FRANCIELE AYUMI SEMENCIO CHIYODA-RODINI

ANTIGENÚRIA, NÍVEIS DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE PULMÕES EM RATOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM PARACOCCIDIOIDES LUTZII E PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS

Londrina
2020

FRANCIELE AYUMI SEMENCIO CHIYODA-RODINI

ANTIGENÚRIA, NÍVEIS DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE PULMÕES EM RATOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM PARACOCCIDIOIDES LUTZII E PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Eiko Nakagawa Itano

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C543a Chiyoda-Rodini, Franciele Ayumi Semencio.
Antigenúria, níveis de anticorpos específicos e análise histopatológica de pulmões em ratos experimentalmente infectados com Paracoccidioides lutzii e Paracoccidioides brasiliensis : Antigenuria, specific antibody levels and lungs histopathological analysis in rats experimentally infected with Paracoccidioides lutzii and Paracoccidioides brasiliensis. / Franciele Ayumi Semencio Chiyoda-Rodini. - Londrina, 2020.
67 f. : il.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.
Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Antígenos - Tese. 2. Gp70 - Tese. 3. Paracoccidioidomicose - Tese. 4. Fator de Virulência - Tese. I. Itano, Eiko Nakagawa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

FRANCIELE AYUMI SEMENCIO CHIYODA-RODINI

ANTIGENÚRIA, NÍVEIS DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE PULMÕES EM RATOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM PARACOCCIDIOIDES LUTZII E PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

_____
Orientadora: Prof. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

_____
Prof. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina – UEL

_____
Profa. Dra. Adriane Lenhard-Vidal
Centro Universitário Campo Real

_____
Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina – UEL

_____
Prof. Dr. Emerson Jose Venancio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 19 de outubro de 2020.

Dedico este trabalho aos meus filhos Francisco, Vicente e Angelina,

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora doutora Eiko Itano Nakagawa pela inestimável generosidade, apoio e compreensão ao direcionar meu trabalho.

À Adriane Lenhard Vidal, Janeth J. Escobar Arcos, e Bianca D. Oliveira Souza, que participaram diretamente do desenvolvimento da presente tese.

À Nilson de Jesus Carlos, Mári Sumigawa Kaminami, Luciene Airy Nagashima, Fernanda Akemi Nakanishi-Ito, Katia K. Oshiro,Solange Ramos, Wander Pavanelli, Paula Leonello Álvares e Silva, Lilian Cristina Vessoni Iwaki, Fabiana Filipin Rigobello, Cláudia Yuri Akagi, Willian do Rosário Andrade Silva Cabral, Bruno Alexandre Sekiguchi, Tânia Maris Pedrini Soares da Costa, Fernando Cezar dos Santos, Flávia Bender, João Paulo Assolini, Angelica Tiemi Ishikawa, Flavia Paola Wagner Félix, Cassia Reiko Takabayashi, Gabriela Oliveira, Jean Yamamoto, Shahzad Akbar Khan, Maria Catarina Cavalcanti Fracazzo; Fernando Galdino Ricci; Isabele Kazahaya Borges, Giovana Carvalho, Rafaela Macagnan, Aline Myuki Omori, Amanda de Faveri Pitz; Denise Turini Marioto e a todos que fizeram parte da equipe do laboratório, pela amizade e parceria no desenvolvimento dessa tese.

Aos professores doutores Elisa Yoko Hirooka, Emerson José Venâncio, Helena Kaminami Morimoto; Mário Augusto Ono, Maria Angélica Ehara Watanabe, Zuleica Naomi Tano, pelas contribuições para realização deste trabalho.

Ao Corpo Docente do Curso de Graduação em Farmácia em especial Alessandra Miyuki Okino, Valter Abou Murad e Eliana Carolina Vespero.

À todos os Doscentes e colaboradores do Curso de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, responsáveis pela minha formação acadêmica.

Aos discentes do curso e todos os colegas de turma e amigos que compartilharam suas experiências pessoais e acadêmicas.

Aos meus pais Mauro e Marcia, meu irmão Felipe, minha avós Irene e Mitoma pelo incentivo aos estudos. Ao meu esposo Alfredo, aos meus filhos Francisco, Vicente e Angelina, por tanto amor e carinho.

A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita. Aprendi através da experiência amarga a suprema lição: controlar minha emoção e torná-la como o calor, que é convertido em energia. Nossas emoções, quando controladas podem ser convertidas numa força capaz de mover o mundo.

Mahatma Gandhi

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina e contou com apoio financeiro da CAPES, PPSUS/Fundação Araucária, MEC PROEXT, PROEXT/UEL, PROPPG/UEL.

CHIYODA RODINI, Franciele Ayumi Semêncio. **Antigenúria, níveis de anticorpos específicos e análise histopatológica de pulmões em ratos experimentalmente infectados com Paracoccidioides lutzii e Paracoccidioides brasiliensis.** 2020. 68 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis e a nova espécie Paracoccidioides lutzii são os agentes causadores da paracoccidioidomicose (PCM), importante micose sistêmica amplamente distribuída na América Latina. A glicoproteína Gp43, é o principal fator de virulência e é considerada padrão ouro no diagnóstico de P. brasiliensis. Porém tal glicoproteína é expressa em níveis não detectáveis em isolados de P. lutzii, além disso, os dados relativos ao desenvolvimento da doença por PCM devido a esses fungos são escassos. No presente estudo, comparou-se o efeito da infecção em ratos pelo fungo P. lutzii (LDR2), não produtor de gp43 e por P. brasiliensis (Pb18). Grupos de 5 ratos Wistar infectados (3x106 leveduras, i.v.) e grupo controle inoculado com PBS, foram eutanasiados 14, 28 e 56 dias após a infecção. As amostras de urina foram analisadas por eletroforese, imunotransferência (IB) e a concentração de antígenos urinários totais e de gp70 determinados por ensaio imunoenzimático competitivo indireto (icELISA), utilizando anticorpos policlonais anti-CFA de P. lutzii e anti-CFA de P. brasiliensis e anticorpo monoclonal anti-gp70, respectivamente. Os níveis séricos de anticorpos IgG foram avaliados por ELISA e análise histológica de pulmão por coloração com Grocott. Por eletroforese e IB, observou-se perfil distinto de bandas de antígenos entre as infecções por P. lutzii e P. brasiliensis. Por icELISA, os níveis urinários de antígenos totais (CFA) foram significativamente maiores em ratos infectados por P. brasiliensis em relação ao P. lutzii, em todos os períodos analisados ($P<0.05$). Houve aumento em níveis de gp70 em todos os períodos analisados para ambos os grupos infetados, em relação ao grupo controle ($p<0.05$), porém em 28 dias de infecção o nível foi maior em infectado por P. lutzii ($p<0.05$). Níveis séricos elevados de anticorpos IgG foram detectados em ambos, porém significativamente mais elevado em infectados por P. brasiliensis ($p<0.05$). Pela análise histológica foi observada a presença de fungos em todos os 8 períodos em ambos os grupos, todavia em maior quantidade em animais infectados por P. brasiliensis Pb18. Em conclusão, P. lutzii (LDR2) possivelmente induz a PCM doença controlada, menos grave que a induzida por P. brasiliensis em ratos, o que requer mais estudos. Este estudo evidenciou pela primeira vez os principais antígenos P. lutzii presentes em urinas de ratos infectados com P. lutzii (LDR2).

Palavras chave: Antígenos. gp70. Parcoccidioidomicose. Fator de virulência.

CHIYODA-RODINI, Franciele Ayumi Semencio. **Antigenuria, specific antibody levels and lungs histopathological analysis in rats experimentally infected with Paracoccidioides lutzii and Paracoccidioides brasiliensis.** 2020. 68 p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis and new specie Paracoccidioides lutzii are the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), an important widespread systemic mycoses in Latin America. Gp43, the main diagnostic/virulence factor of P. brasiliensis, is often absent in P. lutzii isolates and the data concerning the development of PCM disease due to this fungi are scarce. In the present study it was compared the effect of infection of rats with a non-gp43 producer P. lutzii (LDR2) and P. brasiliensis (Pb18). Groups of 5 Wistar rats were infected or inoculated with PBS (control), and euthanized 14, 28 and 56 days post infection. Urine samples were analyzed by electrophoresis, immunoblotting (IB) and the concentration of total urinary antigens and gp70 determined by indirect competitive enzyme immunoassay (icELISA), using polyclonal antibodies to CFAs from P. brasiliensis and from P. lutzii and monoclonal antibody anti-gp70, respectively. Serum IgG antibodies were assessed by ELISA and histological lung analysis by Grocott staining. It was detected distinct urine antigens profile between rats infected by P. lutzii and P. brasiliensis by electrophoresis and immunoblotting. By icELISA, higher urinary levels of total antigens (CFA) in rats infected with P. brasiliensis in relation to P. lutzii, were 9 observed in all analyzed periods ($P < 0.05$). There was an increase in gp70 levels in all periods analyzed for both infected groups, in relation to the control group ($p < 0.05$), however at 28 days higher level was detected in infected with P. lutzii ($p < 0.05$). Higher serum IgG antibody levels were detected in both, but higher in those infected with P. brasiliensis ($p < 0.05$). By lung histological analysis it was detected fungi in both groups, in all periods, but in greater quantities, in animals infected with P. brasiliensis. In conclusion, P. lutzii (LDR2) possibly induces controlled PCM disease, less severe than induced by P. brasiliensis Pb18 in rats, which requires further studies. This study evidenced by first time the urinary P. lutzii (LDR2) antigens in experimental PCM.

Keywords: Antigens. gp70. Mycoses. Paracoccidioidomycosis. Virulence factor.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1 Gel electrophoresis (1A) and Immunoblotting (1B) of pool of urine sample from rats infected with P. lutzii (LDR2).....37
Figure 2 Gel electrophoresis (2A) and Immunoblotting (2B) of urine sample of group of rats infected with P. brasiliensis (Pb18).....38
Figure 3 Urinary gp70 levels by icELISA.....39
Figure 4 Urinary Paracoccidioides spp CFA levels by icELISA.....40
Figure 5 Serum from infected groups by iELISA. 41
Figure 6 Serum IgG levels in P. lutzii and P. brasiliensis infected rats to P. restrepiensis B339 (Biotinilated).....42
Figure 7 Serum IgG levels in P. lutzii and P. brasiliensis infected rats.....43
Figure 8 Lung histopathology of rat infected with P. lutzii (LDR2).....44
Figure 9 Lung histopathology of rat infected with P. brasiliensis.....44
Figure 10 Lung histological section from of rat infected with P. lutzii (A-C) and P. brasiliensis (D-F), stained with Grocott.....45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Anti-CFA	Anticorpo contra o antígeno livre de célula
Anti-gp43	Anticorpo contra a glicoproteína de 43 kDa
Anti-gp70	Anticorpo contra a glicoproteína de 70 kDa
Anti-IgG	Anticorpo contra imunoglobulina G
BAL	Lavado bronco alveolar
BHI	Ágar infusão cérebro e coração
BSA	Albumina de soro bovino
CIE	Contraimunoeletroforese
CFA	Antígeno solúvel
CD4+	Linfócito T CD4+
CD8+	Linfócito T CD8+
CD14++	Linfócito T CD14++
CD16++	Linfócito T CD16++
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ExoAg	Exoantígeno de Paracoccidioides sp.
gp43	Glicoproteína de 43 kDa
gp70	Glicoproteína de 70 kDa
h	Horas
H&E	Hematoxilina-Eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
IB	Immunoblot
iELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
icELISA	Ensaio imunoenzimático de competição indireto
ID	Imunodifusão
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN-γ	Interferon gama IFM Banco de fungos do Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba,Japão
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG2	Imunoglobulina G subclasse 2
IgG4	Imunoglobulina G subclasse 4

IL-1β	Interleucina 1 subclasse β
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
i.v.	Intravenososa
kDa	Quilodaltons
LDR2	Isolado da espécie de P. lutzii
M	Molar
mA	Miliamperes
Mab	Anticorpo monoclonal (Monoclonal antibody)
MGC	Células Gigantes Multinucleadas
Min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MM	Massa molecular
mM	Milimolar
mol	Mol
mmol/L	Milimol por litro
MW	Peso Molecular (Molecular weight)
N	Normal
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
NPCM	Neuroparacoccidioidomicose
O.D	Optical density units
OPD	Orto-fenilenediamina (Ortho-Phenylenediamine)
PAS	Ácido periódico de Shiff
PBS	Solução fosfato salina tamponada
P	americana Espécie Paracoccidioides americana (PS2)
P	brasiliensis Espécie Paracoccidioides brasiliensis (S1)
Pb 18	Cepa da espécie críptica S1 de Paracoccidioides brasiliensis
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PCM	Paracoccidioidomicose
pH	Potencial hidrogênico
PS2	Espécie críptica de Paracoccidioides americana
PS3	Espécie críptica de Paracoccidioides venezuelensis
PS4	Espécie críptica de Paracoccidioides restrepiensis
P. lutzii	Espécie Paracoccidioides lutzii
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil (phenylmethylsulfonyl fluoride)
PR	Estado Paraná
P	restrepiensis Espécie Paracoccidioides restrepiensis (PS4)
P	venezuelensis Espécie Paracoccidioides venezuelensis (PS3)
r.t	(Room temperature)
rpm	Rotações por minuto
S1	Espécie críptica de Paracoccidoides brasiliensis S1a e S1b
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
Th9	Linfócito T helper 9
Th17	Linfócito T helper 17
TMB	3;3;5;5-tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
U	Unidades
UEL	Universidade Estadual de Londrina
Mg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
V	Volts
v/v	volume/volume
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 24

3 OBJETIVO 29

3.1 OBJETIVO GERAL 29

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29

4 ARTIGO 1: EXPERIMENTAL PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS WITH PARACOCCIDIOIDES LUTZII AND P. BRASILIENSIS IN RATS: URINARY ANTIGENS, SPECIFIC ANTIBODY LEVELS AND LUNG HISTOPATHOLOGY 30

