrência de reatividade cruzada não foi observada quando as amostras classificadas como prováveis por *P. lutzii* foram avaliadas frente ao exoantígeno de *P. brasiliensis*.

Entretanto, a reatividade cruzada entre as espécies crípticas de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, já havia sido descrita por Lenhard-Vidal (2013) e Machado et al. (2013).

Lenhard-Vidal (2013) avaliaram, por ID, 35 amostras de soro de pacientes com PCM comprovada residentes nas regiões norte e oeste do estado do Paraná frente a *cell free antigens* obtidos de isolados de duas espécies crípticas de *P. brasiliensis* (B-339/S1 e IFM 54649/S2) e um isolado de *P. lutzii* (Pb01-like), verificando que 48,6% (17/35) das amostras reagiram frente as três preparações antigênicas.

Machado et al. (2013) utilizaram filtrado de cultura obtido de quatro isolados distintos de *Paracoccidioides* sp: o isolado EPM 83 *P. brasiliensis*,

espécie críptica S3 e os isolados 01, 66 e 8334 de *P. lutzii* para avaliar, por ID, 71 amostras de soro de pacientes com PCM comprovada, porém residentes em regiões geográficas distintas: Sudeste (Botucatu e Jundiaí) e Centro-Oeste. Todos os grupos foram compostos por amostras de soro reagentes e não reagentes para *P. brasiliensis* frente ao antígeno padrão desta espécie. Para o grupo de Botucatu, verificaram que das 10 amostras com histórico de reatividade, 100 % reagiu frente ao antígeno EPM 83, 80% ao antígeno 66 e 80% ao antígeno 8334, não foi observado reatividade para o antígeno 01; para as amostras sem histórico de reatividade sorológica, observaram reatividade apenas para o antígeno EPM 83. A análise das amostras de soro de Jundiaí, com histórico de reatividade, revelou 70%, 30%, 20% e 20%, para EPM 83, 66, 8334 e 01, respectivamente; para aquelas que não apresentavam histórico de reatividade, observou-se 20%, 30%, 30% e 30%, respectivamente para EPM 83, 66, 8334 e 01. Finalmente as amostras do Centro-Oeste revelaram 36%, 27%, 36% e ausência de reatividade aos antígenos EPM 83, 66, 8334 e 01 respectivamente, para as amostras de soro com histórico prévio de reatividade sorológica. As amostras que não apresentavam histórico de reatividade sorológica mantiveram-se neste *status*, visto que não reconheceram nenhuma das preparações antigênicas avaliadas pelo grupo. Como conclusão, os autores pontuam a dificuldade na produção de preparações antigênicas a serem utilizadas nos ensaios sorológicos dos pacientes residentes na região Centro-Oeste.

Interessante comentar, que tanto Lenhard-Vidal (2013) como Machado et al. (2013) verificaram reatividade cruzada de *P. brasiliensis* (S1) com as espécies crípticas S2 e S3, mostrando que espécies pertencentes ao gênero *Paracoccidioides* certamente compartilham componentes antigênicos.

A nosso ver, a ocorrência de reatividade cruzada, por ID, entre ambas as espécies, nos permite afirmar com grande grau de certeza a impossibilidade de discriminar sorologicamente o processo infeccioso

causado por *P. brasiliensis* daquele causado por *P. lutzii*. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho, em conjunto aos resultados apresentados por Lenhard-Vidal (2013), Machado et al. (2013), Pereira (2015) e Morais (2017) vão contra Gegembauer et al. (2014) que afirmam que amostras de soro de pacientes com PCM infectados com *P. brasiliensis* não reconhecem antígenos de *P. lutzii*, no entanto, amostras de soro de pacientes infectados com *P. lutzii* reconhecem tanto os antígenos de *P. lutzii* como de *P. brasiliensis*.

É importante comentar, que a despeito da alta especificidade do ensaio de imunodifusão dupla, observamos que o emprego de preparações antigênicas distintas acarretam em respostas sorológicas distintas.

Tomando como exemplo a avaliação das 21 amostras de Rondônia pode-se observar que do total de amostras avaliadas frente às preparações antigênicas de *P. brasiliensis*, 16 (76,19%) foram reagentes ao antígeno Th 113 7d 10 x[] (FN) e 13 (61,90%) para Th 339 7d 10 x[] (FN). O padrão de reatividade destas amostras frente aos antígenos de *P. lutzii*, revelou que 18 (85,71%) amostras reconheceram Th 01 20d 10x[] (FN), 16 (76,19%) Th 8334 10d 20x[] (FN) e 17 (80,05%) o antígeno de referência para *P. lutzii*. Esta diferença fica ainda mais evidente com a determinação do título de anticorpos circulantes. A título de ilustração, apresentamos a titulação de duas amostras de soro de pacientes de Rondônia que apresentaram título de anticorpos circulantes superiores para *P. lutzii* do que aqueles observados para *P. brasiliensis* (AM 7RO 1:128 versus 1:64 e AM 15 RO 1:256 versus 1:16). Estes resultados reforçam claramente a tese sobre a necessidade da padronização de antígenos de *Paracoccidioides* sp, a fim de conferirmos maior índice de acurácia nos ensaios sorológicos, além de possibilitarmos a reprodutibilidade entre os laboratórios.

A importância dos testes imunoenzimáticos, como ELISA, *immunoblotting* e Dot-ELISA visando conferir maior acurácia no imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose por *P. brasiliensis*, encontra-se

bem documentada (Mendes-Giannini et al., 1984; Mendes-Giannini et al., 1989; Blotta e Camargo, 1993; Martins et al., 1997; Díez et al., 2003; Albuquerque et al., 2005; Silva, 2005; Correa et al., 2007; Silva et al., 2008; Fernandes et al., 2011; Passos, 2012; Bertoni et al., 2012; Kamikawa et al., 2017).

Entretanto, deve-se salientar que a avaliação da imunidade humoral relacionada aos pacientes com PCM por *P. lutzii*, empregando-se métodos imunoenzimáticos encontra-se em “fase embrionária”. Neste sentido, os poucos trabalhos existentes e que utilizaram a metodologia de *immunoblotting* não identificaram até o presente momento qual ou quais seriam a (s) fração (ões) imunodominantes de *P. lutzii*.

Gegembauer et al. (2014) afirmaram ter conseguido diferenciar sorologicamente, por ELISA-indireto e *immunoblotting* empregando *cell free antigen* de *P. lutzii*, pacientes com PCM por *P. brasiliensis* daqueles com PCM por *P. lutzii*, uma vez que, os resultados demonstraram que soros dos pacientes com PCM por *P. lutzii* apresentaram títulos superiores de anticorpos circulantes aos dos pacientes com PCM por *P. brasiliensis*. Segundo os autores, a reatividade cruzada foi extremamente baixa frente as amostras de soro de pacientes com histoplasmose, aspergilose e esporotricose bem como a amostras de soro de indivíduos saudáveis, não interferindo com as interpretações do sistema principal. Em contra partida, quando esses mesmos grupos de soros foram avaliados contra o exoantígeno de referência de *P. brasiliensis*, os soros de pacientes com PCM por *P. brasiliensis* apresentaram títulos sorológicos bem maiores do que os obtidos por soros de pacientes com PCM por *P. lutzii*. Em relação ao *immunoblotting* os autores afirmaram que a distinção entre pacientes de PCM por *P. lutzii* daqueles com PCM por *P. brasiliensis*, foi possível, pois somente soros de pacientes com PCM por *P. lutzii* foram capaz de reconhecer o *cell free antigen* de *P. lutzii*; evidenciando ainda, que soros de pacientes com PCM por *P. brasiliensis* não reconheceram o *cell free antigen* de *P. lutzii*.

Nunes (2014) empregou a metodologia de *immunoblotting* para reavaliar amostras de soro de pacientes com PCM comprovada ou com suspeita clínica da doença, residentes no estado do Pará, e que apresentaram, por ID, ausência de reatividade frente ao antígeno de referência para *P. brasiliensis*. Desta forma, 133 amostras foram avaliadas frente a filtrados de cultura obtidos a partir de quatro isolados fúngicos distintos: B-339 de *P. brasiliensis*, Pb 01-like cepa de referência de *P. lutzii*, IEC-2005 e IEC 1744, ambas isoladas de pacientes residentes no estado do Pará e classificadas como *P. lutzii*. Do total de amostras avaliadas, verificou-se que 130 (97,74%) apresentaram reatividade frente as cepas de referência tanto de *P. brasiliensis* como de *P. lutzii*. Já as preparações antigênicas “regionais” obtidas a partir dos isolados IEC 2005 e IEC 1744, foram reconhecidas por 132 (99,2%) soros. Neste trabalho, a autora demonstra claramente a importância da utilização de ensaios mais sensíveis visando o imunodiagnóstico da PCM, deixando evidente que a taxa de resultado falso negativo, seria altíssima caso estas amostras fossem avaliadas apenas através do ensaio de imunodifusão, visto que das 133 amostras analisadas apenas 39 (29,3%) apresentaram reatividade para *P. brasiliensis*.

Durante a condução deste trabalho, utilizamos várias vezes a metodologia de *immunoblotting* (IB). Ao analisarmos os resultados sorológicos das amostras de soro de Rondônia, verificamos que três apresentaram reatividade apenas frente as preparações antigênicas de *P. lutzii*. Seguindo o raciocínio de Gegembauer et al. (2014) e posteriormente adotado por Morais (2017), poderíamos concluir, que estes pacientes apresentavam PCM por *P. lutzii*. Entretanto, optamos por avaliar estas três amostras, por IB, frente a filtrado de cultura de *P. brasiliensis*. Verificamos, que uma amostra apresentou reatividade frente à molécula de 43 kDa sugerindo que o paciente tenha entrado em contato com *P. brasiliensis* ou encontra-se em cura clínica e/ou sorológica; uma frente as moléculas de 43 e 70 kDa, indicando que o paciente apresenta doença ativa e uma apresentou ausência de reatividade. Assim, a avaliação destas amostras, por IB, e a análise criteriosa dos resultados evitou que estes dois pacientes

fossem erroneamente classificados como amostras de pacientes com PCM causada por *P. lutzii*. Infelizmente, o médico nos informou que não houve o isolamento de *Paracoccidioides* destes pacientes, pois certamente uma avaliação molecular seria de vital importância para a determinação da espécie causadora da doença.

A importância da adoção de uma técnica mais sensível foi mais uma vez comprovada frente as cinco (5) amostras de soro de pacientes com PCM comprovada e provenientes de região potencialmente endêmica, Mato Grosso do Sul, para *P. lutzii*. Neste caso, todas as amostras encaminhadas ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, apresentavam histórico de ausência de reatividade frente a *P. brasiliensis*, porém, todas apresentavam avaliação histopatológica compatível com processo infeccioso causado por *Paracoccidioides* sp. Na reavaliação destas amostras, verificamos que duas amostras (J e L) reconheceram o antígeno Th 113 7d 10x [] (FN) de *P. brasiliensis*, enquanto que as outras três (M, N e O) permaneceram não reagentes. A avaliação, por IB, revelou que das cinco (5) amostras avaliadas, quatro (J, L, M e O) foram reagentes tanto para *P. brasiliensis* como para *P. lutzii* reafirmando a reatividade cruzada entre as espécies, e conseqüentemente a impossibilidade de discriminar sorologicamente o agente causal da doença nestes pacientes.

Mais uma vez, os resultados gerados neste trabalho, contrariam a afirmação de Gegembauer et al. (2014). Não podemos afirmar que as amostras de soro provenientes de Rondônia, que apresentaram reatividade de 80,05% para o antígeno de referência de *P. lutzii* e de 85,71% para os antígenos Th 01 20d 10x [], Th 66 5d 20x [] e CFA-M 01 20d) correspondam a amostras de pacientes infectados por *P. lutzii*, visto que 76,19% das amostras reconheceram Th 113 7d 10x [] (FN) de *P. brasiliensis*. Verificamos, por IB, que esta reatividade aumentou de forma expressiva (85,71%), sendo que nove pacientes (42,85%) apresentaram reatividade frente a molécula de 43 kDa, nove (42,85%) frente as moléculas

de 43 e 70 kDa e apenas três (14,28%) não apresentaram reatividade a *P. brasiliensis*

Em relação a amostra que apresentou ausência de reatividade para *P. brasiliensis*, tanto por ID como IB, porém reatividade, por ID, frente aos antígenos de *P. lutzii*, optamos por avaliá-la, por IB, frente aos antígenos Th 01 20d 10x [] (FN) e CSSEPC-M 01 20d (FN) de *P. lutzii*, mesmo não conhecendo o padrão de reatividade dos pacientes infectados por *P. lutzii*. Verificamos, que esta amostra reconheceu de forma específica a fração de 60 kDa presente em ambas as preparações antigênicas. Observamos ainda, que esta fração também foi reconhecida pelo anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. lutzii*. Entretanto, nos chamou a atenção o fato desta fração ter sido igualmente reconhecida por duas amostras (5RO e 15RO) que apresentaram reatividade, por ID, frente a todas as preparações antigênicas de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* avaliadas neste trabalho, bem como por uma amostra de soro de paciente de região endêmica para *P. brasiliensis*, e com reatividade sorológica para esta espécie de *Paracoccidioides*. Diante destes resultados, não podemos afirmar que a molécula de 60 kDa seja específica de *P. lutzii*, mas podemos sugerir que a mesma seja uma das moléculas responsáveis pela reatividade cruzada entre as espécies, especialmente após termos identificado, por SDS-PAGE, que a fração de 60 kDa é comum a ambas as espécies. Desta forma podemos “especular”, porém não afirmar, a “possibilidade” deste paciente enquadrar-se no *status* de caso possível ou suspeito de PCM por *P. lutzii*. Entretanto, esta certeza só seria possível por meio de uma avaliação molecular.