4.1 INTRODUCTION 31

4.2 MATERIAL AND METHODS 33

4.2.1 Fungal Strain 33

4.2.2 Antigens And Antibodies 33

4.2.3 Experimental Infection 33

4.2.4 Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Sds-Page) And Immunoblotting. 34

4.2.5 Urinary Gp70 Levels By Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Icelisa) 34

4.2.6 Urinary Paracoccidioides Spp Cfa Levels By Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Icelisa) 35

4.2.7 Autologous Serum Igg Levels By Indirect Elisa 35

4.2.8 Heterologous Serum Igg Levels By Indirect Elisa With Exoag From P. Restrepiensis B339 (Biotinilated) 36

4.2.9 Heterologous Serum Igg Levels By Indirect Elisa With Exoag From P. Restrepiensis B339 (Perixidase) 36

4.2.10 Lung Histopathology 36

4.2.11 Statistical Analysis 36

4.3 RESULTS 37

4.3.1 Sds-Page And Immunoblotting 37

4.3.2 Urinary Gp70 Levels By Icelisa....37
4.3.3 Urinary Paracoccidioides Spp Cfa Levels By Icelisa 39
4,3.4 Autologous Serum Igg Levels By Indirect Elisa 40
4.3.5 Heterologous Serum Igg Levels By Indirect Elisa With Exoag From P. Restrepiensis B339 (Biotinilated) 41
4.3.6 Heterologous Serum Igg Levels By Indirect Elisa With Exoag From P. Restrepiensis B339 (Peroxidase).... 41
4.3.7 Lung Histopathology....41
4.4 DISCUSSION 44
4.5 ACKNOWLEDGMENTS....47
4.6 CONFLICT OF INTEREST 47
4.7 REFERENCES....47

5 ARTIGO 2: ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE....52
5.1 INTRODUCÃO 54
5.2 REFERÊNCIAS....64

6 CONCLUSÕES GERAIS....68

INTRODUÇÃO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica granulomatosa, provocada por fungos termodimórficos, do gênero *Paracoccidioides* sp. Atualmente destacam-se as espécies *P. brasiliensis* (BRUMMER et al., 1993) e *P. lutzii* (THEODORO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2013).

Trata-se de uma doença restrita às regiões subtropicais e subtropicais da América Latina, sendo endêmica no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina (SAN-BLAS; NIÑO- VEGA, ITURRIAGA, 2002). A literatura relata 80% dos casos de PCM no território brasileiro, tornando o País o maior centro endêmico da doença, distribuídos nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste (CARRERO et al., 2008), e concentrados nos estados do Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais (COUTINHO et al., 2002), Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás (PANIAGO et al., 2003). Também há relato de ocorrência de casos em áreas de colonização mais recente, submetidas ao desmatamento, como na região da Amazônia (VIEIRA et al., 2014), atingindo os Estados do Maranhão, Tocantins, Pará, Rondônia, Acre e Amazonas, onde a PCM pode ser considerada uma micose sistêmica emergente (BRASIL, 2019). No Paraná, são registrados os maiores índices de mortalidade do Sul do Brasil (BITTENCOURT et al., 2005). No Brasil a taxa de mortalidade foi de 1,45 casos por milhão de habitantes entre 1980 e 1995 (COUTINHO et al., 2002).

Em 2005, houve implantação da vigilância epidemiológica das micoses sistêmicas endêmicas no país, pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. A PCM constitui a micose endêmica mais importante do país, por isso foram definidas as estratégias como o desenvolvimento de um sistema de vigilância sentinela, manejo clínico, estruturação da rede de diagnóstico, organização da rede de assistência e capacitação de recursos humanos. A vigilância epidemiológica destaca as seguintes recomendações: instituir a notificação compulsória dos casos (prováveis e elucidados laboratorialmente); criar um sistema de informações; disponibilizar acesso universal ao itraconazol e ao cotrimoxazol; estruturar a rede de cuidados básicos, pautados nos aspectos clínico-epidemiológicos e laboratoriais (cultura

e sorologia); aprimorar e ampliar a pesquisa de antígenos na rede pública de saúde; padronizar a técnica de sorologia para diagnóstico e seguimento em nível nacional; bem como criar um banco de dados de distribuição de diferentes espécies *Paracoccidioides* (MILLINGTON et al., 2018).

Paracoccidioides sp. são fungos patogênicos termodimórficos que exibem dois morfotipos: hifa e levedura. Apresenta-se na forma micelial ou filamentosa, com crescimento lento, após 20 a 30 dias de incubação entre 20 a 26°C, produzindo colônias brancas, pequenas e irregulares, cobertas por um curto micélio aéreo, composta por hifas finas e septadas, sendo esta, a provável forma encontrada no ambiente (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993). Entre 35 a 37 °C o fungo apresenta-se na forma de levedura (LACAZ et al., 2002). Macroscopicamente, as colônias apresentam aspecto rugoso e cerebriforme, visíveis a partir de 10 a 15 dias de cultivo. Microscopicamente, os blastoconídios são caracterizados por células globosas de tamanho variável, apresenta parede celular dupla e refringente, múltiplos brotamentos-exoesporulações, cercadas por células filhas, assemelhando-se a uma roda de leme. A temperatura é um fator importante no dimorfismo do *Paracoccidioides*, quando a proporção de α-1,3-glucana é maior do que a β-glucana encontra-se na forma de levedura (SAN-BLAS; NIÑO- VEGA, ITURRIAGA, 2002). Assim, a α-1,3-glucana, presente na célula da levedura pode atuar como uma proteção contra mecanismos de defesa do hospedeiro (SAN-BLAS; SAN-BLAS; SERRANO 1977). A PCM é mais frequente em homens do que em mulheres (proporção homem/mulher: 22:1), constatação que pode ser atribuída à proteção conferida pelo hormônio feminino 17-β-estradiol. No curso da infecção em camundongos machos e fêmeas, após infecção por conídios de *P. brasiliensis*, os machos apresentaram infecção de forma progressiva, enquanto as fêmeas controlaram a infecção. Esses resultados confirmaram que 17-β-estradiol confere proteção durante a primeira infecção em mulheres (ARISTIZÁBAL et al., 2002).

O gênero *Paracoccidioides* pertence ao Filo Ascomycota, Classe Euromycetes, Ordem Onygenales e Familia Ajellomycetaceae (Onygenaceae) (BAGAGLI et al., 2008). Compreendido por duas espécies: *P. brasiliensis*, considerado um complexo de quatro linhagens filogenéticas distintas (S1, PS2, PS3 e PS4), e *P. lutzii,* denominado anteriormente como 'Pb01-like' (MATUTE

et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2009; SALGADO-SALAZAR et al., 2010; THEODORO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2013). Recentemente, Turissini et al. (2017) propuseram uma nova ordem taxonômica para o complexo *Paracoccidoides*: *P. americana* para PS2, *P. restrepiensis* para PS3 e *P. venezuelensis* para PS4. A espécie críptica S1 (Pb18 e B339), encontrada no Brasil, Paraguai, Argentina, Venezuela e Peru, foi isolada de tatus (*Dasypus novemcinctus)*, pinguins e no solo das regiões endêmicas. O fungo também foi isolado de tatus da espécie *Cabassous centralis*, a partir de identificação molecular de um isolado (CORREDOR et al., 2005). A espécie PS2 apresenta menor virulência, porém, capaz de provocar a PCM em humanos e em modelos animais, distribuídas no Brasil e Venezuela. A espécie PS3 foi isolada de humanos e em tatus, encontrados na Colômbia (MATUTE et al., 2006). A espécie PS4 foi recentemente identificada em isolados clínicos na Venezuela (SALGADO-SALAZAR et al., 2010).

A espécie *P. lutzii* é encontrada com maior frequência nas regiões centro-oeste, sudeste e norte do Brasil e no Equador (CARRERO et al., 2008; THEODORO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2013). *P. brasiliensis* e *P. lutzii* foram detectados molecularmente em amostras de solo de tocas e nos ambientes habitados por tatus (ARANTES et al., 2016). Estudos filogenéticos sugerem que *P. brasiliensis*, *P. lutzii* e outros organismos dimórficos Ascomycota, como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *C. posadasii*, evoluíram, adaptando-se a dois nichos ecológicos distintos: o primeiro representado por condições saprofíticas naturais no solo, e a segunda representada pelos tecidos vivos dos hospedeiros animais (TEIXEIRA et al., 2014). Essa evolução pode ter induzido alterações genéticas irreversíveis nesses patógenos, resultando em duas diferentes espécies. No ambiente, *P. brasiliensis e P. lutzii* produzem propágulos infecciosos e é certo que essa fase saprofítica é transitória, ocorrendo somente em condições ambientais específicas, como abaixo da superfície do solo, em tocas e habitats protegidos (BAGAGLI et al., 2008).

Não existe transmissão inter-humana do fungo *Paracoccidioides* sp., nem de animais ao homem (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). No entanto, os indivíduos estão expostos ao risco por inalação de propágulos infectantes, dispersos no solo. Existem evidências indiretas de que *P. brasiliensis* cresce

preferencialmente entre 2-20 cm abaixo da superfície do solo, e após longos períodos de precipitação e aumento da umidade, ocorre maior liberação de esporos (BARROZO et al., 2010). Estudos experimentais sugeriram que a capacidade de produzir conídios infecciosos difere entre grupos genéticos de *Paracoccidioides*, que, por sua vez, podem determinar a incidência de infecção. Por exemplo, os genótipos S1 e PS2 ocorrem no sudeste do Brasil a uma taxa de 9: 1 (S1: PS2) e a produção de conídios foi identificada como sendo mais alta em isolados S1 do que PS2 em cultura. (THEODORO et al., 2012).

As avaliações de infecção fúngica em animais por *P. brasiliensis* foram realizadas principalmente utilizando testes sorológicos, a maioria desses estudos foi realizada no Sul e Sudeste do Brasil, as taxas de positividade observadas foram de 78% em cães de Botucatu (São Paulo, Brasil); 74% em cães de São Paulo (Estado de São Paulo, Brasil) (MÓS et a., 1974); e 90%, em cães de áreas rurais de Londrina (Paraná, Brasil) (ONO et al., 2001).

A infecção de animais por *P. lutzii* foi observada no Estado do Rio Grande do Sul, amostras de soro dos animais foram testadas por ELISA para detectar anticorpos anti-*P. lutzii*. Dos mais de 400 animais testados, 21,8% eram soropositivos para IgG anti - *P. lutzii*. Destes, 54 também foram positivos para *P. brasiliensis*. Um total de 10,5% dos cavalos, 28,8% dos cães e 9,5% dos mamíferos selvagens foi positivo apenas para *P. lutzii*. A detecção de anticorpos anti - *P. lutzii* em animais do Estado de Rio Grande do Sul sugere que o fungo pode ser encontrado no sul do Brasil, apesar de ser descrito principalmente no centro-oeste e sudeste do país (MENDES et al., 2017).

Inquéritos epidemiológicos indicam que 70% dos moradores das áreas endêmicas já foram expostos ao agente etiológico dessa micose, todavia apenas uma pequena porção desse número apresente alguma manifestação clínica (RESTREPO, 1985; MARQUES et al., 2007). A infecção possivelmente ocorre pela inalação de propágulos fúngicos aéreos que passa por conversão para fase leveduriforme nos pulmões e linfonodos, induzindo uma resposta no hospedeiro caracterizada pela formação de granulomas, que podem permanecer dormentes ou progredir para a doença, disseminando para baço, fígado, pele e mucosas (VALLE et al., 1995; TOBÓN et al., 2003). A inflamação granulomatosa é caracterizada pela presença de células gigantes

multinucleadas (MGC) e células epiteliódes, pode ser classificado como granuloma solto ou denso, incluindo corpo estranho e células gigantes de Langhans. Os fungos podem se reproduzir em macrófagos e células epiteliais, estimulando a resposta imune mediada por células (BORGES-WALMSLEY et al., 2002). Ocorre a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias interleucina-1 beta (IL-1b), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF-a), fator transformador de crescimento beta (TGF-b) e interleucina-10 (IL-10) (KUROKAWA et al., 2007).

Como observado em outras doenças causadas por patógenos intracelulares, o controle da PCM depende da eficiência da resposta imune celular (BENARD 2008). A internalização de muitos microrganismos patogênicos por células epiteliais pode estar associada à capacidade induzir o processo de fagocitose ineficiente, facilitando a disseminação do patógeno (FILLER AND SHEPPARD, 2006; MENDES-GIANINI et al., 2008).

Algumas proteínas de *Paracoccidioides* spp., conhecidas como adesinas, podem estar mediando o processo de invasão celular. A glicoproteína de 43 kDa (gp43) também pode participar da degradação da citoqueratina, levando à perda das características filamentosas e facilitando a invasão do hospedeiro (DE OLIVEIRA et al., 2015). *Paracoccidioides* spp. induzem apoptose quando invadem células epiteliais ou fagócitos, favorecendo a sobrevivência intracelular desta espécie fúngica (MENDES-GIANINI et al., 2006; SOUTO et al., 2003; KETELUT-CARNEIRO et al., 2015).

A PCM na forma aguda ou subaguda afeta predominantemente crianças, adolescentes e adultos jovens. A incidência tende a ser distribuída igualmente entre os sexos, principalmente entre a população infantil (BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2013). Esta forma clínica evolui rapidamente e se difunde para múltiplos órgãos e sistemas, envolve o sistema fagocítico-mononuclear, com presença de linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia. Os sintomas também podem incluir manifestações digestivas, lesões cutâneas (ou mucosas), envolvimento osteoarticulares. Febre, perda de peso e anorexia frequentemente acompanham a apresentação clínica. Raramente apresenta manifestações pulmonares. Em geral, os pacientes são diagnosticados algumas semanas após o início dos sintomas (FABRIS et al., 2014).

Os pacientes com a forma crônica exibem um perfil Th1/Th17 (DE CASTRO et al., 2013), os linfócitos Th1 efetores são recrutados para o local da infecção, produzem o IFN-y, o que melhora a ativação dos macrófagos. Este mecanismo pode levar a progressão da doença de forma menos grave que a forma aguda. Na resposta Th1 em infcções por *Paracoccidioides* spp., a morte celular pode ser induzida por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido por macrófagos (CALVI et al., 2003; CARMO et al., 2006). Os pacientes que apresentam a forma crônica da PCM podem apresentar sequelas, incluindo fibrose pulmonar, enfisema, disfonia e síndrome de Addison (WEBER et al., 2006, COSTA et al., 2013).

Nos pacientes com FC da doença, a reativação de focos latentes (reinfecção endógena) pode levar à progressão da doença. Independentemente disso, a resposta Th1 é mais preservada, pois a maioria deles possui testes cutâneos reativos à paracoccidioidina. Além disso, esses pacientes exibem aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, lL-1β e IL-17 e peróxido de hidrogênio. Embora esses mediadores sejam importantes para a eliminação do fungo, sua produção reflete a incapacidade do hospedeiro de limitar a infecção por *Paracoccidioides*. Os níveis de anticorpos também podem ser altos; no entanto, essa resposta é caracterizada por anticorpos isotípicos IgG1 e IgG2 (JUVENALE et al., 2001), que mostram alta capacidade de fixação de complemento e alta afinidade para os receptores FcR (IgG1> IgG2> IgG4).

A doença é usualmente diagnosticada por exames radiográficos para a detecção de lesões pulmonares. O diagnóstico clínico é realizado por análise de amostras biológicas como escarros, a partir da observação do material clínico clarificado com KOH 20%. Outros exames clínicos como análise micológica e histopatológica, coloração da prata (Gomori-Grocott) ou PAS - ácido periódico de Shiff. (BETHLEM et al., 1999; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Para o isolamento de *P. brasiliensis* são utilizados o ágar Sabouraud e BHI (FISHER; COOK, 2001; LACAZ et al., 2002). As desvantagens são o risco de contaminação e o tempo de incubação prolongado, podendo variar de uma a três semanas (SANO et al., 2001). O exame direto também apresenta baixa sensibilidade na visualização do fungo (SALINA et al., 1998). Exames

histopatológicos com o emprego da coloração de hematoxilina-eosina (H&E) e impregnação pela prata também são utilizados no diagnóstico da PCM, no qual é possível visualizar a célula mãe, circundada por inúmeras células filhas, característica das múltiplas exoesporulações do *P. brasiliensis* (LACAZ et al., 2002).

Para complementar o diagnóstico direto, é utilizado o diagnóstico indireto, utilizando métodos imunológicos de detecção de anticorpos para a confirmação da doença. Os métodos de imunodifusão dupla (ID), contraimunoeletroforese (CIE), imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunoblot (IB) (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017), são disponíveis em diferentes serviços de referência e o título de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* tem correlação com a gravidade das formas clínicas, sendo mais elevados na forma aguda-subaguda da doença.

O principal antígeno de diagnóstico é a glicoproteína de 43.000-Da (gp43), uma das principais moléculas antigênicas liberadas na infecção causada pelo fungo da espécie *P. brasiliensis*; soro de mais de 90% de pacientes com PCM reagem com a gp43 em ensaios de imunodifusão (ID), e 100% dos soros foram positivos em ensaios de immunobloting (BLOTTA; CAMARGO, 1993; SOMENSI et al., 1997). Do Valle et al. (2001), estudando 245 pacientes não tratados, obtiveram 90,2% de sensibilidade no teste de ID empregando exoantígenos na fase leveduriforme, concentrada de pool de cepas de *P. brasiliensis*.

O diagnóstico por ELISA apresenta sensibilidade de até 100%, porém apresenta especificidade menor que a ID, o que exige uma criteriosa padronização e interpretação de resultados positivos (DEL NEGRO et al., 2000; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017), visto que ensaios sorológicos pouco específicos podem apresentar reação cruzada com epítopos de outros microorganismos, como do *H. capsulatum.* Além disso, o diagnóstico por ELISA pode apresentar falso negativo para pacientes imunocomprometidos (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991). Pacientes imunossuprimidos com PCM podem ter uma resposta humoral reduzida. Uma proporção significativa de resultados falsos negativos em testes sorológicos para a detecção de anticorpos contra *P. brasiliensis* foram observados em pacientes com PCM associada à AIDS (MARQUES et al. 2010).Poucos casos dessa co-infecção foram relatados,

provavelmente devido à imunosupressão da resposta humoral causada pela infecção pelo HIV. Na sorologia por ELISA, os pacientes com a associação PCM/HIV apresentaram menores títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, em relação aos pacientes não infectados pelo HIV (BELLISSIMO-RODRIGUES, VITALI, MARTINEZ, 2010).

Anticorpos séricos contra antígenos *de P. brasiliensis* têm sido um dos principais marcadores de diagnóstico de PCM. As preparações de antígeno livres (ExoAg) obtidas de isolados de *P. brasiliensis* podem ser reconhecidas pelos soros (IgG) dos pacientes. Independentemente das formas clínicas, os soros reconhecem os antígenos 43-kDa (97% dos soros testados), 160-kDa (78% dos soros testados) e 70-kDa (60% dos soros testados) com mais frequência. Os soros de pacientes com formas graves de PCM aguda ou crônica reconheceram maior número de antígenos, com maior frequência, do que aqueles de formas moderadas. A redução mais acentuada da reatividade foi proporcionada por soros de pacientes que se tornaram assintomáticos no início do tratamento. (PANUNTO-CASTELO et al., 2003).

A quantificação da glicoproteína de 43-kDa de *P. brasiliensis* no soro por ELISA competitivo indireto é um método sensível e pode ser utilizado no monitoramento de pacientes com PCM em tratamento (MARQUES DA SILVA et al., 2004). A metodologia icELISA para detecção de gp43 em amostras de fluído de lavado bronco alveolar (BAL) mostrou a alta sensibilidade e especificidade (100%) do ensaio, uma vez que o fluido BAL é extremamente diluído (MARQUES DA SILVA et al., 2003). Recursos e técnicas adicionais para o diagnóstico da PCM foram desenvolvidos, incluindo a técnica de imunotransferência, teste ELISA de triagem, detecção de antígenos específicos e PCR, porém não estão disponíveis para avaliação de rotina (GAVIRIA et al., 2015).

Em suma, a sorologia é amplamente utilizada para o monitoramento do paciente em tratamento, todavia ocorrem resultados falsos-negativos, por baixos níveis de anticorpos ou pelos altos níveis de anticorpos que permanecem mesmo após um período longo de tratamento (MARQUES DA SILVA et al., 2004; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Diante disso, métodos de detecção de antígenos utilizando diferentes amostras biológicas estão sendo introduzidos. A antigenúria proporciona benefícios quanto à antigenemia, pois o

material clínico pode ser coletado de forma simples, não invasiva e em abundante volume amostral. A coleta da urina é menos invasiva em relação às técnicas tradicionais como a punção venosa.

Todavia existem poucos trabalhos de pesquisa de antígenos na urina. A detecção de antígenos do fungo na urina contribuiria com a rapidez no diagnóstico da PCM de forma não invasiva. Como a PCM é altamente incapacitante e apresenta diversas comorbidades, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado, evitaria a progressão da doença. Além disso, considerando a variabilidade genética dos agentes etiológicos da PCM, um estudo envolvendo detecção de anticorpos e uma avaliação da resposta imunológica a estes diversos agentes poderia contribuir com uma melhor compreensão da patogênese da PCM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANTES, T. D. et. al. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLoS: Negleted Tropical Disease**, v. 10, n. 4, p. e0004606, 2016.

ARISTIZÁBAL, B.H. et al. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. **Medical Mycology,** v. 40. p. 169–178, 2002.

ARRUDA, W.O. et al. Paracoccidioidomicose ocular. Relato de um caso com coriorretinite posterior. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 28, n.3, p. 190-3, 1986.

BITTENCOURT, I. M.J, DE OLIVEIRA R.M., COUTINHO, F. Z. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro**, 21(6):1856-1864, 2005.

BAGAGLI, E. et al., *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects **Mycopathologia**, v. 165: p 197–207, 2008.

BARROS, B.C. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* induces recruitment of α3 and α5 integrins into epithelial cell membrane rafts, leading to cytokine secretion. **Microbes and Infection**, v. 18, n.1, p. 68-77, 2016.

BARROZO, L.V. et al. Fisrt description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. **Plos Negleted and Tropical Deseses**, v.4: p. e643, 2010.

BAVA, A.J. et al. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. **Microbiology and Immunology**, v. 35, n. 3, p. 167-74, 1991.

BELLISSIMO-RODRIGUES et al. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 313-8, 2013.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F., VITALI, L.H., MARTINEZ, R. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis in HIV-coinfected patients. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**; v. 105, n.7, p. 904-7, 2010.

BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n.4-5, p. 209-21, 2008.
BETHLEM, E. P., et al. Paracoccidioidomycosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine,** v. 5(5): p. 319-325, 1999.

BLOTTA, M. H; CAMARGO, Z.P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis:* relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology,** v.31, p. 671-6, 1993.

BORGES-WALMSLEY, M.I. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiology**,v. 10, p. 80–87. 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Paracoccidioidomicose. http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/paracoccidioidomicose. 2019.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S.A. **Microbiologia Médica** 21. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BROWN, G.D. et al. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annual Review Immunology,** v. 29, p. 1–21. 2011.

BRUMMER, E.; CASTANEDA E.; RESTREPO A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6: p. 89-117, 1993.

CALVI, S.A. et al. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes and Infectious**,v. 5, n. 2, p. 107-13, 2003.

CAMARGO, Z. P. et al. Detection of Circulating gp43 Antigen in Sera, Cerebrospinal Fluid, and Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3685-3680, 2004.

CARMO, J.P. et al. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H_2O_2-dependent mechanism. **Medical Mycology**, v. 44, n. 4, p. 363-8, 2006.

CARRERO, L. L., et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 5, p. 605-12, 2008.

CORREDOR, G G, et al. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidiodes brasiliensis.* Molecular identification of the isolate. **Medical Mycology** v. 43, p.275-280, 2005.

COSTA, A. N. et al. The lung in paracoccidioidomycosis: new insights into old problems. **Clinics** (Sao Paulo), v. 68, n. 4, p. 441-8, 2013.

COUTINHO, Z. F., et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Caderno de Saude Publica**, v.18, n. 5, p. 1441-54, 2002.

DA SILVA, J. F. et al. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v .84, p. 87–94, 2016.

DA SILVA, M.J.L. et al. Epithelial cells treated with genistein inhibit adhesion and endocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis.* **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 92, n.1, p. 129-35, 2007.

DE CASTRO, L. F. et al. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **Journal of Infection**., v. 67, n. 5, p 470-85, 2013.

DE OLIVEIRA, H. C. et al. *Paracoccidioides*-host Interaction: an overview on recent advances in the Paracoccidioidomycosis. **Front Microbiology**, v. 6, p. 1319. 2015.

DEL NEGRO, G. M. B. et al. Evaluation of tests for antibody response in the follow up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 37-46, 2000.

DO VALLE, A. C. F. et al. Clinical and endoscopic findings in the mucosae of the upper respiratory and digestive tracts in post-treatment follow-up of paracoccidioidomycosis patients. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n.5, p. 407-13, 1995.

DO VALLE, A. C. F. et al. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 39, p. 373-377, 2001.

FABRIS, L. R. et al. Decreasing prevalence of the acute/subacute clinical form of paracoccidioidomycosis in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical.** Sao Paulo, v. 56, n. 2, p. 121-5, 2014.

FERNANDES, F.F. et al., Chylothorax in paracoccidioidomycosis. **Revista Insituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 58, p. 57, 2016.

FILLER, S. G., SHEPPARD, D. C. Fungal invasion of normally nonphagocytic host cells. **PLoS Pathogens**, v. 2, p.e129, 2006.

FISHER, F.; COOK, N. B. **Micologia:** fundamentos e diagnóstico. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

FORNAJEIRO, N. et al. Inquérito epidemiológico sobre a paracoccidioidomicose utilizando a gp43 em dois municípios do noroeste do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n (2), p. 191-193, 2005.

GAVIRIA, M. et al. Validation and clinical application of a nested PCR for paracoccidioidomycosis diagnosis in clinical samples from Colombian patients. **Brazilian Journal Infectious Disease**, v. 19, n. 4, p. 376-83, 2015.

GÓES, H. F. O. et al. Paracoccidioidomycosis in a renal transplant recipient. **Revista Insituto de Medicina Tropical de São Paulo***,* v.58, p. 12, 2016.

JUVENALE, M. et al. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. **Journal Medical Microbiology**, v. 50, n.2, p. 127-34, 2001.

KETELUT-CARNEIRO, N., et al. IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection. **Journal of Immunology,** v. 194, p. 4507–4517, 2015.

KUROKAWA, C.S., et al., Pro- and anti-inflammatory cytokines produce by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiology and Immunology,** v.51, p. 421–8, 2007.

LACAZ, C. S*.,* et al. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

MARQUES DA SILVA, et al. Monitoring gp43 Antigenemia in Paracoccidioidomycosis Patients during Therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 2419–2424, 2004.

MARQUES, S. A. et al. Paracoccidioidomicose: Frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, p. 411-7, 2007.

MARQUES, S. A. et al. Paracoccidioidomycosis: an unusual presentation in a young girl disclosing an unnoted HIV-infection. **Medical Mycology Journal**, v. 48, p. 182-7, 2010.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution Journal**, v.23, p. 65–73, 2006.

MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal,** v. 11, p. 224-282, 2017.

MENDES-GIANNINI, M.J. et al. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 45, p. 383–94, 2005.

MENDES-GIANNINI, M.J. et al. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, p. 237–248, 2008.