Diante dos resultados obtidos nos ensaios de IB, não há, em razão da grande variação de frações antigênicas reconhecidas e pela variabilidade no padrão de respostas observadas entre os pacientes, como supor, neste momento e com essas avaliações, quais outras proteínas estão envolvidas na reatividade cruzada e quais são exclusivas de *P. lutzii*. Neste sentido, a única forma de identificar tais frações e caracterizar por completo os

determinantes antigênicos de *P. lutzii* é a avaliação sorológica de amostras de pacientes com PCM comprovada pela respectiva espécie.

Entretanto como já mencionado anteriormente, a caracterização molecular do fungo é o único meio de se determinar a espécie causadora da PCM e para tanto se faz necessário o isolamento do patógeno ou ainda a extração de material genético de *Paracoccidioides* sp de biópsia avaliando-se tecido a fresco ou de material incluído em parafina. Tais procedimentos enfrentam dificuldades, pois o isolamento fúngico infelizmente não é realizado em todos os casos e a biópsia é um método invasivo, e se o espécime não for acondicionado em condições próprias para análise molecular, como por exemplo, fixado em acetona para análise a fresco ou formalina a 10% para o processamento histológico, a chance de extração e amplificação do DNA diminuem, assim como a possibilidade de identificação. Além disso, mesmo que todo esse processo seja feito, a caracterização molecular de isolados fungicos, não está disponível no Sistema Único de Saúde e é somente realizado em casos determinados em parceria de hospitais com universidades.

Buccheri et al., (2018) comprovam a complexidade antigênica presente no gênero *Paracoccidioides* sp e alertam para a necessidade de criteriosa interpretação dos resultados gerados, ilustrando também a relevância da abordagem molecular. Os autores relataram o caso de um jovem de 16 anos, com a forma aguda de PCM, residente na cidade de Itapeverica da Serra. Entretanto a avaliação sorológica frente a filtrado de cultura de *P. brasiliensis* apresentou ausência de reatividade. Pelo fato do paciente apresentar avaliação histopatológica sugestiva para *Paracoccidioides* sp solicitou-se sorologia para *P. lutzii*. A pesquisa de anticorpos circulantes nesta segunda amostra confirmou ausência de reatividade para *P. brasiliensis* e reatividade (1:256) frente ao *cell free antigen* de *P. lutzii*. De posse destes resultados, a amostra foi também avaliada, por *immunoblotting*, frente a filtrado de cultura obtido do isolado 113 de *P. brasiliensis* e frente ao *cell free antigen* de *P. lutzii*, revelando

reconhecimento de forte intensidade para as frações de 43 e 70 kDa de *P. brasiliensis* e o reconhecimento de múltiplas frações, entre 26 a 115 kDa, de *P. lutzii*. Intrigados com estes resultados, os autores realizaram o ensaio de semi nested PCR. A identificação da espécie como *P. brasiliensis* foi confirmada por sequenciamento dos produtos de amplificação. A sequência do paciente mostrou 98% de identidade quando comparada com as sequências de gp43 de *P. brasiliensis* disponíveis no GenBank. Desta forma, a avaliação molecular demonstrou que apesar dos ensaios sorológicos demonstrarem resultados que levariam a interpretar o caso como sendo PCM causa por *P. lutzii*, tratava-se, na verdade, de um paciente infectado por *P. brasiliensis*.

Até pouco tempo, quando discutia-se especificamente a resposta imune humoral, e portanto a qualidade das preparações antigênicas, diversos autores, preconizavam que um bom antígeno de *P. brasiliensis*, visando o imunodiagnóstico da doença, deveria conter em sua composição a molécula de 43 kDa (Camargo e Franco, 2000; Vicentini, 2008; Camargo, 2008). Neste sentido, o filtrado de cultura obtido da cepa B-339 de *P. brasiliensis* tem sido a preparação antigênica mais utilizada pelos laboratórios de mico-sorologia, sendo que sua utilização justifica-se pelo fato desta cepa expressar e secretar grandes quantidades de gp43 (Camargo et al., 1988; Del Negro et al. 1995; Camargo e Franco, 2000; Camargo et al., 2003; Camargo, 2008; Machado et al., 2013).

Entretanto, apesar da grande importância desta molécula, Campos et al. (1995) demonstraram que nem todos os isolados de *P. brasiliensis* expressavam a gp43, demonstrando ainda existir diferentes isoformas desta molécula. Em estudo posterior, Berzaghi et al. (2005), demonstraram que as culturas fúngicas de *P. brasiliensis* seriam compostas por diferentes clones e por alguma razão, apenas alguns destes expressariam a molécula de 43.000 daltons. Esses estudos explicam porque alguns pacientes, mesmo infectados por *P. brasiliensis*, podem apresentar ausência de reatividade

para antígenos obtidos desta espécie, pois a isoforma de gp43 ao qual o paciente foi exposto pode ser diferente da isoforma presente no ensaio.

Somada a essa dificuldade, Leitão et al. (2014) estudando a gp 43 de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* verificaram que as mesmas apresentam 80% de similaridade, possuindo epitopos semelhantes e diferentes entre si. Os autores sugerem que apesar das duas espécies possuírem gp43 a quantidade expressa entre as espécies é diferente, ou seja, *P. brasiliensis* expressa gp43 em grande quantidade, estimulando os pacientes infectados a produzirem grande quantidade de imunoglobulinas contra essa molécula, de modo que esses indivíduos reagem tanto a gp43 de *P. brasiliensis* quanto a ortóloga de *P. lutzii*. Por outro lado, *P. lutzii* expressa pouco essa glicoproteína e por essa razão, os indivíduos acometidos por essa espécie não respondem com grande quantidade de imunoglobulinas voltadas para a mesma e por consequência não reconhecem essa fração nas demais espécies de *Paracoccidioides*.

Segundo Machado et al. (2013), pacientes da Região Centro-Oeste brasileira, infectados por *P. lutzii*, têm maior dificuldade de reconhecer antígenos ricos em gp43, possivelmente pela maior variabilidade desta molécula, dentro de *P. lutzii*. Por este raciocínio, os pacientes do Centro-Oeste estariam sendo sensibilizados por formas variadas da gp43 e, portanto, seus soros não seriam reativos às formas mais conservadas de gp43 expressas por *P. brasiliensis*. Sendo assim, a gp43, também teria importância na infecção por *P. lutzii*, e sua variabilidade, além de trazer dificuldade ao diagnóstico sorológico, seria um mecanismo de escape ao hospedeiro. Ainda segundo os autores, esta afirmação corroboraria com Matute et al. (2008) que sugeriram que o aumento de variabilidade em genes de virulência seria importante no mecanismo de escape imunológico.

Considerando o proposto por Leitão et al., (2014), as observações de Machado et al. (2013) e as isoformas estudadas por Campos et al. (1995) não é surpreendente que existam resultados falso negativos, principalmente

de pacientes infectados por *P. lutzii*, ou infectados por outros isolados que apresentem isoformas distintas de gp43, frente a filtrado de cultura, visto que esta preparação antigênica, apresenta grande quantidade desta molécula em sua composição antigênica, aproximadamente 80% (Camargo, 2008).

A quantidade ou quais proteínas serão reconhecidas no *immunoblotting*, dependem do antígeno que está sendo empregado. Assim, como o filtrado de cultura privilegia a extração da gp43, *cell free antigen* e CSSEPC permitem a extração, além da referida molécula, de outras frações protéicas e/ou glicoprotéicas frouxamente ligadas à parede celular do patógeno. Neste sentido, Blotta e Camargo (1993), avaliaram *cell free antigen* do isolado B-339 e identificaram, por SDS-PAGE, 42 frações migrando entre 18 a 102 kDa, destas, 31 foram reconhecidas, por IB, por amostras de soro de pacientes com PCM ativa, portanto, pode-se afirmar, que imuno-dominância não é sinônimo de imuno-exclusividade.

Batista et al., 2010; Nunes, 2014; Marques-da-Silva et al., 2012 têm defendido em suas publicações, o emprego de antígenos produzidos a partir de isolados regionais para a realização do imunodiagnóstico da PCM em suas regiões. Acerca disto, devemos salientar que apesar dos primeiros isolamentos e identificações de *P. lutzii* terem se concentrado na região Centro-Oeste (Teixeira et al., 2014), trabalhos mais recentes têm demonstrado a circulação e presença desta espécie em outras regiões brasileiras como Sul e Sudeste e coexistindo com *P. brasiliensis* (Arantes et al., 2016; Mendes et al., 2017), tornando as dificuldades, consideradas inicialmente como regionais, ainda maiores.

Além da aparente distribuição de *P. lutzii* pelo território nacional deve-se lembrar que há um alto grau de migração de pessoas no Brasil, tanto de indivíduos que vem da região Norte e Nordeste para as regiões Sul e Sudeste, como de pessoas residentes nos estados das regiões Sul e Sudeste que migram em direção a região Centro-Oeste e Norte em busca de novas oportunidades, devido a franca expansão da fronteira agropecuária.

Neste cenário, como afirmar e identificar casos autóctones e eleger isolados regionais, já que a PCM pode demorar anos para se manifestar?

O presente trabalho produziu e avaliou preparações antigênicas de *P. lutzii* que foram capazes de discriminar soros de regiões endêmicas e não endêmicas para *Paracoccidioides* sp. Entre esses antígenos, destacam-se as preparações antigênicas Th 01 20d 10X [] (FN), Th 66 5d 20X [] e CSSEPC-M 01 20d (FN), que por ID, apresentaram 87,5% (21 soros de 24) de reatividade no grupo de amostras de região não endêmica para *P. lutzii* e reagentes para *P. brasiliensis*. No grupo de amostras sem avaliação sorológica prévia, provenientes de região potencialmente endêmica para *P. lutzii* essas mesmas preparações antigênicas apresentaram desempenho semelhante, com 85, 71% de reatividade (18 soros de 21).

Estes resultados contrariam os dados de Batista Jr et al. (2010), uma vez que os autores observaram uma expressiva diferença no padrão de reatividade ao avaliarem, por ID, amostras de soro de pacientes residentes nos estados São Paulo e Mato Grosso frente ao antígeno padrão de *P. brasiliensis* e um antígeno obtido a partir de um isolado do Mato Grosso, identificado como antígeno regional. Os autores demonstraram que frente ao antígeno regional, as amostras de soro de pacientes de Mato Grosso e São Paulo, apresentaram reatividade de 92,3% *versus* 41,3%, respectivamente. Por outro lado, quando estas mesmas amostras foram avaliadas frente ao antígeno padrão de *P. brasiliensis*, a reatividade foi de 26,2% *versus* 100%, respectivamente. A diferença entre os dados gerados por Batista Jr et al. (2010) com os do presente trabalho pode estar provavelmente relacionada ao método de obtenção de antígeno, que foi diferente em ambos os casos, ou a diferente expressão de gp 43 por ambos os isolados.

Em relação à avaliação de soros de pacientes com acompanhamento sorológico para histoplasmose, observou-se que frente aos antígenos obtidos em ágar Fava-Netto modificado segundo Freitas (2005), três (30%) soros apresentaram reatividade, e que frente as preparações do tipo

CSSEPC apenas duas (20%) foram reagentes, sugerindo que as preparações obtidas segundo Freitas (2005) acarretariam em maior número de reatividade cruzada. Porém é importante salientar que somente 10 amostras foram avaliadas, e que perante esse resultado, testes com um número maior de soros devem ser realizados.

A reatividade cruzada entre soros de pacientes com histoplasmose ou aspergilose frente a antígenos de *Paracoccidioides* sp já foi descrita por inúmeros trabalhos e esta relacionada à similaridade antigênica entre as espécies (Negróni et al. 1975; Silveira-Gomes e Silva, 2012) e ainda representa um problema no diagnóstico mesmo quando antígenos recombinantes são utilizados nos ensaios (Ortiz et al., 1998). Outros fatores que devem ser considerados nesses casos de reatividade cruzada concentram-se na possibilidade do indivíduo infectado por *Histoplasma capsulatum* já ter tido contato com *Paracoccidioides* sp, visto que ambos os patógenos podem coabitar o mesmo nicho ecológico. Desta forma, a reatividade cruzada identificada no ensaio, pode se dar pela presença de anticorpos de memória ou ainda, o que é raro, a coinfeção pelos dois patógenos (Torres Esteche et al., 2012).

Deste modo, o presente trabalho obteve antígenos que apresentaram bom desempenho frente aos diferentes grupos de amostras avaliados. Além disso, é importante enfatizar, que a execução dos dois métodos utilizados é simples, pouco onerosa uma vez que não requer o uso de aparelhos sofisticados, repiques de pré-inóculo, e agitação constante tornando, portanto, a obtenção destes antígenos acessíveis aos mais diversos laboratórios presentes no Brasil, e nos demais países da América do Sul, onde a doença é endêmica.

Além disso, é interessante ressaltar que os antígenos produzidos a partir do isolado 01 de *P. lutzii*, empregando as metodologias descritas por de Freitas (2005) e Assis (1989) apresentaram desempenho semelhante. Deste modo, um laboratório extremamente simples, que não possua o

recurso da liofilização, empregando um liofilizador ou rota-vapor, para produzir antígenos segundo Freitas (2005), poderá produzir o CSSEPC, que pode ser utilizado *in natura*, mantendo bons resultados. Soma-se a isto, o fato do isolado 01, por ter sido o primeiro isolado de *P. lutzii* identificado, encontrar-se presente em diversos laboratórios, centros de pesquisa, o que colaboraria grandemente para a padronização de antígenos de *P. lutzii*.

Entretanto, a constatação da ocorrência de reatividade cruzada entre as espécies de *Paracoccidioides spp*, observada tanto por imunodifusão dupla quanto por *immunoblotting* sinalizam claramente que mais estudos devem ser executados, porém, como já mencionado anteriormente, avaliando preferencialmente amostras de soro de pacientes sabida e comprovadamente infectados com *P. lutzii*

Pensando na avaliação da imunidade humoral dos pacientes infectados por *Paracoccidioides sp*, deve-se salientar que um resultado sorológico depende “minimamente” de uma tríade composta pela amostra avaliada, pelo ensaio sorológico e especialmente pela qualidade do antígeno utilizado. Cada um destes pilares relaciona-se com uma série de outras variáveis que influenciam o resultado do ensaio.

Diante de tudo que foi apresentado e discutido ao longo deste trabalho, fica claro, que as dificuldades no diagnóstico sorológico da PCM devem ser encaradas como um problema nacional, uma vez que há altas taxas de migração de pessoas e que *P. lutzii* já foi identificado em regiões geograficamente distantes daquelas consideradas até o momento como endêmicas para a espécie, ou seja, regiões Centro-Oeste e Norte, assim como *P. brasiliensis* já foi isolado em outras regiões além da Sul e Sudeste. Portanto, os laboratórios de mico-sorologia devem estar preparados para a avaliação de pacientes que nunca saíram de seu estado de origem bem como de pacientes que já estiveram e trabalharam em todo território nacional.

7.0. Conclusões

Não foi possível, correlacionar os aspectos fenotípicos dos isolados 01, 66 e 8334 cultivados durante 5,10 e 20 dias, a 37°C em ágar Fava-Netto modificado com a expressão das frações antigênicas. Porém, observou-se diferenças morfológicas entre os meios de cultura utilizados, como aumento visível de esporulação das leveduras dos isolados 01 e 66 e grande quantidade de células em degeneração em ágar Sabouraud-dextrose, bem como presença de células catenuladas nos isolados 01 e 8334 quando cultivados neste meio de cultura.

O baixo desempenho (ausência de reatividade ou reatividade de fraca intensidade), por ID, dos antígenos obtidos em ágar Sabouraud-dextrose frente ao anticorpo policlonal espécie-específico, a dosagem proteica inferior dos antígenos obtidos nesse meio de cultura, e a reatividade cruzada dos antígenos CSSEPC convencional e modificado de 8334, frente ao anticorpo policlonal anti-antígeno de *H. capsulatum* concluímos que o meio de cultura ágar Sabouraud-dextrose não é indicado para a obtenção de antígenos de *P. lutzii*.

Todas as avaliações realizadas demonstram melhor desempenho das preparações antigênicas obtidas em ágar Fava-Netto modificado, indicando ser esse, o meio de cultura de escolha para a obtenção de antígenos de *P. lutzii*.

A utilização dos protocolos descritos por Freitas (2005) e Assis et al. (1998) proporcionaram a obtenção de preparações antigênicas de qualidade, de baixo custo operacional, e fácil obtenção, visando o imunodiagnóstico da PCM causada por *Paracoccidioides* sp, podendo ser facilmente reproduzidos em todos os laboratórios de mico-sorologia, mesmo aqueles com um parque tecnológico modesto.

Nenhum antígeno obtido em ágar Fava-Netto modificado apresentou, por imunodifusão dupla, reatividade cruzada frente aos anticorpos policlonais anti-antígeno de *H. capsulatum* e anti-antígeno de *A. fumigatus*, bem como frente a amostras de soro de indivíduos saudáveis, indicando que os antígenos produzidos são “específicos”.

Houve reatividade cruzada, independentemente da classificação epidemiológica de origem das amostras de soro, ou seja, regiões potencialmente endêmicas ou não para *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, entre as espécies de *Paracoccidioides* sp tanto por imunodifusão dupla como por *immunoblotting*.

O emprego do ensaio de *immunoblotting* para avaliar amostras de soros de pacientes que em imunodifusão dupla apresentaram ausência de reatividade para alguma das espécies de *Paracoccidioides*, permitiu o reconhecimento dos marcadores sorológicos de *P. brasiliensis* bem como de inúmeras frações de *P. lutzii*, diminuindo substancialmente o percentual de resultados falsos negativos.

A reatividade cruzada entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii* não permitiu diferenciar sorologicamente casos de PCM causados por *P. lutzii* e *P. brasiliensis* empregando os ensaios de imunodifusão dupla e *immunoblotting*.

A fração de 60 kDa de *P. lutzii* pode estar relacionada a ocorrência de reatividade cruzada entre *P. lutzii* e *P. brasiliensis*.

A avaliação do perfil eletroforético dos antígenos de *P. lutzii* e de *P. brasiliensis*, revela que ambas as espécies apresentam em sua constituição antigênica, frações que são comuns entre si.

As análises sorológicas, por imunodifusão dupla, sugerem fortemente que os relatos de resultados falso negativos, possam estar diretamente

relacionados aos antígenos empregados, que não contemplam em sua composição toda a diversidade antigênica de *Paracoccidioides sp.*

A avaliação preliminar do emprego de *poll* de antígenos, por imunodifusão dupla, sugere que a combinação de preparações antigênicas pode melhorar o imunodiagnóstico da PCM causada por *Paracoccidioides sp.* Porém, testes com um número maior de amostras de soro devem ser realizados para comprovar o aumento da sensibilidade e verificar qual associação antigênica devesse ser utilizada.

Observou-se claramente a existência de reatividade sorológica das amostras de soro de pacientes com PCM comprovada ou com suspeita clínica da doença entre ambas as espécies, e o compartilhamento de frações antigênicas em *Paracoccidioides sp.* Desta forma, pesquisas que contemplem a avaliação sorológica de amostras de pacientes com PCM comprovada por *P. lutzii* devem ser realizadas, com o objetivo de caracterizar as frações exclusivas da espécie.

8.0 Referências

Albuquerque CF, Da Silva SH, Camargo ZP. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:1944-1946.

Almeida Junior JN, Del Negro GMB, Grenfell RC, Vidal MSM, Thomaz DY, de Figueiredo DSY, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for differentiation of the dimorphic fungal species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. *J Clin Microbiol.* 2015;53(4):1383–1386.

Arantes TD, Theodoro RC, Teixeira M de M, Bosco S de MG, Bagagli E. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(4):ppe0004606.

Assis CM, Mendes-Giannini MJM, del Negro GMB, Gambale W. *paracoccidioides brasiliensis* cell wall antigens soluble in nacl 0,85%. 1989a. *arq biol tecol.* 32 , p.101.

Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, de Camargo ZP, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(4):505–512

Baltazar LM, Werneck SMC, Soares BM, Ferreira MVL, Souza DG, Pinotti M, et al. Melanin Protects *Paracoccidioides brasiliensis* from the Effects of Antimicrobial Photodynamic Inhibition and Antifungal Drugs. *Antimicrob Agents Chemothe.* 2015; 59(7): 4003–4011.

Barbosa W, Daher R, de Oliveira AR. Lymphatic abdominal form of South American blastomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo .*1968;10(1):16–27.

Batista J, De Camargo ZP, Fernandes GF, Vicentini AP, Fontes CJF, Hahn RC. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? *Mycoses*. 2010;53(2):176–180.

Bellissimo-Rodrigues F, Vitali LH, Martinez R. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis in HIV-coinfected patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Nov;105(7):904-907

Bellissimo-Rodrigues F, Machado AA, Martinez R, Paracoccidioidomycosis Epidemiological Features of a 1,000-Cases Series from a Hyperendemic Area on the Southeast of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85(3):546–550.

Benard G, Campos AF, Netto LC, Gonçalves LG, Machado LR, Mimicos E V., et al. Treatment of severe forms of paracoccidioidomycosis: is there a role for corticosteroids? *Med Mycol*. 2012; 50(6):641–648.

Bertoni TA, Perenha-Viana MCZ, Patussi E V., Cardoso RF, Svidzinski TIE. Western Blotting Is an Efficient Tool for Differential Diagnosis of Paracoccidioidomycosis and Pulmonary Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2012; 19(11):1887–1888.

Berzaghi R, da Silva SH, de Camargo ZP. Variable gp43 secretion by *Paracoccidioides brasiliensis* clones obtained by two different culture methods. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):491-493.

Bittencourt JIM, Oliveira RM de, Coutinho ZF. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. *Cad Saude Publica*. 2005;21(6):1856–1864.

Blotta MH, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 1993; 31(3):671–676.

Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér SA, Papaiordanou PM, Goveia A, et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61(3):390–394.

Blumer SO, Jalbert M, Kaufman L. Rapid and reliable method for production of a specific *Paracoccidioides brasiliensis* immunodiffusion test antigen. *J Clin Microbiol.* 1984;19(3):404–407.

Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Shikanai-Yasuda MA, Soares Felipe MS, et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiol.* 2013;8(9):1177–1191.

Borges SRC, Sperandio da Silva GM, da Costa Chambela M, de Oliveira R d. VC, Braga Costa RL, Wanke B, et al. Itraconazole vs. trimethoprim-sulfamethoxazole: A comparative cohort study of 200 patients with paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2014; 52(3):303–310.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6(2):89–117.

Buccheri R, Moraes VDS, Kamikawa CM, Vidal MSM, Naves G, Del Negro GMB, Vicentini AP, Benard G. Case Report: Misleading Serological Diagnosis of Paracoccidioidomycosis in a Young Patient with the Acute Form Disease: *Paracoccidioides brasiliensis* or *Paracoccidioides lutzii*?. *Am J Trop Med Hyg.* 2018.

Camacho E, Niño-Vega GA. *Paracoccidioides* Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:1–19.

Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of

Paracoccidioides brasiliensis exoantigens for immunodiffusion tests. J Clin Microbiol. 1988;26(10):2147–2151.

Camargo ZP, Unterkircher C, Travassos LR. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. J Med Vet Mycol. 1989;27(6):407-412.

Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. J Med Vet Mycol. 1991; 29(1):31–38.

Camargo ZP, de Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Rev Iberoam Micol. 2000 Jun;17(2):41-48.

Camargo ZP, Berzaghi R, Amaral CC, Silva SHM. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. Med Mycol. 2003;41(6):539–542.

Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 2008; 165(4-5):289–302.

Campos MC, Gesztesi JL, Vincentini AP, Lopes JD, Camargo ZP. Expression and isoforms of gp43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol. 1995; 33(4):223–227.

Cano LE, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. An evaluation of the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for quantitation of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol. 1986;24(6):467-475.

Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJA, Soares CMA, Pereira M, et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. Fungal Genet Biol. 2008; 45(4):

605-612.

Carvalho KC, Vallejo MC, Camargo ZP, Puccia R. Use of recombinant gp43 isoforms expressed in *Pichia pastoris* for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15(4):622–629.

Cattana ME, Tracogna MF, Marques I, Rojas F, Fernández M, de los Ángeles Sosa M, et al. In Vivo *Paracoccidioides* sp. Biofilm on Vascular Prosthesis. *Mycopathologia*. 2017; 182(7-8):747–749.

Cavalcante R de S, Sylvestre TF, Levorato AD, de Carvalho LR, Mendes RP. Comparison between Itraconazole and Cotrimoxazole in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(4):e2793.

Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol*. 2011; 49(8):1–14.

Correa MM, Bedoya AM, Guerrero MP, Méndez J, Restrepo A, McEwen JG. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. *Mycoses*. 2007; 50(1):41–47.

Coutinho ZF, Silva D da, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM de, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica*. 2002; 18(5):1441–1454.

Coutinho ZF, Wanke B, Travassos C, Oliveira RM, Xavier DR, Coimbra CE Jr. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006.). *Trop Med Int Health*. 2015; 20(5):673-680.

Da Silva MI, de Carvalho IM, Franco TN, Cunha MA, Chamma LG, Fogaça J, et al. The use of a mixture of somatic and culture filtrate antigens in the

evaluation of the immune response to *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol. 1991; 29(5):331–334.