MILLINGTON, M. A. et al. Paracoccidioidomicose: abordagem histórica e perspectivas de implantação da vigilância e controle. **Epidemiologia e Serviços de Saude,** Brasília, v.27, p. e0500002, 2018.

ONO, M.A. et al. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Medical Mycology**, v. 39. n.3, p. 277-82, 2001.

PANIAGO, A. M. et al. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 455-459, 2003.

PANUNTO-CASTELO, A. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection,** v. 5, p. 1205-1211, 2003.

PEDROSO, S.P. et al. Paracoccidioidomicose com comprometimento do sistema nervoso central: revisão sistemática da literatura. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42.n. 6, p. 691-697, 2009.

POLONELLI, L. et al. The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infection. **Medical Mycology**, v. 38, p. 281-292, 2000.

PONCIO-MENDES, R. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v.11, p 224-282, 2017.

PONTES, A. M. et al. A rare paracoccidioidomycosis diagnosis in a kidney transplant receptor: case report. **Transplantation Proceedings**, v. 47, n. 4, p. 1048-50, 2015.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis and Jorge Lobo's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2610-5, 1991.

RADISIC, M.V., et al. Acute pulmonary involvement by paracoccidioidomycosis disease immediately after kidney transplantation: case report and literature review. **Transplant Infectious Disease**, v. 19, n 2, p. e12655, 2017.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Saboroudia Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 23, p. 323 -34, 1985.

SALGADO-SALAZAR, C. et al. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics Journal**, v.26, p. 12, 2010.

SALINA, M. A. et al. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1723-8, 1998.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics*.* **Medical Mycology Journal**, v. 40, n.3, p. 225-245, 2002.

SAN-BLAS. G, SAN-BLAS, F ; SERRANO L. E. Host-Parasite Relationships in the Yeastlike Form of *Paracoccidioides brasiliensis* Strain IVIC Pb9 **Infection and Immunity**, v. 15, n. 2, p. 343-346, 1977.

SANO, A. et al. Detection of gp43 and ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal RNA genes of *Paracoccidioides brasiliensis* in paraffin-embedded tissue. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi***,* v. 42, p. 23-7, 2001.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

SILVA, M.R. et al. Paracoccidioidomycosis: study of six cases with ocular involvement. **Mycopathologia,** v. 102, n. 2, p. 87-96, 1988.

SOMENSI, D. et al. A Paracoccidioidomicose na região norte do Paraná: Dados Clínicos-Laboratoriais. **NerosLab**. 20 ed., p. 100-105, 1997.

SOUTO, P.C. et al. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. **Medical and Microbiology Immunology**, v. 192, n. 4, p. 225-9, 2003.

SPOSTO, M. R. et al. Paracoccidioidomycosis manifesting as oral lesions: clinical, cytological and serological investigation. **Journal Oral Pathoogy & Medicine***,* v. 23, p. 85-87, 1994.

TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology Journal**, v. 52, p. 19–28, 2013.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52 ,p 273–283, 2009.

THEODORO, R. C. et al. Genus Paracoccidioides: Species Recognition and Biogeographic Aspects. **PLoS ONE** v. 7, n. 5, p e37694, 2012.

TOBÓN, A. M. et al. Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after itraconazole therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, n. 7, p. 898-904, 2003.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen Paracoccidioides. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p. 9–25, 2017.

VIEIRA, G.D. et al. Paracoccidioidomycosis in a Brazilian Amazon State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n.1. p. 63-68, 2014.

WEBER, S. T. et al. Dysphonia and laryngeal sequelae in paracoccidioidomycosis patients: a morphological and phoniatric study. **Medical Mycology**, v. 44, n. 3, p. 219-25, 2006.

ZAVASCKI, A.P.; BIENARDT; J.C.; SEVERO; L.C. Paracoccidioidomycosis in organ transplant recipient: case report. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, p. 279-81, 2004.

OBJETIVOS

1 OBJETIVO GERAL

Identificar antígenos presentes em urinas, determinar antigenenúria, avaliar resposta imunológica e lesão pulmonar em ratos infectados experimentalmente com *P. lutzii* e com *P. brasiliensis*.

2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.1 Obter antígenos de *P. lutzii, P. brasiliensis e P. restrepiensis;*

2.2 Detectar antígenos presentes nas urinas no decorrer de infecção de ratos com *P. lutzii e P. brasiliensis* por eletroforese em gel de poliacrilamida;

2.3 Identificar antígenos presentes nas urinas no decorrer de infecção de ratos com *P. lutzii e P. brasiliensis* por immunoblotting;

2.4 Determinar níveis de antígenos solúveis e de gp70 em amostras de urinas no decorrer de infecção de ratos com *P. lutzii e P. brasiliensis*;

2.5 Determinar níveis séricos de IgG a antígenos autólogos no decorrer de infecção de ratos com *P. lutzii e P. brasiliensis*;

2.6. Avaliar se ocorre reconhecimento de antígenos heterólogos utilizando antígenos de fungo *P. restrepiensis*;

2.8. Realizar análise histopatológica de pulmões de ratos infectados com *P. lutzii* e com *P. brasiliensis*.

ARTIGO 1

Experimental paracoccidioidomycosis with *Paracoccidioides lutzii* and *P. brasiliensis* in rats: urinary antigens, specific antibody levels and lung histopathology

F.A.S Chiyoda-Rodini[1]; A. Lenhard-Vidal[2]; B.D. Oliveira Souza[1], J.J.E. Arcos.; M.A.Ono [1]; A. Sano[2]; E.N. Itano[1]*

[1]Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil. [2]Campo Real University Center, Guarapuava, PR, Brazil. [3]Department of Animal Sciences, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan.

*E. N. Itano. Departamento de Ciências Patológicas, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Londrina, PR 86051-970, Brazil. e-mail: itano@uel.br

Abstract

Paracoccidioides species complex and new specie *Paracoccidioides lutzii* are the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), an important widespread systemic mycoses in Latin America. Gp43, the main virulence factor of *P. brasiliensis*, is absent in *P. lutzii* isolates and the data concerning the development of PCM disease due to this species are scarce. In the present study it was compared the effect of infection between *P. brasiliensis* and the non-producer of gp43, *P. lutzii* strain LDR2. Groups of 5 Wistar rats infected with *P. lutzii* (LDR2) or *P. brasiliensis* Pb18 ($3x10^6$ yeast, i.v.) and control inoculated with PBS, were euthanized 14, 28 and 56 days post infection. Urine samples were analyzed by electrophoresis, immunoblotting (IB) and the concentration of total urinary antigens and gp70 determined by indirect competitive enzyme immunoassay (icELISA). Serum IgG antibodies were assessed by ELISA and histological lung analysis by Grocott staining. It was

detected distinct urine antigens profile between rats infected by *P. lutzii* and *P. brasiliensis* by electrophoresis and immunoblotting. By icELISA, higher urinary levels of total antigens (CFA) in rats infected with *P. brasiliensis* in relation to *P. lutzii*, were observed in all analyzed periods (P <0.05). There was an increase in gp70 levels in all periods analyzed for both infected groups, in relation to the control group (p <0.05), however at 28 days higher level was detected in infected with *P. lutzii* (p <0.05). Higher serum IgG antibody levels were detected in both, but higher in those infected with *P. brasiliensis* (p <0.05). By lung histological analysis it was detected fungi in both groups, in all periods, but in greater quantities, in animals infected with *P. brasiliensis*. In conclusion, *P. lutzii* (LDR2) possibly induces controlled PCM disease, less severe than induced by *P. brasiliensis* Pb18 in rats, which requires further studies. This study evidenced by first time the urinary *P. lutzii* (LDR2) antigens in experimental PCM.

Keywords: antigens, ELISA, gp70, mycoses, virulence factor.

1 Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM), the most important systemic mycoses of Latin America, with high incidence in Brazil, is caused by *Paracoccidioides brasiliensis* and by new species *Paracoccidioides lutzii* [3,15]. Annual incidence estimates in Brazil range from 0.71 to 3.7 cases per 100,000 inhabitants but, a much higher index has been reported in two municipalities in the northeast of Brazil, reaching close to 40 PCM cases per 100,000 inhabitants [14].

PCM is classified as PCM infection, a condition with no clinical symptoms, and PCM disease. The disease can be divided into the acute form, more severe (5-25%) with higher death rates, and the more frequent chronic form (74% to 96%) that affects mainly lung with development of granuloma [26]. Chronic PCM, can present disseminated disease, similar to acute form. Also, besides the host immune response, the severity of the disease depends on the infectious agent [28]. By murine experimental model of *P. brasiliensis* infection, it was observed dissemination of the fungus associated with high levels of specific antibodies in susceptible mice with virulent *P. brasiliensis* Pb18 compared to other isolates [36] Although investigations regarding new agent, *P.*

lutzii, have been intensified, still available data are scarce. Marques-da-Silva et al [13], reported two cases of PCM due to *P. lutzii*, in the Amazon Region (north of Brazil), with clinical manifestations similar to those caused by *P. brasiliensis*. Also Hahn et al [9] compared the clinical-epidemiological profile of 34 patients suffering from PCM caused by *P*. *lutzii* in Mato Grosso (central-west of Brazil) and did not show significant clinical or epidemiological differences that could be attributed to the new species, although they reported a fatal case of fungemia due to *P. lutzii*.

In *P. brasiliensis* infected mice, a large number of yeast cells with granulomas in the lung parenchyma and associated to the differential expression of miRNAs related to the inflammatory response has been evidenced by Marioto et al.[12]. A longer survivals period of mice (C57BL/6) or *Galleria mellonella* infected by *P. lutzii* (Pb01) than by *P. brasiliensis* (Pb18) has been demonstrated by Oliveira, et al [20]. The same authors also highlighted the importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. Siqueira et al [30] also observed milder disease, with fungal growth sustained, in BALBc mice infected by *P. lutzii* (Pb01) while animals infected with *P. brasiliensis* (Pb18) induced multiple granuloma formation with different sizes and higher fungal colony forming units.

The absence of gp43 expression, the main diagnostic antigen and virulence factor from *P. brasiliensis*, is absent in *P. lutzii* isolates [31], but whether *P. lutzii* (Pb01) in previous animals models expresses gp43 or not is not informed [9; 20]. Although there are several other virulence factors [19], the absence of gp43 could induce less severe disease than that induced by *P. brasiliensis.* The importance of gp43 has been demonstrated experimentally in mice with gp43 inhibited *P. brasiliensis,* that develop less severe infection [33]. The present study compared the effect of *P. lutzii* (LDR2), non-producer of gp43 [11] and *P. brasiliensis* Pb18 infection in rats. Although there is evidence that the analysis of antigens in the urine of patients with PCM may be important in monitoring PCM treatment [25], there is no data regarding urinary antigens from *P. lutzii.* Here it was investigated *P. lutzii* (LDR2) urinary antigens in experimental PCM in rats. As the 70kDa component was detected in urine from both fungi infection by immunoblotting, the gp70 was also measured by icELISA.

2 Materials and methods

2.1 Fungal isolates

P. lutzii strain LDR2 (Pb01-like; IFM 54648) [9], *P. brasiliensis* strain Pb18 (S1; IFM 41621) and *P. restrepiensis* strain B339 (classified as *P. brasiliensis* PS3 by Muñoz et al. [18] and currently as *P. restrepiensis* by Turissini et al. [34]; were maintained in yeast form on Sabouraud dextrose agar at 35°C, subcultured every 5-7 days and used for antigen production. *P. lutzii* LDR2 and *P. brasiliensis* Pb18 were used also for rat infection.

2.2 Antigens and antibodies

Cell free antigens from *P. lutzii* LDR2 and *P. brasiliensis* Pb18 were obtained as previously described [5], modified by the addition of 2.5 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, protease inhibitor). Exoantigens (ExoAg) from *P. restrepiensis* B339 was obtained according Camargo et al. [4]. Gp70 from *P. restrepiensis* B339 was purified according to Rigobello et al. [24]. Anti-gp70 monoclonal antibody was obtained from hybridoma MAbC5F11(gently donated by Dr. Lopez D.J. “in memorian”, UNIFESP) and the monoclonal IgG purified by Sepharose-protein G column. Protein content was determined in NanoDrop Lite UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington,USA) and aliquots were stored at −80°C until use.

2.3 Experimental infection

Wistar male rats (*Rattus norvergicus albinus*), (~100g) with 4 weeks old, were provided by the animal facilities of Maringa State University, Maringa, PR, Brazil, fed *ad libitum*, and kept in a 12-h light dark cycle at 25°C. Each animal was inoculated i.v. with $3x\ 10^6$ yeast cells. Groups of five animals were euthanized at days 14, 28 and 56 post-infection. As a control, group of rats housed in the same conditions but without infection was used. Heparinized blood samples were collected by cardiac puncture, centrifuged at 300 g for 12 min, and the resulting supernatant was stored at -80°C. Urine samples were collected using a sterile external collector and after euthanasia, directly by bladder puncture. Lungs were removed and fixed in buffered formalin for histopathological analyses. All the procedures applied to animals in this study

were approved by the Animal Care and Use Committee of the State University of Londrina (CEUA 26064.2016.54).

2.4 Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Immunoblotting for urine analysis

Pool of urine samples from each group of rats (n=5), infected with *P. lutzii* (LDR2) and *P. brasiliensis* (Pb18) for 14, 28 and 56 days were concentrated in Amicon® 10k Centrifugal Filter Units (Merck Millipore). Each pool per group treated with reducing buffer and along with a molecular weight standard (Bio-Rad 161-0375, CA, USA) were submitted to a 10% SDS-PAGE in tris-glycine buffer, pH 8.1 (100 V) and then stained by coomassie brillant blue. For immunoblotting, the gel was transferred to a nitrocellulose membrane (18h, 23v, 4°C) and unbound sites were blocked with PBS-5% bovine albumin-0.5% Tween-20 (1h, r.t.). Strips of each pool of urine were incubated with polyclonal antibodies (a pool of 10 PCM patients' sera; 1/10), followed by biotin-sp-affinipure anti-human IgG conjugated (Thermo Fisher-Scientific, 109-065-003) diluted 1:20000, for 2h at 37°C. Streptavidin was added at 1:20000 dilutions and incubated again for 2h at 37 °C and the antigens recognition evidenced by 3,3,5,5-tetramethylbenzidine (Zymed TMB).