Da Silva JF, de Oliveira HC, Marcos CM, Assato PA, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016; 84(1):87-94.

De Macedo PM, de Oliveira LC, Freitas DF, da Rocha JA, Freitas AD, Nucci M, et al. Acute paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* S1 mimicking hypereosinophilic syndrome with massive splenomegaly: Diagnostic Challenge. PLoS Negl Trop Dis. 2016a; 10(4): e0004487.

De Macedo PM, Almeida-Paes R, Muniz MM, Oliveira MM, Zancopé-Oliveira RM, Costa RL, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* PS2: first autochthonous paracoccidioidomycosis case report in Rio de Janeiro, Brazil, and literature review. Mycopathologia. 2016b; 181(9-10): 701-708

De Macedo PM, Almeida-Paes R, Freitas DFS, Varon AG, Paixão AG, Romão AR, et al. Acute juvenile Paracoccidioidomycosis: A 9-year cohort study in the endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2017; 11(3):e0005500.

Del Negro GMB, Benard G, de Assis CM, Vidal MSM, Garcia NM, Otani C, et al. Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. J Med Vet Mycol. 1995; 33(2):113–116.

Del Negro GMB, Pereira CN, Andrade HF, Palacios SA, Vidal MMS, Charbel CE, et al. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. J Med Microbiol. 2000; 49(1): 37-46.

Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, Muszewska A, Goldberg J, Bailão AM, et al. Comparative Genomic Analysis of Human Fungal Pathogens Causing Paracoccidioidomycosis. *PLoS Genet.* 2011; 7(10):e1002345.

Díez S, Gómez BL, McEwen JG, Restrepo A, Hay RJ, Hamilton AJ. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2003 41(4):1536–1542.

Do Valle ACF, Costa RLB, Fialho Monteiro PC, Von Helder J, Muniz MM, Zancopé- Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2001; 39(4): 373-377.

Ehrhard H B, Pine L. Factor influencing the production of H and M antigens by *Histoplasma capsulatum*: Effect of physical factors and composition of medium. *Appl Microbiol.* 1972a, 23:250-256.

Ehrhard H B, Pine L. Factor influencing the production of H and M antigens by *Histoplasma capsulatum*: development and evaluation of shake culture procedure. *Appl Microbiol.* 1972b, 23:236-249.

Fernandes VC, Coitinho JB, Veloso JMR, Araújo SA, Pedroso EP, Goes AM. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Immunol Methods.* 2011; 367(1-2):78–84.

Ferreira CS, Milena E, Ribeiro DC, Miranda A De. Current strategies for diagnosis of paracoccidioidomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. *Future Microbiol.* 2016; (11):973-985.

Ferreira Rocha L, de Araújo Torres D. Acute Paracoccidioidomycosis in a 40-Year-Old Man: A Case Report and Literature Review. *Mycopathologia*. 2017; 182(11-12):1095-1099.

Ferri RG. Estudo imunoquímico de antígenos intracelulares. *Hospital*. 1961;59:917-24

Fortes MRP, Miot HA, Kurokawa CS, Marques MEA, Marques SA. Imunologia da paracoccidioidomicose. *An Bras Dermatol*. 2011; 86(3):516–24.

Franco M, Bagagli E, Cunha M, Chamma LG, Fecchio D. *Paracoccidioides brasiliensis* antigen batches from the same isolate show immunological and biochemical differences. *Mycopathologia*. 1996; 135(1):13–19.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG da S. Paracoccidioidomycosis: A Recently Proposed Classification of Its Clinical Forms. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1987;20(2):129–32.

Freitas RS, Caracterização fenotípica e padronização de antígenos de *h. capsulatum* var. *capsulatum* para o diagnóstico da histoplasmose [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2005.

Freitas RS, Kamikawa CM, Vicentini AP. Fast protocol for the production of *Histoplasma capsulatum* antigens for antibody detection in the immunodiagnosis of histoplasmosis. *Rev Iberoam Micol*. 2018;35(1):27-31

Gegembauer G, Araujo LM, Pereira EF, Rodrigues AM, Mello A, Paniago M, et al. Serology of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8(7) e2986.

Giusiano G, Aguirre C, Vratnica C, Rojas F, Corallo T, Cattana ME, et al.. Emergence of acute/subacute infant-juvenile paracoccidioidomycosis in Northeast Argentina: Effect of climatic and anthropogenic changes? *Med. Mycol*, 2018 *in press*

Gómez BL, Nosanchuk JD, Díez S, Youngchim S, Aisen P, Cano LE, et al. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. *Infect Immun*. 2001; 69(9):5760–5767.

González-ochoa A. Clasificación clínica de las micosis. *Rev Int Salubr Enferm Trop*. 1956; 16: 1.

Hahn RC, Rodrigues AM, Fontes CJF, Nery AF, Tadano T, Queiroz L de P, et al. Fatal fungemia due to *Paracoccidioides lutzii*. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 ;91(2):394–398.

Hernandez O, Araque P, Tamayo D, Restrepo A, Herrera S, McEwen JG, et al. Alternative oxidase plays an important role in *Paracoccidioides brasiliensis* cellular homeostasis and morphological transition. *Med Mycol*. 2015;53(3):205–214.

Kamikawa C, Kohara V, Passos A, Vicentini A. Retrospective seroepidemiological analysis of patients with suspicion of paracoccidioidomycosis in São Paulo State, Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2012; 18(3):264–271.

Kamikawa CK, Vicentini AP. Dot-Blot Methodology for Rapid Diagnosis of Paracoccidioidomycosis Caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Infect Dis Ther*. 2015; 3 (5) e1000256.

Kamikawa CM, Mendes RP, Vicentini AP. Standardization and validation of

Dot-ELISA assay for *Paracoccidioides brasiliensis* antibody detection. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2017; 23(1):11.

Kaufman L, Standard P. Immuno-identification of cultures of fungi pathogenic to man. Curr Microbiol. 1978; 1(3):135–140.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari E, Melo NT. Tratado de Micologia Médica Lacaz. São Paulo: Sarvier; 2002.

Leitão NP, Vallejo MC, Conceição PM, Camargo ZP, Hahn R, Puccia R. *Paracoccidioides lutzii* Plp43 Is an Active Glucanase with Partial Antigenic Identity with *P. brasiliensis* gp43. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(8):e3111.

Lenhard-Vidal A, Assolini JP, Ono MA, Bredt CS, Sano A, Itano EN. *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* antigens elicit different serum IgG responses in chronic paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 2013; 176(5-6):345-352.

Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. Brasil-Med. 1908; 22: 121-144.

Machado GC. Espécies crípticas em *Paracoccidioides brasiliensis*: Diferenciação antigênica e de resposta a fatores estressantes . Diferenciação antigênica e de resposta a fatores estressantes [Dissertação] São Paul;. 2011.

Machado GC, Moris DV, Arantes TD, Silva LR, Theodoro RC, Mendes RP, Vicentini AP, Bagagli E. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(5):637-643.

Maluf ML, Pereira SR, Takahachi G, Svidzinski TI. Prevalence of paracoccidioidomycosis infection determined by sorologic test in donors' blood in the Northwest of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(1):11-16

Mattos Grosso D, de Almeida SR, Mariano M, Lopes JD. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect Immun.* 2003; 71(11):6534–6542.

Marques SA, Robles AM, Tortorano AM, Tuculet MA, Negroni R, Mendes RP. Mycoses associated with AIDS in the Third World. *Med Mycol.* 2000;38 Suppl 1:269-279

Marques SA. Paracoccidioidomycose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *An Bras Dermatol.* 2003; 78(2):135–146.

Marques-da-Silva SH, Rodrigues AM, de Hoog GS, Silveira-Gomes F, Camargo ZP de. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87(4):710–714.

Martinez R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. *J Fungi.* 2017; 3(1):1.

Martinez R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. *Rev do Inst Med Trop São Paulo.* 2015;57 (1):11–20.

Martins R, Marques S, Alves M, Fecchio D, Franco MF de. Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with itraconazole using Dot-blot, ELISA and Western-blot. *Rev Inst Med Trop.* 1997; 39(5):261–270.

Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al.

Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 2006;23(1):65–73.

McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol.* 1987; 25(3):165–175.

McEwen JG, Garcia AM, Ortiz BL, Botero S, Restrepo A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res.* 1995; 26(3):305–306.

Mendes JF, Klafke GB, Albano APN, Cabana ÂL, Teles AJ, de Camargo ZP, et al. Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by *Paracoccidioides lutzii*. *Mycoses.* 2017; 60(6):402–406.

Mendes RP, Vicentini AP, Carvalhanas TRMP (Coord.). Manual de Vigilância Epidemiológica da Paracoccidioidomicose. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde. 2008.

Mendes RP, Cavalcante RS, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, Paniago AMM, et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol J.* 2017; 11: 224-82.

Mendes-Giannini MJS, Camargo ME, Lacaz CS, Ferreira AW. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1984; 20(1): 103-108.

Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Masuda A. Detection of the 43,000-molecular weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(12): 2842-2845.

Mendes-Giannini MJS, Moraes RA, Ricci TA. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1990; 32(5):384–385.

Mendes-Giannini MJS, Del Negro GB, Siqueira AM. Serodiagnosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Flórida, USA: CRC Press; 1994.

Mendes-Giannini MJS, Melhem MC. Infecções fúngicas. In: Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto imunes. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001; 334-403.

Mendes-Giannini MJ, Hanna SA, da Silva JL, Andreotti PF, Vincenzi LR, Benard G, Lenzi HL, Soares CP. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. Microbes Infect. 2004;6(10):882-891.

Mendes-Giannini MJS, Andreotti PF, Vincenzi LR, Monteiro da Silva JL, Lenzi HL, Benard G, et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbes Infect. 2006 8(6):1550–1559.

Molinari-Madlum EE, Felipe MS, Soares CM. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. Med Mycol. 1999; 37(4):269–276.

Morais VS. Padronização do diagnóstico sorológico de paracoccidioidomicose por *P. lutzii* no LIM 53.[Monografia]. São Paulo: Programa de Aprimoramento Profissional, Instituto de Medicina Tropical; 2017.

Moreto T, Mendes R. Diagnosis of paracoccidioidomycosis in patients attended in routine services of a university hospital. J Venom Anim Toxins

Incl Trop Dis. 2010;16(3):524–525.

Moses A. Fixação de complemento na blastomicose. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1916; 8: 68-70.

Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, Gallo JE, Sykes S, Sakthikumar S, et al. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. mSphere. 2016; 1(5):e00213–6.

Naiff RD, Ferreira LCL, Barrett T V., Naiff MF, Arias JR. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1986 28(1):19–27.

Negróni R, Negróni P. Antígenos del paracoccidioides brasiliensis para las Reacciones serológicas. Mycopathol Mycol Appl. 1968;34(3-4):285–288.

Negróni R, Flores CI, Roble AM. Estudio de las reacciones serológicas cruzadas entre antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*. Rev Asoc Arg Micro .1975; 8: 67-73.

Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, de Camargo ZP, Blotta MHSL. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. Clin Diagn Lab Immunol. 2003;10(5):802–807.

Nunes JGC. Análise de exoantígenos regionais e de referência do gênero *Paracoccidioides* no sorodiagnóstico da paracoccidioidomicose humana. [Dissertação]. Belém. Universidade Federal do Pará; 2014.

Oliveira HC De, Assato PA, Marcos CM, Scorzoni L, Alarcon KM, Fusco-almeida AM, et al. Paracoccidioides -host Interaction: An Overview on

Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. *Front Microbiol.* 2015; 6:1–20.

Ortiz BL, Garcia AM, Restrepo A, McEwen JG. Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;3(2):239–241.

Ouchterlony O. Antigen – Antibody reactions in gels. *Acta Path Microbiol Scand.* 1949; 26(4): 507-515.

Paniago AM, de Freitas AC, Aguiar ES, Aguiar JI, da Cunha RV, Castro AR, Wanke B. Paracoccidioidomycosis in patients with human immunodeficiency virus: review of 12 cases observed in an endemic region in Brazil. *J Infect.* 2005 Oct;51(3):248-252

Panunto-Castelo A, Freitas-da-Silva G, Bragheto IC, Martinez R, Roque-Barreira MC. *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 2003;5(13):1205–1211.

Passos AN. Avaliação da aplicabilidade da técnica de immunoblotting para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*Paracoccidioides brasiliensis* e anti-*Histoplasma capsulatum* em laboratório de Saúde Pública. [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2012.

Pereira EF. Distribuição geográfica, epidemiológica e clínica de casos de PCM causada por *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* no estado do Mato Grosso do Sul. [Dissertação]. Campo Grande, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2015.

Perenha-Viana MCZ, Gonzales IAA, Brockelt SR, Machado LNC, Svidzinski

TIE. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis through a Western blot technique. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19(4):616–619.

Peron G, Fernandes FF, Landgraf TN, Martinez R, Panunto-Castelo A. Recombinant 60-kDa heat shock protein from *Paracoccidioides brasiliensis*: is it a good antigen for serological diagnosis of paracoccidioidomycosis? *Brazilian J Med Biol Res.* 2017;50(4):e5928.

Pitangui NS, Sardi JCO, Silva JF, Benaducci T, Moraes da Silva RA, Rodríguez-Arellanes G, et al. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. *Biofouling.* 2012; 28(7):711–718.

Popi FAF, Lopes FD, Mariano M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol.* 2002; 218(1-2):87–94.

Puccia R, Schenkman S, Gorin PA, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun.* 1986; 53(1):199–206.

Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(8):1610–1615.

Puccia R, Takaoka DT, Travassos LR. Purification of the 43 kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). *J Med Vet Mycol.* 1991;29(1):57-60

Queiroz Júnior L de P, de Camargo ZP, Tadano T, Rodrigues AM, Takarara DT, Gegembauer G, et al. Serological and antigenic profiles of clinical

isolates of *Paracoccidioides* spp. from Central Western Brazil. *Mycoses*. 2014;57(8):466–472.

Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17 (11) e367-e377.

Restrepo A, Moncada LH. Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. *Microbiol*. 1974; 28(1):138–144.

Restrepo A, Cano LE, Tabares AM. A comparison of mycelial filtrate - and yeast lysate - paracoccidioidin in patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 1983; 1;84(1):49-54

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 1984;46(2):346-353

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*. 1985; 23(5):323–334.

Restrepo A. Report of activities of the committee on paracoccidioidomycosis serodiagnosis. *ISHAM Myc Newsletter*. 1992; 59: 4.

Restrepo A, Mcewen JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*. 2001; 39(3): 233-41.

Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by strogens of conidium to yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Infect Immun.1988; 56:711-713.

San-Blas G, San-Blas F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. Mycopathol. 1977; 62(2): 77-786.

San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. Med Mycol. 2002; 40(3):225–242.

Sano A, Tanaka R, Yokoyama K, Franco M, Bagagli E, Montenegro MR, et al. Comparison between human and armadillo *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. Mycopathologia. 1998 ;143(3):165–169.

Santo AH. Tendência da mortalidade relacionada à paracoccidioidomicose, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de morte. Rev Panam Salud Pública. 2008;23(5):313–324.

Sardi Jde CO, Pitangui Nde S, Rodríguez-Arellanes G, Taylor ML, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Highlights in pathogenic fungal biofilms. Rev Iberoam Micol. 2014; 31(1):22-29.

Sardi J de CO, Pitangui Nde S, Voltan AR, Braz JD, Machado MP, Fusco Almeida AM, et al. In vitro *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. Virulence. 2015; 6(6):642–651.

Shankar J, Restrepo A, Clemons KV, Stevens DA. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. Clin Microbiol Rev. 2011; 24(2):296-313

Shikanai Yasuda MA, Queiroz F De, Filho T, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML, et al. Guidelines in paracoccidioidomycosis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop 2006;39(3):297–310.

Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F de, Kono ASG, Paniago AM, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. Rev Soc Bras Med Trop. 2017; 50(5):715-740

Silva DF. Análise da estabilidade de exoantígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*. [Dissertação]. São Paulo; Coordenadoria de Controle de Doenças; 2005.

Silva DF, Assis CM, Vicentini AP. Analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens stability. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2006; 12(4): 657.

Silva DF, Assis CM, Zamboni IM, Barreto LC, Kohara VS, Vicentini-Moreira AP. Use of immunoblotting assay improves the sensitivity of paracoccidioidomycosis diagnosis. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2008; 14(2):313–321.

Silva MB da, Thomaz L, Marques AF, Svidzinski AE, Nosanchuk JD, Casadevall A, et al. Resistance of melanized yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* to antimicrobial oxidants and inhibition of phagocytosis using carbohydrates and monoclonal antibody to CD18. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(4):644–648.

Silva, LRF. Otimização e validação da metodologia de ELISA indireto para o imunodiagnóstico da Paracoccidioidomicose causada por *Paracoccidioides brasiliensis*. [Dissertação]. São Paulo; Coordenadoria de Controle de Doenças; 2014.

Silva MIC da, Chamma LG, Franco M. Microimmunodiffusion test for the

serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. Instituto de Medicina Tropical; 1989;31(1):40–43.

Silveira-Gomes F, Marques-da-Silva SH. Effect of serum sample inactivation on the performance of latex agglutination test for paracoccidioidomycosis serodiagnosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012 Jun;107(4):510–512.

Siqueira AM. Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidioidomicose. Caracterização do antígeno E2 de *Paracoccidioides brasiliensis*. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1982.

Souza MC, Gesztesi JL, Souza AR, Moraes JZ, Lopes JD, Camargo ZP. Differences in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp43 isoforms. J Med Vet Mycol. 1997;35(1):13–18.

Straus AH, Freymüller E, Travassos LR, Takahashi HK. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. J Med Vet Mycol. 1996;34(3):181–186.

Sylvestre TF, Silva LRF, Cavalcante R de S, Moris DV, Venturini J, Vicentini AP, et al. Prevalence and Serological Diagnosis of Relapse in Paracoccidioidomycosis Patients. Vinetz JM, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(5):e2834.

Taborda CP, Camargo ZP. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. J Clin Microbiol. 1994; 32(2):554–556.

Taborda CP, da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic

pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia*. 2008; 165(4-5):331–339.

Teixeira MDM, Theodoro RC, Oliveira FFM De, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol*. 2014; 52(1) 19-28.

Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*. 2009;52(2):273–283.

Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-vega G, Bagagli E, Felipe MSS. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. *Plos Pathog*. 2014; 10(10) e1004397.

Teles FRR, Martins ML. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. *Talanta*. Elsevier; 2011 Oct 15;85(5):2254–2264.

Theodoro RC, Teixeira MDM, Sueli M, Felipe S, Paduan S, Ribolla PM, et al. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. *PLoS One*. 2012;7(5): e37694.

Torres Esteche V, Arteta Z, Torres G, Vaucher A, Gezuele E, Balleste R. Concomitant pulmonary paracoccidioidomycosis and pulmonary histoplasmosis: a rare case. *J Bras Pneumol*. 2012; 38(2):264-268.

Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute D R. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol*; 2017; 106:9–25.

Valim CX, Basso LR Jr, dos Reis Almeida FB, Reis TF, Damásio AR, Arruda LK, et al. Characterization of PbPga1, an antigenic GPI-protein in the

pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. PLoS One. 2012;7(9):e44792.

Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos LR, et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. Infect Immun. 1994; 62(4):1465–1469.

Vicentini-Moreira AP. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. São Paulo. BEPA. 2008; 5(51): 11-24

Vidal MSM, Del Negro GMB, Vicentini AP, Svidzinski TIE, Mendes-Giannini MJ, Almeida AMF, et al. Serological Diagnosis of Paracoccidioidomycosis: High Rate of Inter-laboratorial Variability among Medical Mycology Reference Centers. Vinetz JM, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(9):e3174.

Vieira G de D, Alves T da C, Lima SMD de, Camargo LMA, Sousa CM de. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. Rev Soc Bras Med Trop. 2014;47(1):63–68.

Yarzabal LA. Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomicose sudamericana revelados por inmunoelectroforesis. Ver Med Trop São Paulo. 1971; 13: 320-327.

Yarzabal LA, Bout D, Naquira F, Fruit J, Andrieu S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. Sabouraudia. 1977;15(1):79–85.

Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycoses infection.
In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G.
Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Florida, USA. CRC Press. 1994; 109
117.

9.0 Anexos

Anexo A: Comitê de Ética em Pesquisa



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859 e-mail: cepiat@lal.sp.gov.br



São Paulo, 16 de dezembro de 2011.

Protocolo: 087 /2011
Registro CEPIAL nº 026/2011 de 19/09/11
1º Protocolo – 063/2011 de 04/11/11

Projeto de Pesquisa: “Comparação do perfil antigênico das espécies crípticas de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* na resposta imune humoral de pacientes com paracoccidioidomicose”.

Pesquisador Responsável: Adriana Pardini Vicentini

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião ordinária de 15 de dezembro de 2011, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/1996 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

Anexo B: Meio de Cultura para a Produção de antígenos de *Paracoccidioides* sp

B.1. Meio de Fava Netto modificado

Neopeptona	13,3 g
Extrato de carne	5,0 g
Cloreto de Sódio	5,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Dextrose	40,0 g
Ágar	18,0 g
Água destilada	1000,0 mL

Dissolver o ágar em 1000,0 mL de água destilada, aquecendo-o em banho maria até sua completa dissolução em seguida acrescentar os demais componentes. Ajustar o pH do meio para 7,2-7,4, homogeneizar muito bem a mistura. Distribuir em tubos para cultura (20x200 mm) e autoclavar a 120°C durante 15 minutos. Após a solidificação, armazenar a 4°C até o momento do uso.

B.2. Meio de Ágar Sabouraud-dextrose

Dextrose	40,0 g
Peptona	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água Destilada	1000,0 mL

Dissolver o ágar em 1000,0 mL de água destilada, aquecendo-o em banho maria; adicionar a dextrose e a peptona, homogeneizar muito bem a mistura. Distribuir em tubos para cultura (20x200 mm) e autoclavar a 120°C durante 15 minutos. Após a solidificação, armazenar a 4°C até o momento do uso.

Anexo C: Solução Thimerosal, segundo Freitas (2005)

Etil mercúrio tio salicilato de sódio	1,0 g
Borato de Sódio	1,4 g
Água destilada	100,0 mL

Dissolver os sais em aproximadamente 80,0 mL de água destilada até completa dissolução dos mesmos, completar o volume para 100,0 mL. Armazenar em frasco âmbar a 4°C, até o momento do uso.

Anexo D: Soluções e tampões utilizados na técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida

D.1.1. Solução de bis-acrilamida

Acrilamida 30%	30,0 g
Bis-acrilamida	0,8 g
Água destilada qsp	100,0 mL

Homogeneizar a acrilamida e bis-acrilamida em 50,0 mL de água destilada em béquer envolto com papel alumínio. Após acertar o volume para 100,0 mL e filtrar a solução. Estocar a 4°C, em frasco âmbar envolto em papel alumínio devidamente identificado com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo.

D.1.2. Tampão Lower gel

Trizma Base pH (8,8)	18,2 g
SDS	0,4 g
Água destilada qsp	100,0 mL

Adicionar 50,0 mL de água destilada ao trizma base, homogeneizar e ajustar o pH da solução para 8,8. Acrescentar o SDS, completar o volume e filtrar a solução. Estocar a 4°C em frasco âmbar envolto em papel alumínio devidamente identificado com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo.

D.1.3. Tampão Upper Gel

Trizma base 0.5M	3,0 g
SDS	0,2 g
Mili-q	50,0 mL

Adicionar 25,0 mL de água destilada ao trizma base, homogeneizar e ajustar o pH da solução para 6,8. Acrescentar o SDS, completar o volume e filtrar a solução. Estocar a 4°C em frasco âmbar envolto em papel alumínio devidamente identificado com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo.

D.1.4. Solução de Persulfato de amônia 10%

Persulfato de amônia	0,5 g
Água destilada	5,0 mL

Após a dissolução do persulfato de amônia, distribuir 50 µL da solução em tubos tipo eppendorf. Armazenar a -20C até o momento do uso, em caixa devidamente identificada com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo.

D.1.5. Solução de Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 20%

SDS	10,0 g
Água bidestilada	50,0 mL

Dissolver o duodecil sulfato de sódio em 50,0mL de água destilada, homogeneizar muito bem. Armazenar em frasco devidamente identificado com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo.

D.1.6. Tampão de amostra Redutor (5x)

Tris 1M pH6,8	0,6 g
Glicerol	2,5 mL
SDS 20%	1,0 mL
2- mercaptoethanol	0,5 mL
Água destilada	4,4 mL

Após misturar os reagentes distribuir 500 μ L da solução em distribuir 50 μ L da solução em tubos tipo eppendorf. Armazenar a -20C até o momento do uso, em caixa devidamente identificada com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo.

D.1.7. Tampão de corrida 10 vezes concentrado

Glicina	144,0 g
Trizma base	30,3 g
SDS	10,0 g
Água destilada qsp	1000,0 mL

Dissolver em 600,0 mL de água destilada a glicina e o trizma, homogeneizar e acertar o pH da solução para 8,3. Adicionar o SDS, homogenizar até completa dissolução. Completar o volume para 1000,0mL. Armazenar a 4°C em frasco âmbar, devidamente identificado com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo Para uso, diluir na seguinte proporção: 100,0 mL de Tampão de transferência 10 vezes concentrado em 900,0 mL de água bidestilada

D.1.8. Gel de Separação na concentração 10% de acrilamida

Água destilada	6,7 mL
Tampão Lower	4,0 mL
Solução de bis- acrilamida	3,0 mL
Persulfato de amônia	25 μ L
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	12.5 μ L

Homogeneizar em um béquer as quantidades determinadas de água, tampão lower e solução acrilamida. Após homogeneizar adicionar Temed e por último, o persulfato de amônia. Após homogenizar, usar imediatamente aplicando cuidadosamente entre as placas de vidro do sistema de eletroforese, cobrindo com água destilada para auxiliar no processo de polimerização. Esperar polimerizar por aproximadamente 30 a 40 minutos.