2.5 Urinary gp70 levels by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (*icELISA*)

High affinity polystyrene plates (Corning Costar Co., Corning, USA) coated with gp70 (160 ng/mL) were incubated with standard solution (1–160ng/mL), urine samples (1/10) and negative controls, along with mAbgp70 (35 ng/mL) (v/v), followed by anti-mouse IgG-peroxidase (A8419, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (1:4000). The reaction was developed with a solution of *o*-phenylenediamine (OPD) (Sigma). Optical densities (O.D.) were measured at 492 nm on a Multiskan EX microplate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). The concentrations of gp70 were calculated based on the standard curve, plotting percentage of binding and the log of gp70 concentration. The percentage of binding was calculated from equation: Binding %= (A+/ A-) x 100, where A+ was the mean absorbance in the presence of sample or gp70 standard and A- was the mean absorbance in their absence. The cutoff point

was fixed as the mean plus two standard deviations of the negative control readings, and gp70 levels expressed as ng protein/mL.

2.6 Urinary *Paracoccidioides* spp. CFA levels by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (*icELISA*)

Polystyrene plates (Corning Costar Co., Corning, USA) were coated with 25 µg/mL of CFA (Cell free antigens from *P. lutzii* LDR2 and *P. brasiliensis* Pb18) in carbonate buffer (pH 9.6) per well (100 µL/well) for 18h at 4ºC. The plates were blocked as described above. After washing, 50 µL of standard solution, samples and controls were incubated with an equal volume of polyclonal antibody against CFA produced in rabbit (25 µg/mL) for 3 h at 37ºC. After a new cycle of washes, 100 µL anti-rabbit IgG-peroxidase labeled antibody (A1949, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were added to each well at 1:4000 dilution and incubated for 1,5h at 37°C, followed by the addition of OPD and the other steps as described in the previous item. The concentrations of *P. brasiliensis* CFA in the urine were calculated based on the standard curve (6 ng – 100 µg/mL), plotting percentage of binding and the log of CFA concentration. The percentage of binding was calculated from equation: Binding %= (A+/ A-) x 100, where that A+ was the mean absorbance in the presence of sample or CFA standard and A- was the mean absorbance in their absence. The cutoff point was fixed as the mean plus two standard deviations of the negative control readings, and CFA levels expressed as µg protein/ml.

2.7 Autologous Serum IgG levels by indirect ELISA

According to Lenhard–Vidal et al. [11], high affinity 96 wells polystyrene plates (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) sensitized with 25µg/mL of Pb18 or LDR2 CFAs (100µL/well) were blocked with PBS-Tween-5% 5% bovine albumim and then incubated (2h, 35ºC) with rat serum samples diluted 1/20. Anti-rat IgG-peroxidase labeled antibody (Thermo Fisher-Scientific, 62-9520, HRP) was added at 1:2000 dilutions and incubated again for 1.5h and the reaction evidenced by addition of OPD solution. Absorbance at 492 nm was measured in a Multiskan EX Reader (Labsystems, Helsinki, Finland) and results were expressed in O.D.

2.8 Heterologous serum IgG levels by indirect ELISA with ExoAg from *P. restrepiensis* B339 (Biotinilated)

High affinity 96 wells polystyrene plates (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) sensitized with 50ng/mL of ExoAg from B339 was incubated with rat serum samples (1/20) and then with biotinized anti-rat IgG labeled antibody (Jackson Immuno Research, 112-065-003) at 1:40000 dilutions followed by streptavidin-peroxidase (Jackson Immuno Research, 016-030-084) at 1:40000. Dilutions and incubated again for 2.0h The reaction was evidenced by OPD, the absorbance measured in a Multiskan EX Reader (Labsystems, Helsinki, Finland) and results were expressed in O.D.

2.9 Heterologous serum IgG levels by indirect ELISA with ExoAg from *P. restrepiensis* B339 (Peroxidase)

High affinity 96 wells polystyrene plates (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) sensitized with 25μg/mL of ExoAg from B339 was incubated with rat serum samples (1/20) and then with anti-rat IgG-peroxidase labeled antibody (Thermo Fisher-Scientific, 62-9520) was added at 1:2000 dilutions and incubated again for 1.5h. The reaction was evidenced by OPD, the absorbance measured in a Multiskan EX Reader (Labsystems, Helsinki, Finland) and results were expressed in O.D.

2.10 Lung histopathology

The lungs were removed from the animals and fixed in buffered formalin for at least 18 h, dehydrated in alcohol, and embedded in paraffin. Sections of 5 μm were stained with haematoxylin - eosin (H&E) and by Grocott stain.

2.11 Statistical analysis

The construction of the standard curve and the calculation of concentrations were performed using Microsoft Excel 2010 software (Microsoft Office Professional Plus 2010). One-way ANOVA was performed with the Tukey test for multiple comparisons. Significance was established at p value ≤ 0,05. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism software v. 8:03 for Windows *(GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).*

3 Results

3.1 SDS-PAGE and Immunoblotting

Three main bands components, one with approximately 160 kDa, one approximately 70 kDa and one higher than 70kDa MM were observed in both SDS-PAGE (Figure 1A) and immunoblotting (Figure 1B) in urine samples from rats infected with *P. lutzii* (LDR2), more evident in 28 days post infection (Figure 1). In the urine samples of rats infected with *P. brasiliensis* (Pb18), a band of approximately 70 kDa and more two bands above 70 kDa were detected by SDS-PAGE (Figure 2A) and by immunoblotting (Figure 2B) also more evident in 56 days post infection (Figure 2) .

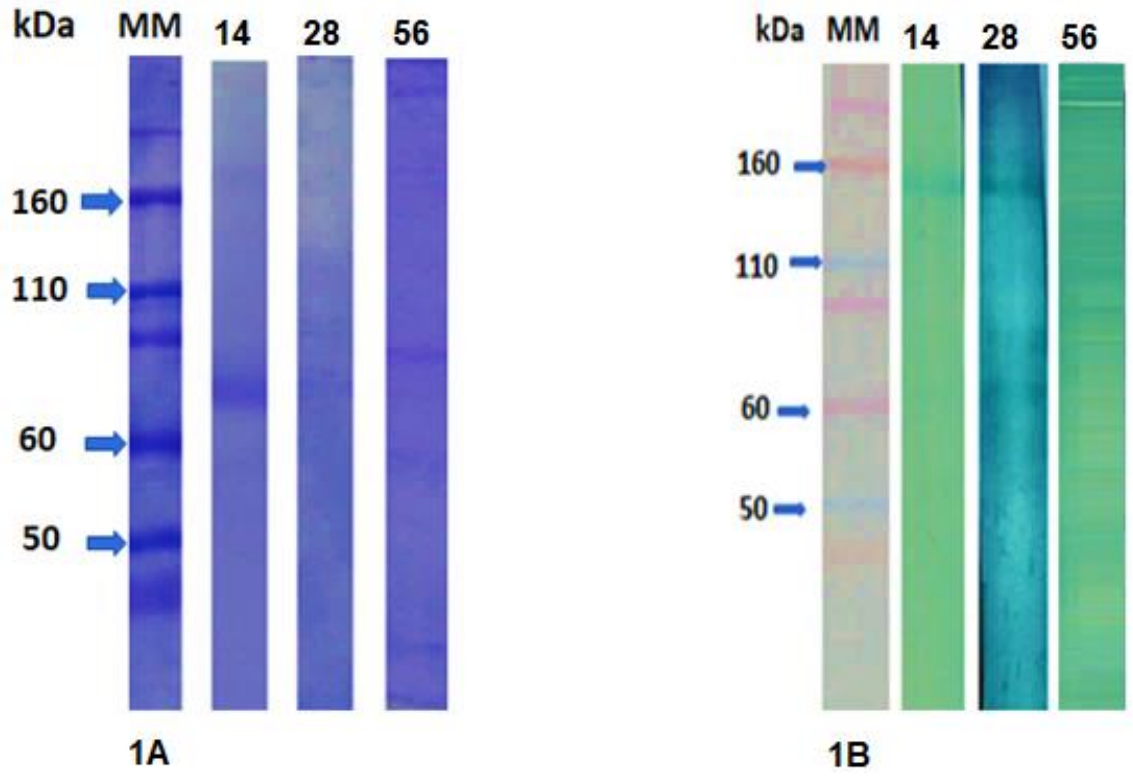

Figure 1. Gel electrophoresis (10% SDS-PAGE) (1A) and Immunoblotting (1B) of pool of urine sample from rats infected with *P. lutzii* (LDR2). Pool of urine samples from groups of rats (n=5), infected with *P. lutzii*- LDR2 for 14 days (14), 28 days (28) and 56 days (56), submitted a 10% SDS-PAGE and stained by coomasue blue (1A) and SDS-PAGE transferred to a nitrocellulose membrane incubated with polyclonal antibodies (from PCM patients) and evidenced by TMB (1B). MM: MM standard.

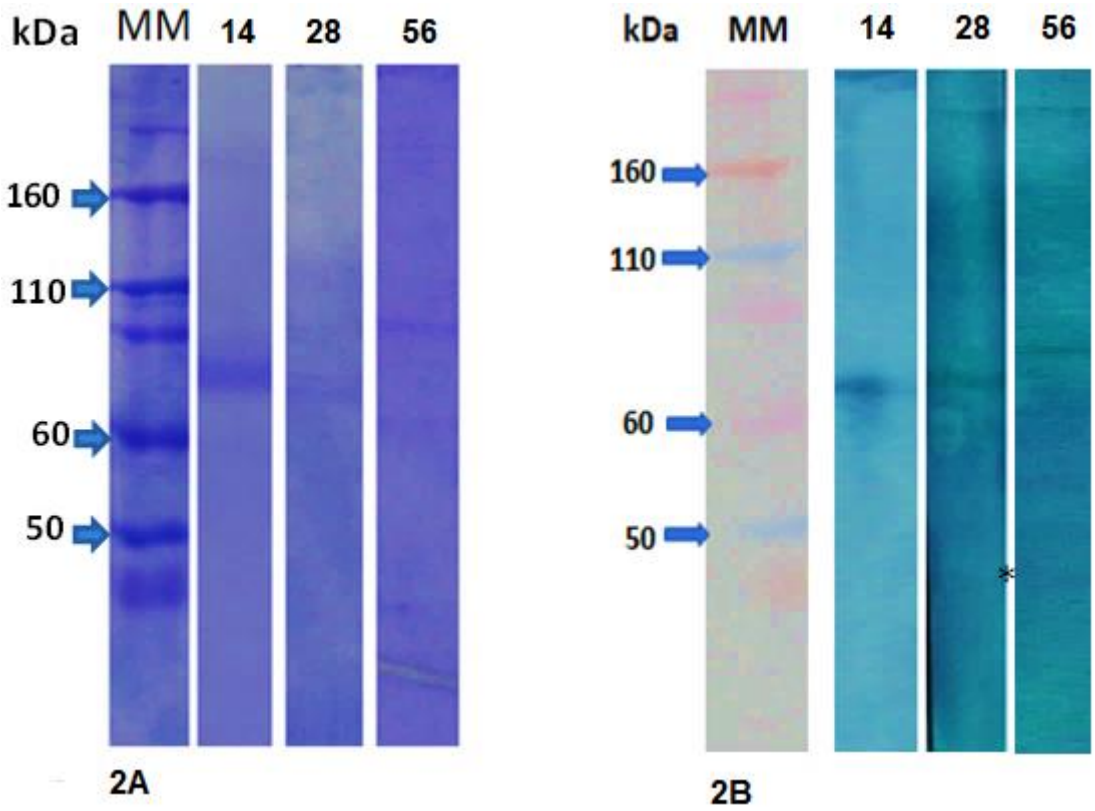

Figure 2. Gel electrophoresis (10% SDS-PAGE) (2A) and Immunoblotting (2B) of urine sample of group of rats infected with *P. brasiliensis* (Pb18). Pool of urine samples from groups of rats (n=5), infected with Pb18 for 14 days (14), 28 days (28) and 56 days (56), submitted a 10% SDS-PAGE and stained by coomasue blue (2A). SDS-PAGE transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with polyclonal antibodies (from PCM patients) and evidenced by TMB (2B). MM: MM standard. * gp43.

3.2 Urinary gp70 levels by icELISA

Compared to control rats, the results of urinary gp70 levels demonstrated a significantly higher level in rats infected with *P. lutzii*-LDR2 on day 28 whereas for infected with *P. brasiliensis* (Pb18) it was on day 56 post infection. In addition, the levels of gp70 in rats infected with *P. brasiliensis* were higher than with *P. lutzii.* (Figure 3).