D.1.9. Gel de empilhamento na concentração de 3% de acrilamida

Água destilada	2,95 mL
Tampão upper	1,25 mL
Solução de bis- acrilamida	0,8 mL
Persulfato de amônia	15 µL
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	5 µL

Homogeneizar em um béquer as quantidades determinadas de água, tampão upper e solução acrilamida. Após homogeneizar adicionar Temed e por último, o persulfato de amônia. Após homogeneizar, aplicar imediatamente entre as placas de vidro do sistema de eletroforese. Colocar o pente escolhido na solução evitando a formação de bolhas. Esperar polimerizar por aproximadamente 30 a 40 minutos.

D.1.10. Solução corante coomassie brilliant blue R-250

Coomassie brilliant blue R-250	4,0 g
Ácido acético glacial	100,0 mL
Etanol	450,0 mL
Água destilada q qsp	1000,0 mL

Em um balão volumétrico adicionar o ácido acético e o etanol, completar o volume para 1000,0 mL de água. Adicionar o corante. Homogeneizar lentamente em agitador magnético até completa dissolução do corante. Filtrar e estocar em frasco âmbar a temperatura ambiente.

D.1.11. Solução descorante

Ácido Acético Glacial	100,0 mL
Etanol	450,0 mL
Água destilada	450,0 mL

Misturar os reagentes em água destilada. Depois de pronto, estocar a temperatura ambiente em frasco âmbar devidamente identificado com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo.

D.1.12. Coloração do gel de poliacrilamida pelo método da prata

Solução Fixadora

Metanol	50,0 mL
Ácido acético glacial	12,0 mL
Formaldeído	50,0 µL
Água destilada qsp	100,0 mL

Solução de Impregnação

Nitrato de prata	0,20 g
Formaldeído	75,0 µL
Água destilada qsp	100,0 mL

Solução Reveladora

Carbonato de sódio	6,0 g
Tiosulfato de sódio	2,0 mL
Formaldeído	50,0 µL
Água destilada qsp	100,0 mL

Solução Stop

Etanol	50,0 mL
Ácido acético	12,0 mL
Água destilada qsp	100,0 mL

Após o término da corrida eletroforética, lavar rapidamente o gel em água destilada e colocá-lo por pelo menos uma hora, sob leve agitação na solução fixadora. Lavar três (3) vezes com em solução de etanol a 50% e a seguir cobri-lo por um (1) minuto com solução de tiosulfato de sódio 0,02% (solução de pré-tratamento). Lavar com água destilada três (3) vezes de 20 segundos cada lavagem. Colocar na solução de impregnação por 20 minutos. Lavar com água destilada três (3) vezes de

20 segundos cada lavagem. Colocar na solução reveladora, sob leve agitação, até que a revelação das frações protéicas. Lavar com água destilada durante 20 segundos.

Anexo E: Soluções empregadas no ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose.

E.1.1. Ágar bacteriológico 1%

Ágar bacteriológico	1,0 g
Água destilada	100,0 mL

Pesar o ágar bacteriológico e colocá-lo em erlenmeyer de 200,0 mL. Homogeneizar e levar ao forno de microondas para fundir tomando cuidado para não levantar fervura. Após fusão, distribuir 10,0 mL da solução em tubos 16x160 mm devidamente identificados com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo. Armazenar a 4^o C até o momento do uso.

E.1.2. Ágar Citrato de Sódio

Glicina	7,5 g
Citrato	0,4 g
Cloreto de Sódio	0,9 g
Agarose	1,0 g
Água destilada qsp	100,0 mL

Dissolver em aproximadamente 80,0 mL de água destilada, o cloreto de sódio, o citrato de sódio e a glicina, homogeneizar bem até a completa dissolução dos reagentes. Ajustar o pH da solução entre 6,7- 6,9 e completar o volume para 100,0 mL. Acrescentar a agarose e levar ao forno microondas para fundir. Deve-se prestar muita atenção para que a solução não entre em fervura, a mesma estará fundida quando ficar transparente. Após a etapa de fusão, adicionar o thimerosal. Distribuir 10,0 mL da solução em tubos de 16X160 devidamente identificados com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo. Armazenar a 4^o C até o momento do uso.

E.1.3. Solução Citrato sódio 5%

Citrato de sódio	50,0 g
Água destilada	1000,0 mL

Em um béquer, sob agitação, misturar a água e o citrato de sódio até que o sal esteja completamente dissolvido. Distribuir em frascos âmbar devidamente identificados com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo. Armazenar a 4° C até o momento do uso.

E.1.4. Solução salina 0,85%

Cloreto de sódio	8,5 g
Água destilada	1000,0 mL

Em um béquer, sob agitação, misturar a água e o cloreto de sódio até que o sal esteja completamente dissolvido. Distribuir em recipiente próprio devidamente identificado com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo. Manter a temperatura ambiente depois de pronto.

E 1.5. Solução corante coomassie brilliant blue R-250

Coomassie brilliant blue R-25	4,0 g
Ácido acético glacial	100,0 mL
Etanol	450,0 mL
Água destilada qsp	1000,0 mL

Em um balão volumétrico adicionar o ácido acético e o etanol, completar o volume para 1000,0 mL de água didestilada. Adicionar o corante. Homogeneizar lentamente em agitador magnético até completa dissolução do mesmo. Filtrar e estocar a temperatura ambiente em frasco âmbar devidamente identificado com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo.

E.1.6. Solução descorante

Ácido Acético Glacial	100,0 mL
Etanol	450,0 mL
Água bidestilada	450,0 mL

Misturar os reagentes em água destilada. Depois de pronto, estocar a temperatura ambiente em frasco âmbar devidamente identificado com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo.

Anexo F: Soluções e tampões utilizados na técnica de *immunoblotting*

F.1.1. Tampão de Transferência 10 vezes concentrado

Tris	15,15 g
Glicina	72,0 g
Água destilada qsp	500,0 mL

Dissolver em 500,0 mL de água destilada a glicina e o tris, homogeneizar e armazenar a 4°C em frasco âmbar, devidamente identificado com o nome da solução, número do lote, responsável pelo preparo e data do preparo. Para uso, diluir na seguinte proporção: 100,0 mL de tampão de transferência 10 vezes concentrado, 100,0 mL de metanol e 800,0 mL de água destilada.

F.1.2. Solução Corante utilizada para controle da transferência

Ponceau-S	1,0 g
Ácido acético glacial	2,0 mL
Água destilada qsp	200,0 mL

Armazenar a temperatura ambiente em frasco âmbar.

F.1.3. Solução Salina Tamponada com Fosfatos (PBS) pH 7,2–7,4 (10 vezes concentrado).

Cloreto de Sódio	80,0 g
Fosfato monopotássico	2,4 g
Fosfato dissódico	14,4 g
Água destilada qsp	1000,0 mL

No momento do uso diluir 100,0 mL de PBS 10 X concentrado em 900,0 mL de água destilada.

F.1.4. Solução de bloqueio (PBS-L 5%)

PBS (pH 7,2 – 7,4)	100,0 mL
Leite desnatado em pó	5 g

F.1.5. Solução de incubação (PBS-L 3%)

PBS(pH 7,2 – 7,4)	100,0 mL
Leite desnatado em pó	3.0 g

F.1.6. Solução PBS-Tween 20 (0.1%)

PBS (pH 7,2 - 7,4)	1000,0 mL
Tween 20	1000,0 µL

F.1.7. Solução cromógena para anti-imunoglobulina conjugado à peroxidase

4-cloro 1-naftol	15,0 mg
PBS (pH 7,2 - 7,4)	20,0 mL
Metanol	5,0 mL
Peróxido de hidrogênio	30,0 µL

Dissolver o 4-cloro 1-naftol no metanol frio, acrescentar a solução PBS e por último o peróxido de hidrogênio. Preparar a solução cromógena somente no momento do uso.

Anexo G: Tabelas de dosagem protéica

G.1.1. Dosagem protéica dos antígenos obtidos segundo Freitas (2005) em ágar Fava-Netto modificado

Dosagem protéica, segundo Bradford (1976) dos antígenos de *P.lutzii* obtidos segundo Freitas (2005), produzidos por 5, 10 e 20 dias em ágar Fava-Netto modificado.

Antígeno		5 dias	10 dias	20 dias
PI 01	10x []	65,78 mg/mL	69,17 mg/mL	71,09 mg/mL
PI 01	20x []	216,55 mg/mL	235,15 mg/mL	243,39 mg/mL
PI 66	10x []	58,07 mg/mL	63,63 mg/mL	76,86 mg/mL
PI 66	20x []	133,16 mg/mL	212,26 mg/mL	256,36 mg/mL
PI 8334	10x []	69,93 mg/mL	69,08 mg/mL	159,09 mg/mL
PI 8334	20x []	210,29 mg/mL	230,19mg/mL	274,85 mg/mL

G.1.2. Dosagem protéica dos antígenos obtidos segundo Freitas (2005) em ágar Sabouraud-Dextrose

Dosagem protéica, segundo Bradford (1976) dos antígenos de *P.lutzii* obtidos segundo Freitas (2005), produzidos por 5, 10 e 20 dias em ágar Sabouraud-Dextrose

Antígeno		5 dias	10 dias	20 dias
PI 01	10x []	25,10 mg/mL	26,21 mg/mL	25,97 mg/mL
PI 01	20x []	44,97 mg\ mL	54,87 mg/mL	49,06 mg/mL
PI 66	10x []	29,63 mg\ mL	36,52 mg/mL	39,07 mg/mL
PI 66	20x []	57,60 mg/mL	65,34 mg/mL	132,94 mg/mL
PI 8334	10x []	29,96 mg\ mL	30,78 mg\ mL	32,80 mg\ mL
PI 8334	20x []	62,06 mg\ mL	68,18 mg\ mL	60,47 mg/mL

G.1.3. Dosagem protéica dos antígenos obtidos segundo Assis et al (1998) e sua versão modificada em ágar Fava-Netto modificado.

Dosagem protéica, segundo Bradford (1976) dos antígenos CFA de *P.lutzi* obtidos segundo Assis et al (1998) e sua versão modificada produzidos por 5, 10 e 20 dias em ágar Fava-Netto modificado

Antígeno	5 dias	10 dias	20 dias
PI 01 C	19,31 mg/mL	19,36 mg/mL	16,12 mg/mL
PI 01 M	8,82 mg/mL	12,68 mg/mL	17,70 mg/mL
PI 66 C	10,95 mg/mL	15,02 mg/mL	17,17 mg/mL
PI 66 M	16,63 mg/mL	15,70 mg/mL	14,23 mg/mL
PI 8334 C	8,82 mg/mL	13,53 mg/mL	19,31 mg/mL
PI 8334 M	8,90 mg/mL	13,77 mg/mL	24,94 mg/mL

C: Antígenos obtidos segundo Assis et al (1998)
M: Antígenos do tipo CSSEPC modificado
-: Não realizado

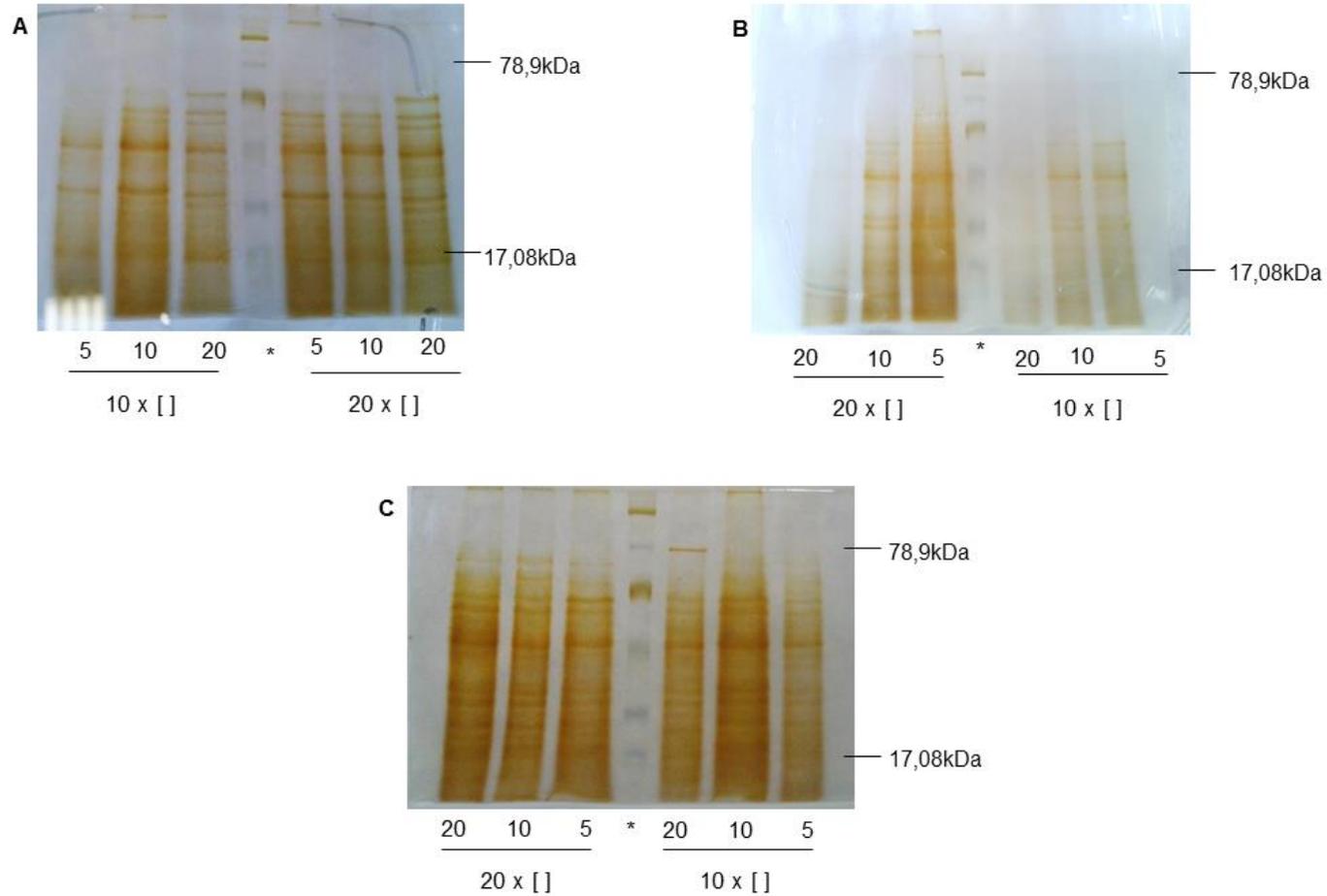
G.1.4. Dosagem protéica dos antígenos obtidos segundo Assis et al (1998) e sua versão modificada em ágar Sabouraud-Dextrose.