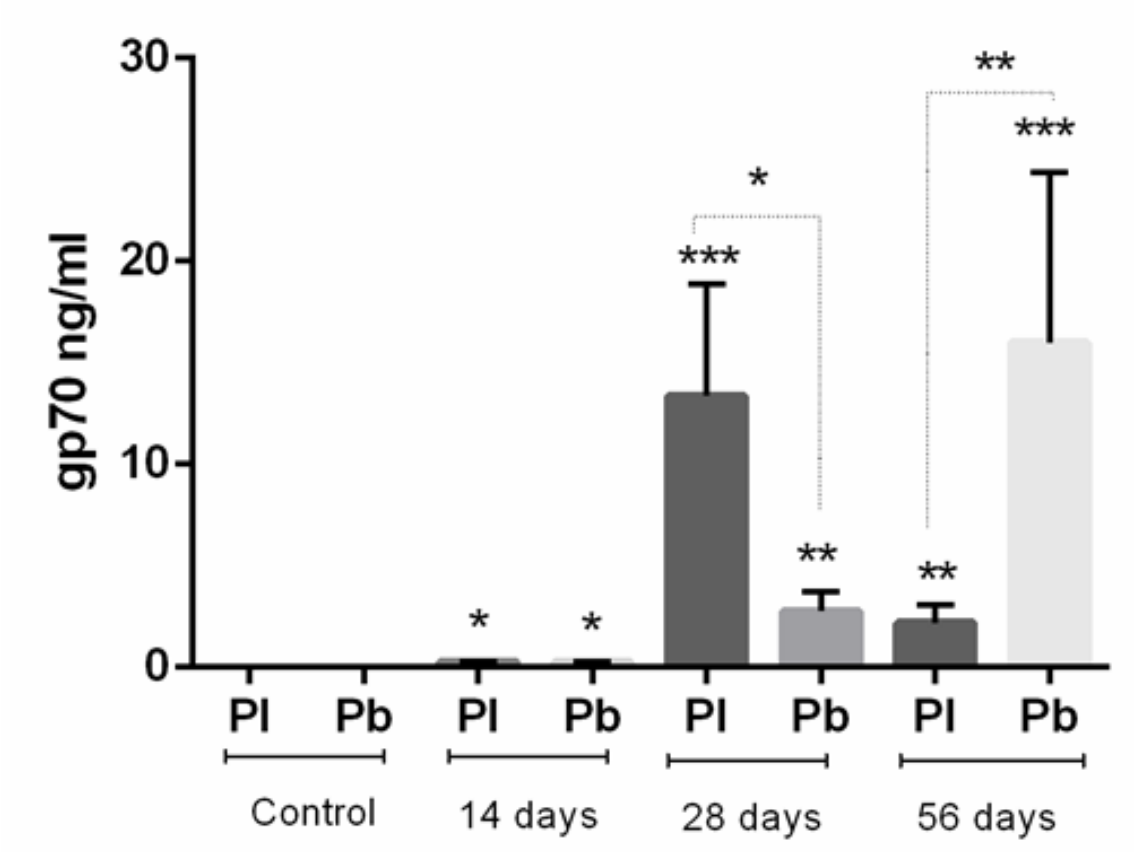

Figure 3. Urinary gp70 levels by *icELISA*. Gp70 levels by *icELISA* in urines of rats infected with *P. lutzii* LDR2 or *P. brasiliensis* Pb18. Asterisks indicate statistical difference from control group (p-value ≤ 0.05)

3.3 Urinary *Paracoccidioides* spp. CFA levels by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (*icELISA*)

Compared to control rats, the results of urinary *Paracoccidioides* spp detection demonstrated a significantly higher level in rats infected with *P. lutzii*-LDR2 on day 28 whereas for infected with *P. brasiliensis* (Pb18) it was on day 56 post infection. In addition, the levels of total antigens in infected with *P. brasiliensis* were higher than with *P. lutzii.* (Figure 4).

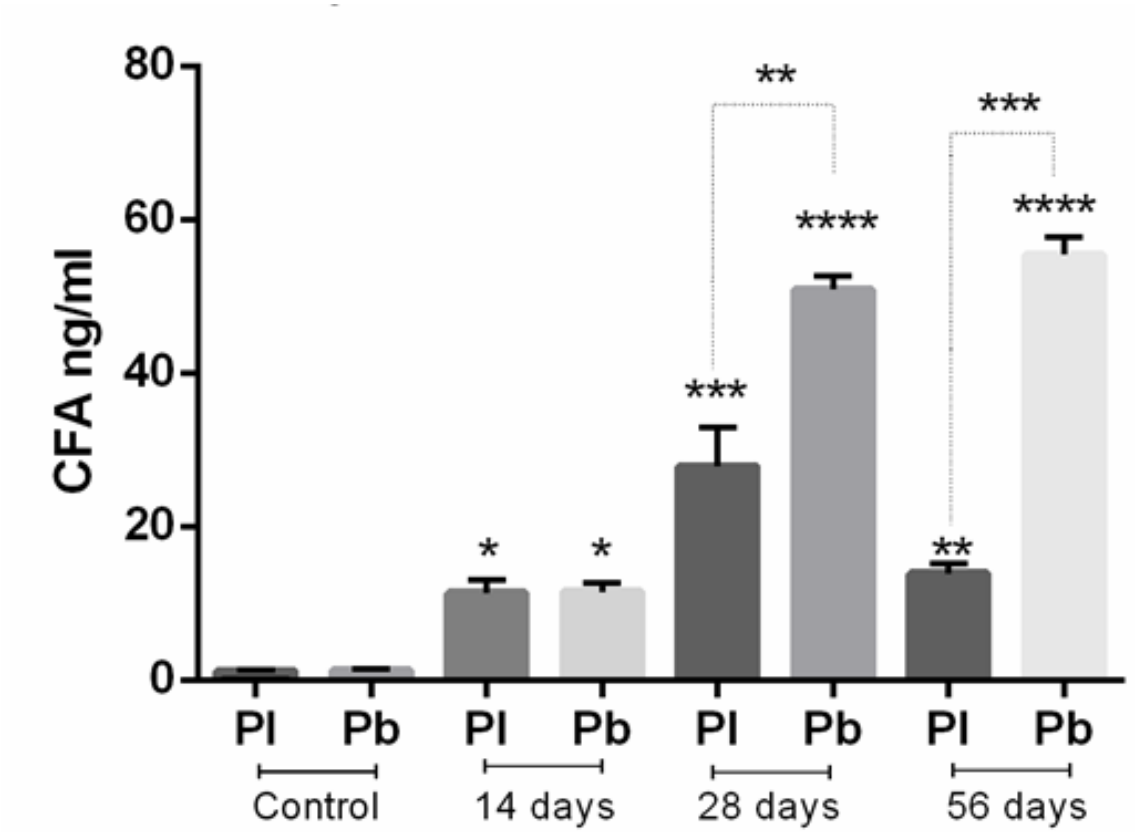

Figure 4. Urinary *Paracoccidioides* spp CFA levels by icELISA. CFA levels by icELISA in urines of rats infected with *P. lutzii* LDR2 or *P. brasiliensis* Pb18. Asterisks indicate statistical difference from control group (p-value ≤ 0.05)

3.4 Autologous Serum IgG levels by indirect ELISA

iELISA performed in immunoplates sensitized with *P. lutzii* (A) and *P. brasiliensis* (B) CFAs, incubated with serum of *P. lutzii* (A) and *P. brasiliensis* (B) infected rats and then with anti-rat IgG-peroxidase and OPD solution. The results are expressed as means in optical density (O.D.) at 492 nm, considering significant in relation to the non-infected control group.

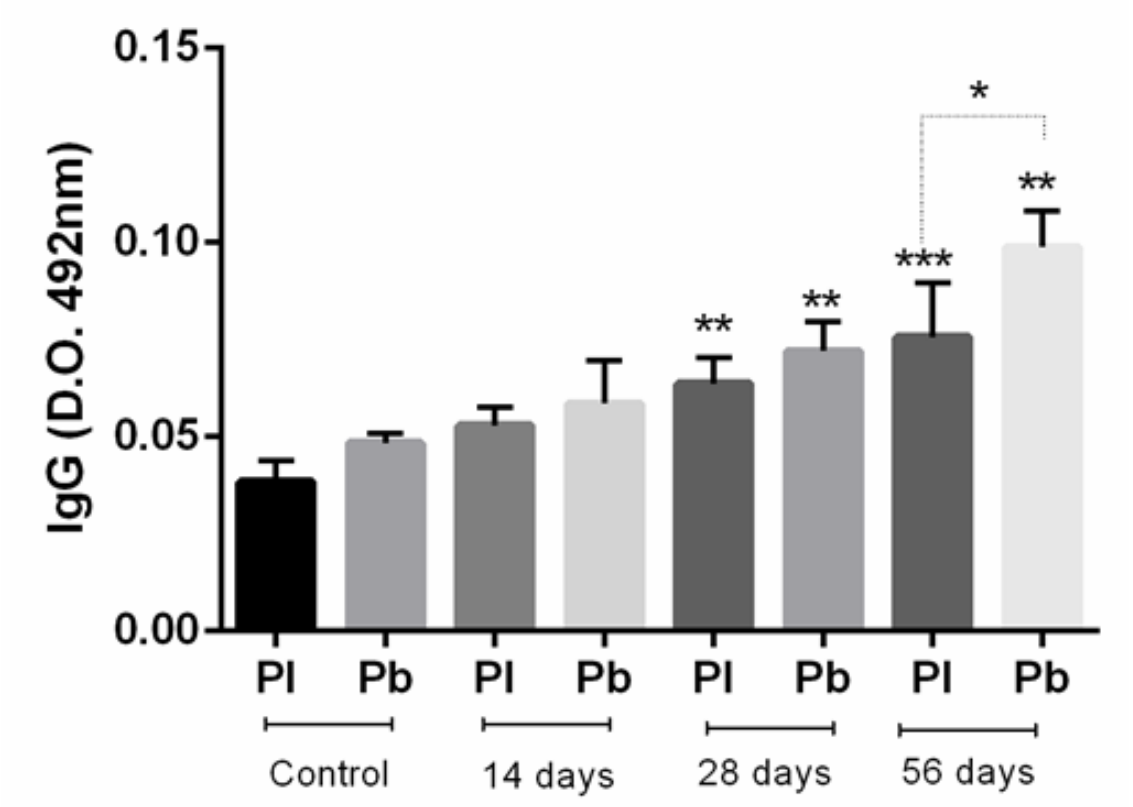

Figure 5. Serum from infected groups by *iELISA*. IgG anti-CFA by iELISA in serum of rats infected with *P. lutzii* LDR2 or *P. brasiliensis* Pb18. Asterisks indicate statistical difference from control group (p-value ≤ 0.05)

3.5 Heterologous serum IgG levels by indirect ELISA with ExoAg from *P. restrepiensis* B339

iELISA performed in immunoplates sensitized with exoAg from *P. restrepiensis* strain B339, incubated with serum of *P. lutzii* (A) and *P. brasiliensis* (B) infected rats and then with biotinized anti-rat IgG, followed by streptavidin-peroxidase and evidenced by OPD. The results are expressed as means in optical density (O.D.) at 492 nm, considering significant in relation to the non-infected control group.

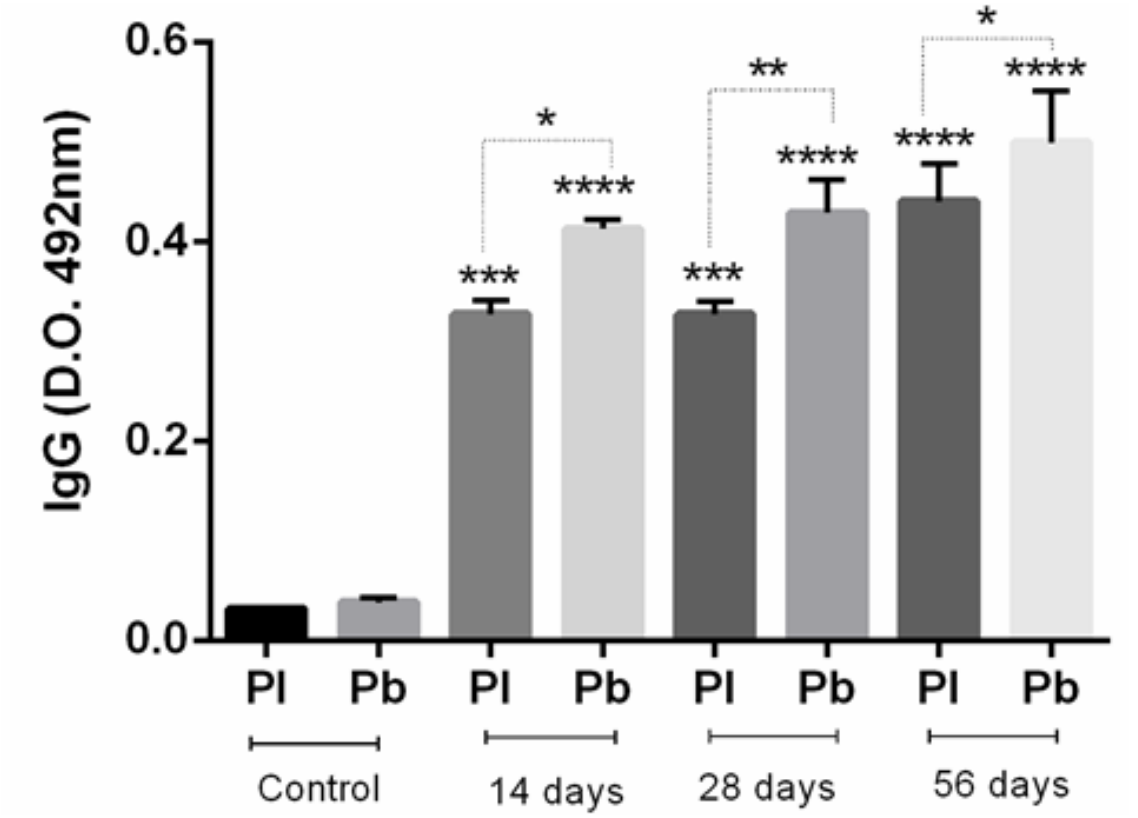

Figure 6. Serum IgG levels in *P. lutzii* and *P. brasiliensis* infected rats. There was high IgG reactivity of serum throughout the evaluation period (14, 28 and 56 days) in relation to the control group was observed with rat infected by *P. lutzii* (LDR2) ($p<0.05$) or *P. brasiliensis* ($p<0.05$), with B339 antigens.

3.6 Heterologous serum IgG levels by indirect ELISA with ExoAg from *P. restrepiensis*

iELISA performed in immunoplates sensitized with exoAg from *P. restrepiensis* strain B339, incubated with serum of *P. lutzii* (A) and *P. brasiliensis* (B) infected rats and then with anti-rat IgG-peroxidase and evidenced by OPD. The results are expressed as means in optical density (O.D.) at 492 nm, considering significant in relation to the non-infected control group.

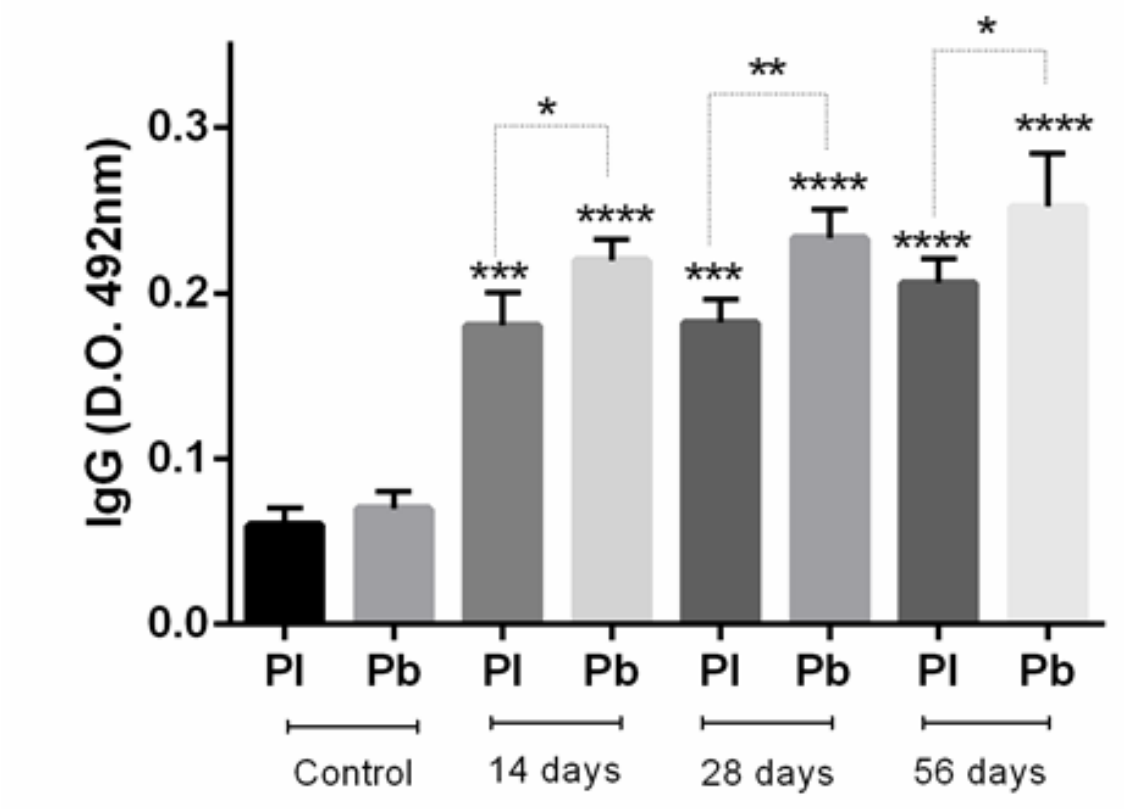

Figure 7. Serum IgG levels in *P. lutzii* and *P. brasiliensis* infected rats. There was high IgG reactivity of serum throughout the evaluation period (14, 28 and 56 days) in relation to the control group was observed with rat infected by *P. lutzii* (LDR2) ($p<0.05$) or *P. brasiliensis* ($p<0.05$), with B339 antigens.

3.7 Lung histopathology

The lungs histopathological analysis evidenced different lesion patterns between infected groups. After only 14 days of infection with *P. lutzii* yeasts, there was a large cellular infiltrate (Fig B), which were mainly observed around bronchioles Fig 7C) but in all the evaluated periods it was not detected well delimited granuloma (Fig 7C, D). Several lysed mononuclear (some polymorphonuclear) cells were observed at 28 and 56 days after infection with *P. lutzii* (Figure 7D, D.1). As expected for rats infected with *P. brasiliensis*, only small cell infiltration with scarce fungi was observed at 14 days post infection, but after 28 days, there were well-defined granulomas. After 56 days of infection, larger areas of injuries with the junction granulomas were observed (Figure 8).

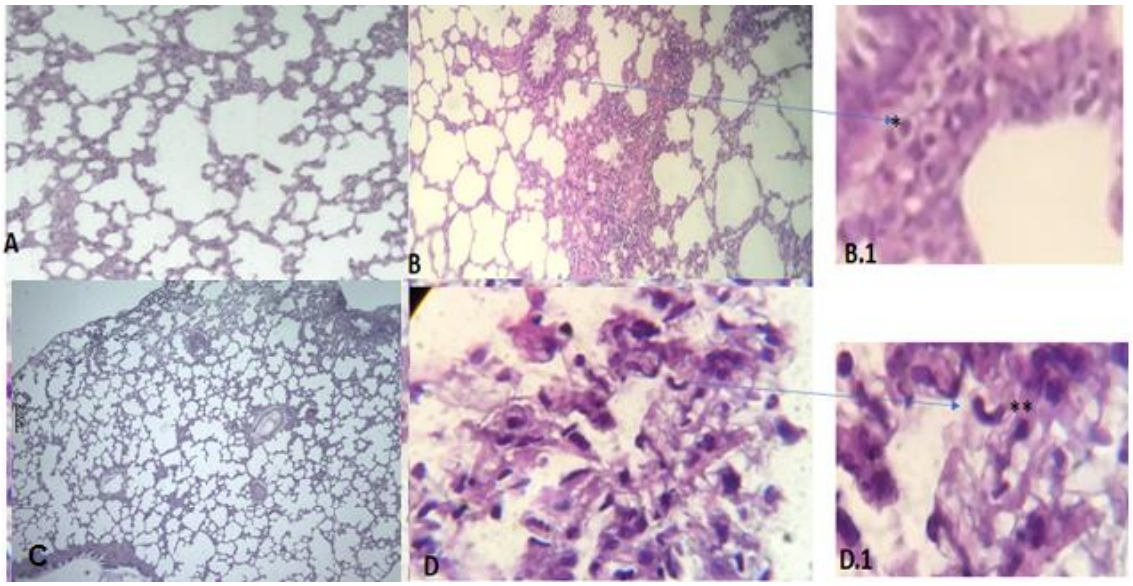

Figure 8. Lung histopathology of rat infected with *P. lutzii* LDR2. Lung histopathological analyses of rat not infected (A), infected intravenously with *P. lutzii* LDR2, at 14 (B), 28 (C), and 56 (D) days after infection stained by H&E.D.1. ** lysed mononuclear cells.

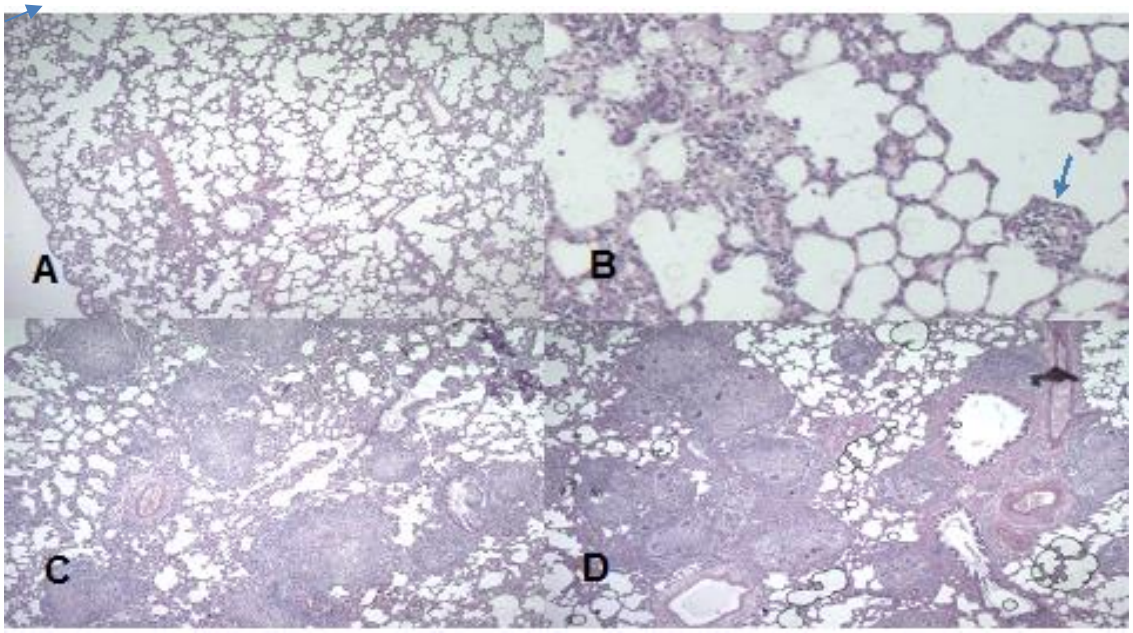

Figure 9. Lung histopathology of rat infected with *P. brasiliensis*. Lung histopathological analyses of control rat not infected (A), infected intravenously with *P. brasiliensis* Pb18, at 14 (B), 28 (C), and 56 (D) days after infection stained by H&E. Arrow, small cell infiltration with scarce fungi in 14 days post infection (B). The presence of several granulomas in 28 days after infection (C) and a larger areas of injuries with the junction granulomas after 56 days of *P. brasiliensis* Pb18 infection (D), with *P. brasiliensis.*

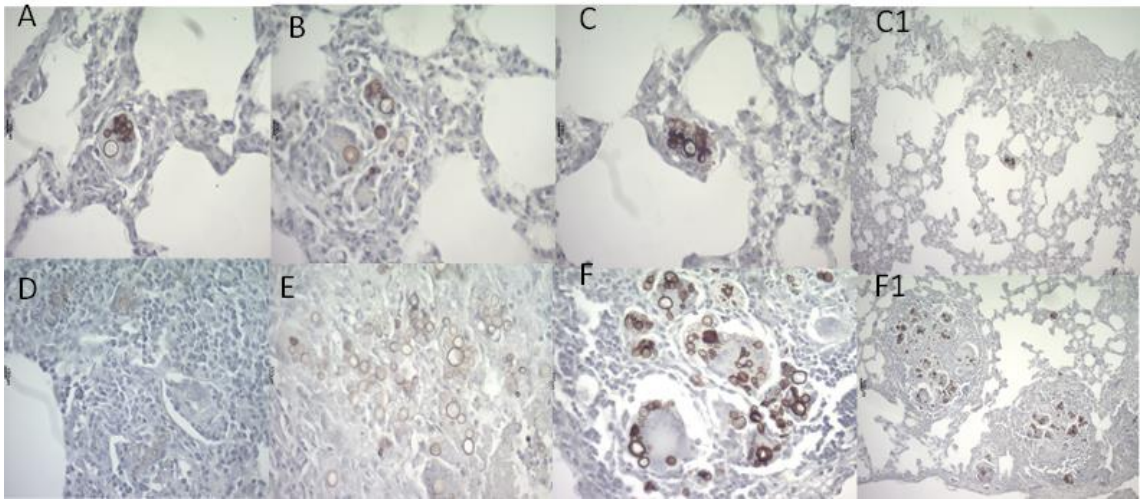

Figure 10. Lung histological section from of rat infected with *P. lutzii* (A-C) and *P. brasiliensis* (D-F), stained with Grocott. Lung from rat infected intravenously with *P. lutzii* at 14 (A), 28 (B) and 56 (C) days after infection (40X) and from rat infected with *P. brasiliensis* Pb18, at 14 (D), 28 (E) and 56 (F) days after infection (40X). (C1) *P. lutzii* at 56 days (10X) and (F1) *P. brasiliensis* Pb18, at 56 days post infection (10X), stained by Grocott.

4 Discussion

Few data are available in the literature on *Paracoccidioides* spp. antigens in urine samples and all data is related to *P. brasiliensis* antigens. The presence of *P. brasiliensis* gp43 and other antigens has been demonstrated by immunoblotting in urine of patient with the acute form of PCM [17] or in concentrated urine samples from acute and chronic PCM [25]. Salina et al., [25] evaluated urine samples, before and during treatment, from two acute and one chronic form of PCM.

The authors detected more frequently bands of 70 and 43 kDa before treatment and decrease in gp43 during clinical recovery or increased during relapse and considered that the detection of *P. brasiliensis* antigens in urine appears to be a promising method for evaluating the efficacy of treatment, and for detecting relapse.

Considering the lack of data on *P. lutzii* urinary antigens, this work analyzed urine samples from rats infected with *P. lutzii* (LDR2). Initially it was performed by SDS-PAGE. But as it could also contain other contaminants from the moment of urine sample collection (even made with all sterile material), it was later analyzed by immunoblotting. The profile of bands present in SDS-

PAGE was very similar to that of immunoblotting. The most evident band of ~ 160 kDa in immunoblotting and not very evident in SDS-PAGE, must be due to greater immunogenicity because components of high MM, in general are more complex and more immunogenic [7]. Three major components (~160 kDa, ~ 70 kDa and >70kDa MM) were observed in urine samples from rats infected with *P. lutzii* (LDR2) and two (~70 kDa and >70 kDa) from rats infected with *P. brasiliensis* (Pb18). This 160 kDa component is evidenced for the first time in urine associated to experimental PCM, and due to high MM it was not our expectation of finding in urine. In this work, renal function tests or kidney histology were not performed. However, we believe that the excretion of antigens occurs even in normal kidneys, as for other urine antigens (43kDa and 70kDa) detected in human PCM [25, 17]. The kidneys excretion of antigens from a variety of pathogens, not involving urinary infections, has been reported in the literature [18, 28], but in general there is a lack of data regarding MM of antigens excreted in the urine. According to Tuuminen review [35] in intact kidney, urinary antigens excreted have a lower MW than albumin (<67 kDa). However urinary antigen with relatively high MM (90 to 80 kDa) has been reported in in patients with Chagas' disease [9].