Dosagem protéica, segundo Bradford (1976) dos antígenos CFA de *P.lutzi* obtidos segundo Assis et al (1998) e sua versão modificada produzidos por 5, 10 e 20 dias em ágar Sabouraud-Dextrose

Antígeno	5 dias	10 dias	20 dias
PI 01 C	4,78 mg/mL	3,80 mg/mL	4,78 mg/mL
PI 01 M	3,77 mg/mL	3,22 mg/mL	4,26 mg/mL
PI 66 C	3,29 mg/mL	5,65 mg/mL	7,75 mg/mL
PI 66 M	2,46 mg/mL	4,24 mg/mL	4,82 mg/mL
PI 8334 C	3,48 mg/mL	7,42 mg/mL	9,12 mg/mL
PI 8334 M	2,99 mg/mL	7,9 mg/mL	11,50 mg/mL

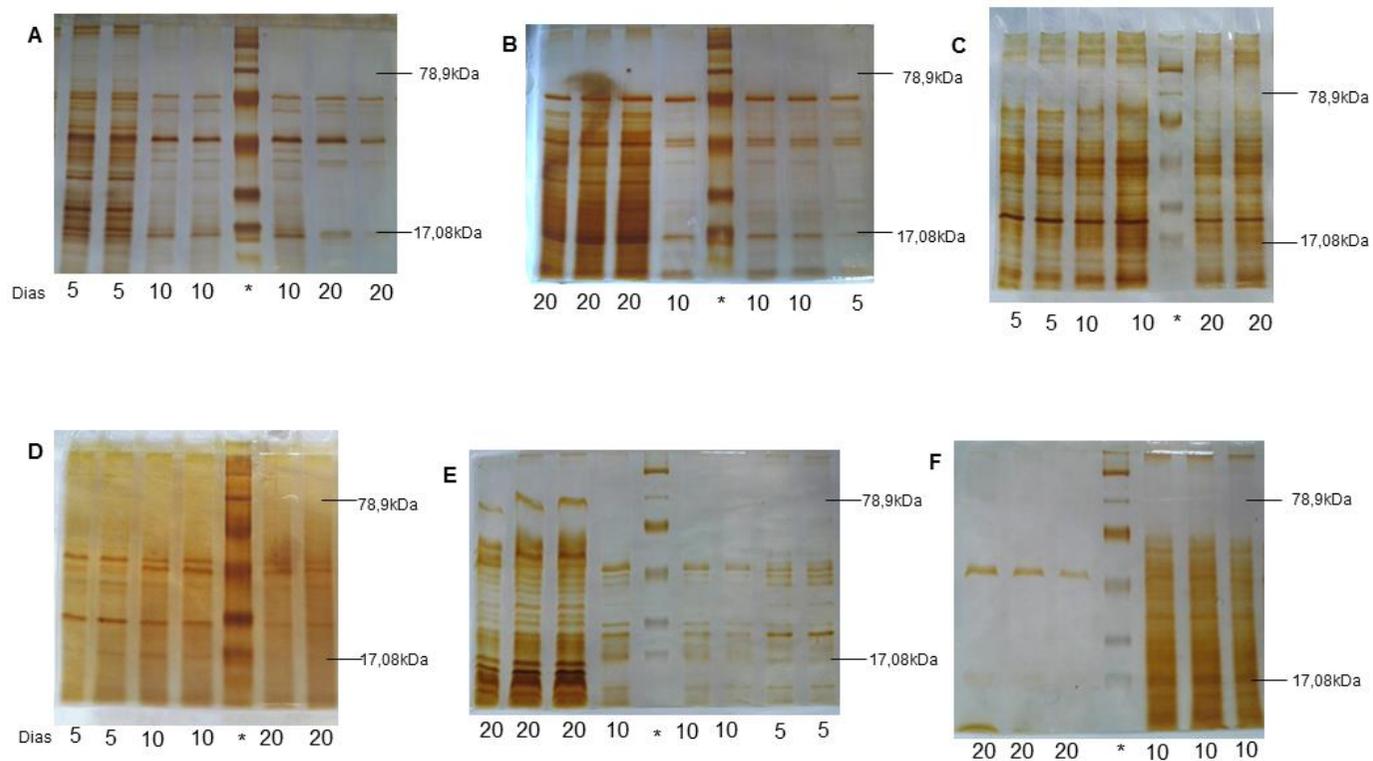
C: Antígenos obtidos segundo Assis et al (1998)
M: Antígenos do tipo CSSEPC modificado

Anexo H: Perfil eletroforético dos antígenos obtidos segundo Freitas (2005) em ágar Fava-Netto modificado



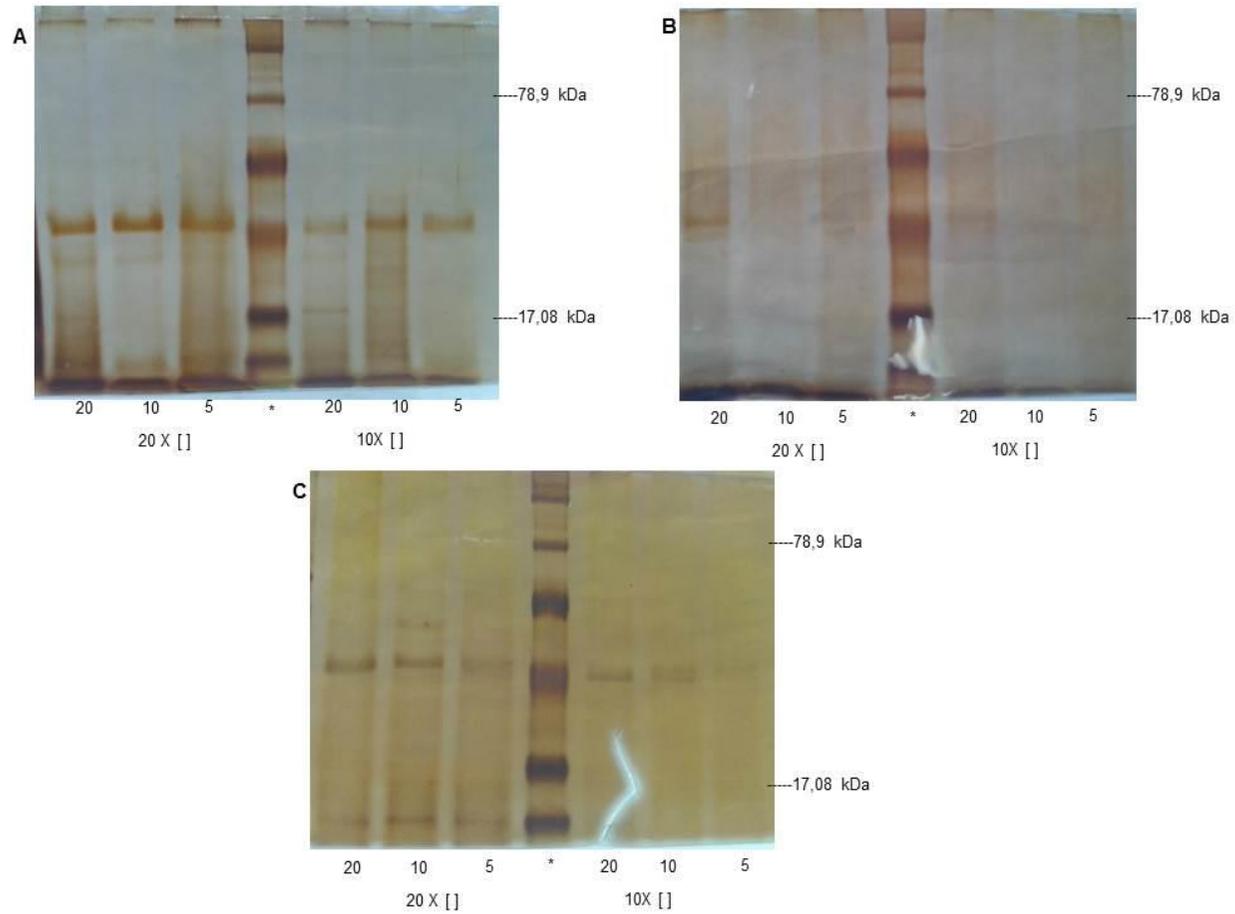
A) Th 01, B) Th 66, C) Th 8334, *padrão de peso molecular.

Anexo I: Perfil eletroforético dos antígenos obtidos segundo Assis et al (1998) e sua versão modificada em ágar Fava-Netto modificado.



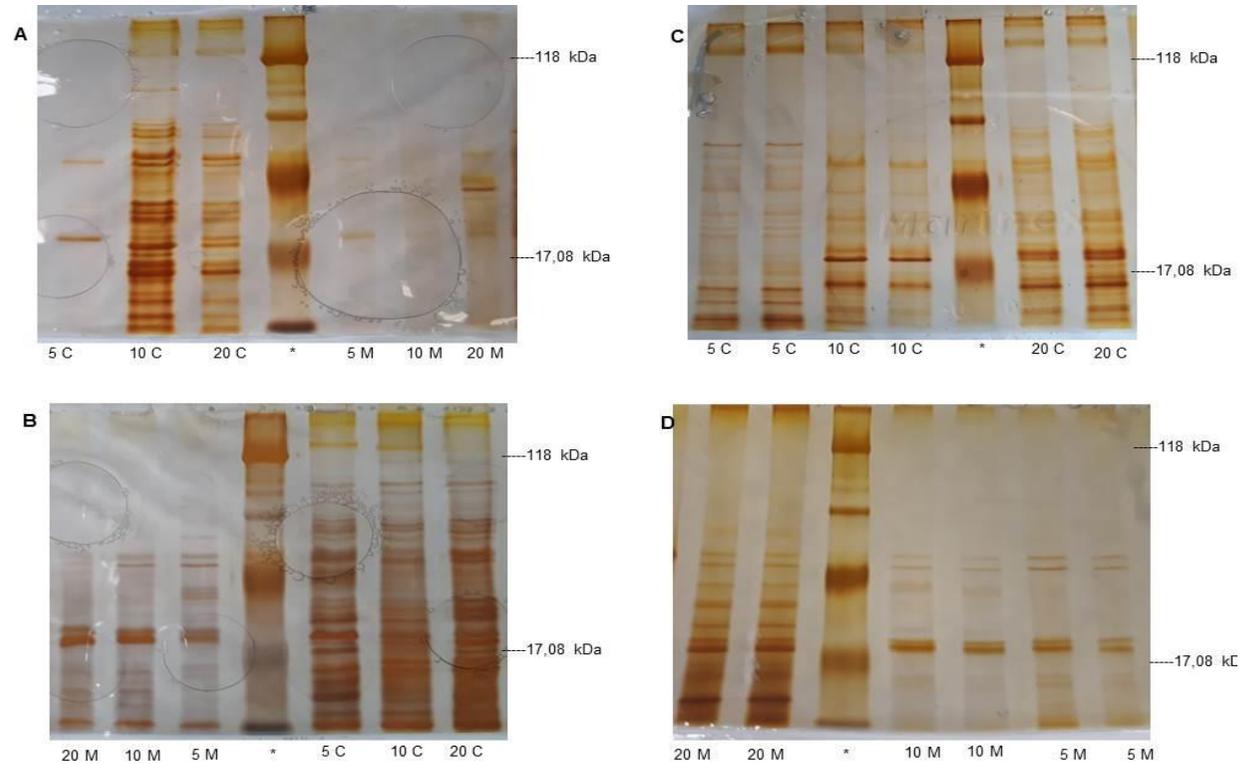
A) CSSEPC-C 01, B) CSSEPC-M 01, C) CSSEPC-C 66, D) CSSEPC-M 66, E) CSSEPC-C 8334 F) CSSEPC-M 8334. Onde: C é convencional e M é modificado. * Padrão de Peso Molecular

Anexo J: Perfil eletroforético dos antígenos obtidos segundo Freitas (2005) em Sabouraud-dextrose



A) Th 01, B) Th 66, C) Th 8334, *padrão de peso molecular.

Anexo K: Perfil Eletroforético dos antígenos obtidos segundo Assis et al (1998) e sua versão modificada em ágar Sabouraud dextrose.



A) CSSEPC-C e M de 01, B) CSSEPC-C e M de 8334, C) CSSEPC-C de 66, D) CSSEPC-M de 66.
Onde: C é convencional e M é modificado e * Padrão de Peso Molecular

Anexo L: Massas moleculares estimadas, em kDa, dos antígenos obtidos segundo Freitas (2005) em A) ágar Fava-Netto modificado B) ágar Sabouraud-dextrose.

A)

Antígenos	Frações
Th 01	16, 18, 21, 22, 24, 27, 29, 33, 35, 39, 40, 45, 49, 54, 61, 72
Th 66	14, 17, 18, 21, 25, 28, 34, 39, 40, 42, 45, 49, 55, 61, 65, 70, 106
Th 8334	15, 17, 19, 21, 23, 26, 29, 34, 37, 40, 46, 51, 56, 64, 74, 80

B)

Antígenos	Frações
Th 01	19, 21, 23, 25, 26, 29, 32, 34, 35, 37, 41,47
Th 66	37, 41, 53
Th 8334	18, 23, 36, 44, 64

Anexo M: Massas moleculares estimadas, em kDa, dos antígenos obtidos segundo Assis et al. (1998) e sua versão modificada em A) ágar Fava Netto modificado e B)) ágar Sabouraud-dextrose.

A)

Antígenos	Frações
CSSEPC-C 01	13, 16, 17, 19, 21, 23, 29, 30, 34, 37, 42, 47, 49, 51, 52, 55, 58, 62, 69, 89, 94, 116.
CSSEPC-M 01	13, 15, 16, 17, 22, 24, 28, 31, 34, 35, 37, 40, 42, 45, 50, 52, 54, 62.
CSSEPC-C 66	12, 14, 16, 18, 20, 22, 23, 25, 28, 30, 35, 37, 41, 46, 49, 56, 62, 66, 86, 91, 106, 112.
CSSEPC-M 66	17, 24, 35, 39, 44, 101.
CSSEPC-C 8334	14, 16, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 30, 32, 34, 37, 39, 44, 46, 53, 58, 63, 70, 77, 116.
CSSEPC-M 8334	16, 18, 22, 27, 30, 35, 44, 46, 54, 60.

B)

Antígenos	Frações
CSSEPC-C 01	8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 27, 30, 32, 37, 40, 43, 48, 50, 58, 61, 80, 81, 85, 98, 139.
CSSEPC-M 01	19, 23, 26, 28, 30, 34, 40.
CSSEPC-C 66	11, 12, 13, 14, 16, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 28, 33, 36, 38, 42, 43, 47, 51, 53, 54, 59, 80.
CSSEPC-M 66	13, 14, 15, 20, 22, 24, 29, 30, 35, 41, 45, 47, 55.
CSSEPC-C 8334	8, 9, 11, 13, 14, 17, 18, 20, 23, 25, 28, 30, 33, 36, 39, 45, 49, 50, 53, 56, 58, 65, 68, 75, 81, 88, 101, 120, 144.
CSSEPC-M 8334	9, 10, 12, 13, 14, 15, 19, 21, 23, 28, 29, 31, 39, 42, 50.

Anexo N: Caracterização das amostras de soro de pacientes com reatividade frente a antígeno de *P. brasiliensis*

AM	Idade	Sexo	Procedência	ID frente a antígeno de <i>P. brasiliensis</i>
1PB	NI	NI	Sorocaba (SP)	1:4096
2PB	67	M	Sorocaba (SP)	1:1024
3PB	NI	NI	Angatuba (SP)	1:1024
4PB	NI	NI	Campinas (SP)	1:1024
5PB	NI	NI	Sorocaba (SP)	1:512
6PB	NI	NI	Ribeirão Preto (SP)	1:512
7PB	NI	NI	NI	1:512
8PB	NI	NI	Campinas (SP)	1:512
9PB	NI	NI	Sorocaba (SP)	1:256
10PB	NI	NI	São José dos Campos (SP)	1:256
11PB	NI	NI	Campinas (SP)	1:256
12PB	28	M	São Paulo (SP)	1:256
13PB	NI	NI	Campinas (SP)	1:128
14PB	NI	NI	Campinas (SP)	1:128
15PB	NI	NI	Ribeirão Preto (SP)	1:128
16PB	NI	M	Taubaté (SP)	1:128
17PB	NI	NI	Sorocaba (SP)	1:64
18PB	NI	NI	Sorocaba (SP)	1:64
19PB	NI	NI	Sorocaba (SP)	1:64
20PB	NI	NI	Sorocaba (SP)	1:64
21PB	NI	M	NI	1:128
22PB	25	M	NI	1:32
23PB	16	M	Sorocaba (SP)	1:128
24PB	24	m	NI	1:256

(R): Reagente (NR): Não Reagente (NI): Não informado

Anexo O: Caracterização das amostras de soro de pacientes com ausência de reatividade frente a antígeno de *P. brasiliensis*

Amostra	Idade	Sexo	Procedência	N° de exames com ausência de reatividade frente ao Ag de <i>P.brasiliensis</i>	Data da última amostra
NEG1	35	F	São Paulo (SP)	2	11.10.2017
NEG2	61	M	São Paulo (SP)	15	10.10.2017
NEG3	17	M	Piracicaba (SP)	4	06.10.2017
NEG4	32	M	São Paulo (SP)	2	28.09.2017
NEG5	42	F	São Paulo (SP)	2	28.08.2017
NEG6	80	M	Jundiaí (SP)	2	21.09.2017
NEG7	19	M	Sorocaba (SP)	2	21.09.2017
NEG8	54	F	Sorocaba (SP)	4	21.09.2017
NEG9	65	M	Campinas (SP)	2	21.09.2017
NEG10	64	M	São José do Rio Preto (SP)	2	01.09.2017

(R): Reagente (NR): Não Reagente (NI): Não informado

Anexo P: Caracterização das amostras de soro histórico sorológico de reatividade frente ao antígeno de *P. brasiliensis*, porém com ausência de reatividade frente à última avaliação sorológica.

Amostra	Idade	Sexo	Procedência	Data da última amostra
1H	67	M	NI	30.03.17
2H	66	M	Campinas (SP)	03.04.2017
3H	9	M	NI	19.04.2017
4H	45	F	Jundiaí (SP)	27.04.2017
5H	73	M	NI	04.05.2017
6H	56	M	Jundiaí (SP)	23.02.17
7H	64	M	Batatais (SP)	28.03.2017
8H	53	M	NI	16.03,2017
9H	53	M	Jundiaí (SP)	09.03.2017
10H	45	F	Jundiaí (SP)	23.03.2017

(R): Reagente (NR): Não Reagente (NI): Não informado

Anexo Q: Caracterização das amostras de soro dos pacientes com paracoccidiodomicose confirmada ou com suspeita clínica da doença, porém sem avaliação sorológica, provenientes do estado Rondônia.

AM	Idade	Sexo	Micológico	Histopatológico	Cultura
1RO	66	M	Positivo	Não realizado	Negativo
2RO	NI	M	NI	NI	NI
3RO	52	M	Positivo	Positivo	Não realizado
4RO	39	M	Positivo	Não realizado	Não realizado
5RO	61	M	Positivo	Positivo	Não realizado
6RO	NI	F	NI	NI	NI
7RO	NI	M	Positivo	Positivo	NI
8RO	67	M	NI	NI	NI
9RO	NI	M	NI	NI	NI
10RO	NI	M	NI	NI	NI
11RO	31	M	Positivo	Não realizado	NI
12RO	47	M	Não realizado	Positivo	Não realizado
13RO	46	M	Não realizado	Positivo	Não realizado
14RO	NI	M	NI	NI	NI
15RO	NI	M	NI	NI	NI
16RO	68	M	Positivo	Não realizado	Não realizado
17RO	NI	M	NI	NI	NI
18RO	50	M	Positivo	Não realizado	Não realizado
19RO	51	M	Positivos	Não realizado	Não realizado
20RO	57	M	Positivos	Não realizado	Não realizado
21RO	NI	M	NI	NI	NI

NI: Não Informado

Anexo R: Caracterização das amostras de soro dos pacientes com paracoccidiodomicose confirmada, porém com ausência de reatividade frente ao antígeno de *P. brasiliensis* provenientes do estado Mato Grosso do Sul

AM	Micológico	Histopatológico	Cultura
J	Positivo	Positivo	Não realizado
L	Positivo	Positivo	Não realizado
M	Não realizado	Positivo	Não realizado
N	Negativo	Positivo	Negativo
O	Negativo	Positivo	Não realizado

Anexo S: Caracterização das amostras de soro dos pacientes com suspeita de paracoccidioidomicose proveniente de área potencialmente endêmica para *P. lutzii*.

Amostra	Idade	Sexo	Procedência
1M	NI	M	Campo Grande-MS
2M	NI	M	Campo Grande-MS
3M	NI	M	Campo Grande-MS
4M	NI	F	Campo Grande-MS
5M	NI	F	Campo Grande-MS
6M	40	M	Campo Grande-MS
7M	40	M	Campo Grande-MS
8M	33	M	Dourados-MS
9M	67	M	Campo Grande-MS
10M	58	M	Dourados-MS
11M	50	M	Campo Grande-MS
12M	84	M	Campo Grande-MS
13M	54	M	Campo Grande-MS
14M	65	M	Campo Grande-MS
15M	40	M	Campo Grande-MS
16M	65	M	Botaguaçu- MS
17M	47	F	Dourados-MS
18M	55	M	Campo Grande-MS
19M	66	M	Campo Grande-MS
20M	NI	M	Campo Grande-MS
21M	50	M	Campo Grande-MS
22M	44	M	Campo Grande-MS
23M	60	M	Campo Grande-MS
24M	21	F	Campo Grande-MS
25M	61	F	Campo Grande-MS
26M	71	M	Campo Grande-MS
27M	NI	M	Cuiabá-MT
28M	35	F	Castanheira-MT
29M	17	M	Castanheira-MT
30M	45	M	Castanheira-MT
31M	74	M	Campo Grande-MS
32M	4	M	Campo Grande-MS
33M	24	M	Campo Grande-MS
34M	67	M	Campo Grande-MS
35M	24	F	Campo Grande-MS
36M	29	M	Campo Grande-MS
37M	80	M	Campo Grande-MS
38M	28	M	Campo Grande-MS
39M	69	M	Campo Grande-MS
40M	91	M	Campo Grande-MS
41M	49	F	Campo Grande-MS
42M	17	M	Campo Grande-MS
43M	21	M	Campo Grande-MS
44M	59	M	Campo Grande-MS
45M	19	M	Campo Grande-MS
46M	52	M	Campo Grande-MS
47M	NI	F	Campo Grande-MS
48M	56	M	Campo Grande-MS
49M	49	M	Campo Grande-MS
50M	28	M	Campo Grande-MS
51M	NI	M	Campo Grande-MS

NI: Não informado

Anexo T: Caracterização das amostras de soro dos pacientes com acompanhamento sorológico para aspergilose

AM	Idade	Sexo	Procedência	ID frente ao Ag de <i>A. fumigatus</i>
1AF	62	M	Boituva (SP)	1:1
2AF	58	F	Campinas (SP)	1:2
3AF	63	M	São Paulo (SP)	1:4
4AF	54	M	São Paulo (SP)	1:4
5AF	66	M	Campinas (SP)	1:8
6AF	46	F	Sorocaba (SP)	1:16
7AF	42	F	São José dos Campos (SP)	1:32
8AF	NI	NI	NI	1:16
9AF	38	M	São Paulo (SP)	1:64
10AF	58	M	Campinas (SP)	1:128

(R): Reagente (NR): Não Reagente (NI): Não informado

ANEXO U: Caracterização das amostras de soro dos pacientes com acompanhamento sorológico para histoplasrose

AM	Idade	Sexo	Procedência	ID frente ao Ag de <i>H. capsulatum</i>
1HC	31	M	Iguape (SP)	Reatividade fraca
2HC	46	M	São Paulo (SP)	1:1
3HC	41	M	São Paulo (SP)	1:2
4HC	35	M	São Paulo (SP)	1:4
5HC	38	M	São Paulo (SP)	1:8
6HC	34	M	Campinas (SP)	1:16
7HC	60	M	NI	1:16
8HC	NI	F	NI	1:32
9HC	NI	NI	NI	1:64
10HC	NI	M	NI	1:128

(R): Reagente (NR): Não Reagente (NI): Não informado