No detection of 43 kDa band was expected for *P. lutzii* (LDR2), which was not detected in previous work [12], however, the very weak band in urine from rats infected with *P. brasiliensis* (Pb18) was unexpected. Possibly the 43 kDa is eliminated in urine in a lower concentration. In immunoblotting performed by Mendes-Giannini et al. [17], the 43 kDa band appears much weaker than others of greater MM by immunoblotting. But on the other hand, the more intense gp43 band than gp70 in one sample of a chronic patient with PCM can be seen in article from Salina et al., [25]. Although the sample of previous research [25] is low, the presence of gp43 in urine samples has been detected in mouse infected with *P. brasiliensis* by Ramos et al. [23]. Then, we cannot rule out the possibility of gp43 lost by our distinct urine concentration process.

In addition to gp70, the 70kDa band detected by SDS-PAGE in urine samples of 56 days could be another component of 70 kDa, which is not reactive with monoclonal antibody for gp70. The 160kDa component detected here in urine of infected rats, possibly is the same antigen detected in 78% of serum samples from patients with PCM by Panunto-Castelo et al [22]. The

authors suggested that this antigen could be a possible persistent marker of *P. brasiliensis* infection. However, at the time that it was published (2003), there was no knowledge of heterogeneity of PCM agents. Then, other species including *P. lutzii* as PCM agent consequently antibodies to *P. lutzii* 160kDa antigen may have participated. In this work, the 160kDa antigen was more evident in *P. lutzii* (LDR2) than in *P. brasiliensis.* Coltri et al [7] designated this antigen as paracoccin, with MM>160 kDa, laminin binder and evidenced its ability to induce TNF and nitric oxide production by macrophages in high level and suggested that it could play an important role in PCM pathogenesis.

As the 70kDa component was common urine antigen detected in both fungi by immunoblotting, the gp70 was measured by icELISA. An increase in the urinary gp70 level was observed during the infection. But surprisingly, gp70 decreased after 56 days in rats infected with *P. lutzii* (LDR2), suggesting that the infection by this fungus has been controlled, differently from *P. brasiliensis* (Pb18). Although the level of gp70 was higher in *P.lutzii* than *P. brasiliensis* at 28 days of infection, the total antigens levels were significantly higher in rats infected with *P. brasiliensis* at 28 days, that persisted up to 56 days, suggesting a higher fungal load in this group.

In this work, a progressive increase in serum IgG antibody to autologous antigens was observed both in rats infected with *P. lutzii* (LDR2) and with *P. brasiliensis.* The reactivity of antibodies was also analyzed using heterologous antigen, ExoAg from *P. restrepiensis* strain B339, and high reactivity was observed in all investigated periods in both infected groups. Increased antibody levels have often been associated with disease severity in both humans [1] and mice [29]. And also, here it was observed higher IgG levels in *P. brasiliensis* infected rats than infected by *P. lutzii* (LDR2).

By histopathological analysis, it was not observed the formation of granuloma in the lung of rat infected with *P. lutzii* LDR2, unlike infected by *P. brasiliensis.* Siqueira et al., [30] did not found granuloma in mouse infected with *P. lutzii* (Pb01). Possibly this is characteristic of *P. lutzii* species. However, other *P. lutzii* isolates must be investigated. A large lysed mononuclear cellular infiltrate in lungs of rats infected with *P. lutzii*, could be due to 160kDa antigen action, more evident *P. lutzii* antigen that could induce higher TNF and nitric

oxide production by macrophages. But it requires further study to confirm if our 160kDa is the same TNF and nitric oxide inducer mentioned by Coltri et al [7].

Although in this work the CFU has not been determined, considering the levels of urine antigens/antibodies and mainly by finding a greater amount of fungus in the histological section shows that that the isolate *P. lutzii* LDR2 must be less virulent than *P. brasiliensis* Pb18, which is according to the absence of gp43 [12] and data from the literature with other *P. lutzii* isolate [12,30].

Urine sample can be collected easily in large volume, with less invasiveness and its use in diagnosis has been intensified after monoclonal antibody technology. The use of antigens in urine for diagnosis has been cited for several infectious agents as bacteria, fungi, parasite and viruses [17,9]. For PCM, urinary *P. brasiliensis* 70 and 43 kDa antigens has been suggested as promising for diagnosis and for evaluating the efficacy of treatment [25]. This work demonstrates for the first time that the *P. lutzii* LDR2 antigens can be detected in the urine, suggesting that the urinary antigens levels determination is also viable in patients infected with this new species. The introduction of more antigens as a form of diagnosis can expand coverage in diagnosis due to diversity of PCM agent, although there is a need for further studies to characterize these antigens.

5 Acknowledgments

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Pró-reitoria de Pós-graduação from Londrina State University (PROPPG/UEL) for the financial support and Fernando Ferreira Arantes for his technical assistance.

6 Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

7 References

1. BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia, v.* 165, p. 209–21, 2008.

2. BENARD, G.; DUARTE, A.J.; Paracoccidioidomycosis: a model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection on the natural history of endemic tropical diseases*. Clinical Infectious Diseases, .v.* 34, n. 4, p 1032-9, 2000.
3. BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical Microbiology Reviews, v.* 6, p. 89-117, 1993.
4. CAMARGO Z.P; UNTERKIRCHER C; CAMPOY S. P; TRAVASSOS L.R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *Journal of Clinical Microbiology, v.* 26, n. 10, p. 2147-2151, 1988.
5. CAMARGO, Z.P.; TABORDA, C.P.; RODRIGUES, E.G.; TRAVASSOS, L.R. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *Journal Medicine Veterinary Mycology*, v. 29, n. 1, p. 31-38, 1991.
6. COICO R., SUNSHINE G. Imunologia. Editora Guanabara Koogan, v. 6, p. 29-39, 2010.
7. COLTRI, K.C.; CASABONA-FORTUNATO, A.S.; GENNARI-CARDOSO, M.L.; et al. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF-a production by macrophages. *Microbes and Infectious*, v. 8, n. 3, p. 704–713, 2006.
8. CORRAL, R.S.; ALTCHEH, J.; ALEXANDRE, S.R. Detection and Characterization of Antigens in Urine of Patients with Acute, Congenital, and Chronic Chagas' Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 1957–1962, 1996.
9. HAHN RC, RODRIGUES AM, DELLA TERRA PP, NERY AF, HOFFMANN-SANTOS HD, GÓIS HM, et al. Clinical and epidemiological features of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. PLoS *Negleted Tropical Diseases*, v. 13, n. 6, p. e0007437, 2019.
10. LEITÃO JR. NP, VALLEJO MC, CONCEIC¸A˜O PM, CAMARGO ZP, HAHN R, et al. *Paracoccidioides lutzii* Plp43 Is an Active Glucanase with Partial Antigenic Identity with *P. brasiliensis* gp43*. PLoS Negleted Tropical Diseases* , v. 8, n. 8, p. e3111, 2014.
11. LENHARD-VIDAL, A.; ASSOLINI, J.P.; CHIYODA, F.A.S. Polyclonal antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* are able to recognise antigens from different strains from *Paracoccidioides* species complex, including *Paracoccidioides lutzii* LDR2. *Mycoses*, v. 61, n. 11, p. 826-832, 2018.
12. MARIOTO D.T.G., et al. Study of Differential Expression of miRNAs in Lung Tissue of Mice Submitted to Experimental Infection by *Paracoccidioides brasiliensis. Medical Mycology*,v.55, n. 7, p 774-784, 2017.
13. MARQUES-DA-SILVA, H.S.; RODRIGUES, A.M.; HOOG, G.S.; et al. Case Report: Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon Region: Description of Two Cases*. American Journal Tropical Medicine Hygiene*, v. 87, n. 4, p. 710–714, 2012.
14. MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. *Journal of Fungi,* 2017.
15. MATUTE, D.R; MCEWEN, J.G; PUCCIA, R.; et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies*. Molecular Biology Evolution*, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2006.
16. MENDES-GIANNINI, M. J. S; DEL NEGRO, G. B; SIQUEIRA A. Serodiagnosis. In FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. Paracoccidioidomycosis. Florida. CRC Press, 345–363, 1994.
17. MOLINOS, L. Detection of Antigens in Urine Arch Bronconeumol, v. 42, n. 3, p. 101-3, 2006.
18. MUÑOZ, J.F.; FARRER, R.; DESJARDINS, C.A.; et al. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. *MSphere*, v. 1, n. 5, p. 22-23, 2016.
19. OLIVEIRA, H.C.; SILVA, J.F.; SCORZONI, L.; et al. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. *Microbiology*,v. 6, p. 303, 2015.
20. OLIVEIRA, H.C; PATRÍCIA, A.A.; CAROLINE, M.M.; et. al. *Paracoccidioides*-host Intetion: Na Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. Frontiers in Microbiology, v. 6, n. 1319, p. 1-20, 2015.
21. OLIVEIRA, S.J.; MAMONI, R.L.; MUSATTI, C.C.; PAPAIORDANOU, P.M.; BLOTTA, M.H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes and Infection*, v. 4, n. 2, p. 139-44, 2002.
22. PANUTO-CASTELO, A.D.; FREITAS-DA-SILVA, G.; BRAGHETO I.C.; *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: Recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis*. Microbes and Infectious*, v. 5, n. 13, p. 1205-11, 2003.

23. RAMOS, S.P. RAMOS; A. SANO A.; ONO M.O. ; CAMARGO ZP, ESTEVÃO D; MIYAJI M; NISHIMURA K; ITANO EN. Antigenuria and antigenemia in experimental murine paracoccidioidomycosis. Medical Mycology, v. 43, n. 7, p. 631-6, 2005.
24. RIGOBELLO, F.F.; MARQUEZ, A.S.; LOPES, J.D.; et al. Patients with Chronic-form Paracoccidioidomycosis Present High Serum Levels of IgE Anti-*paracoccidioides brasiliensis* Gp70. *Mycopathologia*, v. 175, n. 3-4, p. 307-13, 2013.
25. SALINA, M.A.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MENDES, R.P. Detection of Circulating *Paracoccidioides brasiliensis* Antigen in Urine of Paracoccidioidomycosis Patients before and during Treatment. *Journal of Clinical Microbiology, v.* 36, n. 6, p. 1723–1728, 1998.
26. SHOJI, H.; DOMENECH, A.A.; SIMONETTI, A.F. The Alere Binax NOW Pneumococcal Urinary Antigen Test: Diagnostic Sensitivity for Adult Pneumococcal Pneumonia and Relationship to Specific Serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 56, n. 2, p. e00787-17, 2018.
27. SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; FRANCO, M.F.; et al. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidoides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *Journal Medicine Veterinary Mycology,* v. 27, p. 71-82, 1989.
28. SINGER-VERMES, L.M.; CALDEIRA, C.B.; BURGER, E.; CALICH, L.G.; Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 94, n.1, p. 75–9, 1993.
29. SIQUEIRA, I.; FRAGA, C.L.F.; AMARAL, A.C; SOUZA, A.C.O; et al. Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01). *Medical Mycology*., v. 54, p. 177–188, 2016.
30. TAKAYAMA, A.; ITANO E.N.; SANO A.; et al. Atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based-on multiple gene analysis. *Medical Mycology*, v. 48, n. 1, p. 64–72, 2010.
31. TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; CARVALHO, M.J.; et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular Phylogenetic Evolution*, v, 52, n. 2, p. 273-283, 2009.
32. TORRES, I; HERNANDEZ, O.; TAMAYO, D.; et al. “Inhibition of PbGP43 expression may suggest that gp43 is a virulence factor in *Paracoccidioides brasiliensis*,” PLoS One, v. 8, n. 7, p e68434, 2008.
33. TURISSINI, D.A.; GOMEZ, O.M.;TEIXEIRA M.M.; et al.Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 106, p. 9-25, 2017.
34. TUUMINEN, T. Urine as a specimen to diagnose infections in twenty-first century: focus on analytical accuracy, v. 3 , n. 45, p. 1-6, 2012.
35. VAZ CA, SINGER-VERMES LM, CALICH VLG. Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and non-virulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, v. 9, p. 971-977, 1988.

ARTIGIO 2

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS

Franciele Ayumi Semêncio Chiyoda-Rodini[1], Bianca Dorana de Oliveira Souza[1], Janneth Josefina Escobar Arcos[2], Adriane Lenhard-Vidal[3], Mario Augusto Ono[1], Emerson José Venâncio[1], Eiko Nakagawa Itano[1]

[1]Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil. [2]Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil. [3]Centro Universitário de Campo Real, Guarapuava, PR, Brasil.

Artigo de revisão

Dados para correspondência

Eiko Nakagawa Itano;

Laboratório de Imunologia Aplicada/Depto. Ciências Patológicas/Centro de Ciências Biológicas/Universidade Estadual de Londrina - Campus Universitário - 86051-970, Londrina, PR, Brasil;

Phone: 55.43.33714469;

FAX: 55.43.33714207;

E-mail: itano@uel.br, itanoeiko@hotmail.com

Resumo

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica granulomatosa, provocada pelos fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* spp. *P. brasiliensis* é considerado um complexo de quatro linhagens filogenéticas distintas (S1, PS2, PS3 e PS4) e a espécie *P. lutzii*, denominada anteriormente como 'Pb01-like, é considerada monofilética. A infecção possivelmente ocorre pela inalação de propágulos infectantes aéreos que passam por conversão para fase leveduriforme nos pulmões e linfonodos, induzindo uma resposta no hospedeiro caracterizada pela formação de granulomas, que podem permanecer dormentes ou progredir para a doença, disseminando para baço,

fígado, pele e mucosas. O controle da PCM depende da eficiência da resposta imune celular, o saldo entre os padrões de resposta imune Th1 e Th2 determinará a resposta imune predominante e, consequentemente, resistência ou suscetibilidade em desenvolver a doença. O tipo de resposta imune Th2/Th9 é característico da PCM aguda; esta forma clínica é mais severa, pois há depressão acentuada da imunidade mediada por células. Os pacientes com PCM crônica exibem um perfil Th1/Th17, com indução de formação de granulomas. Trata-se de um mecanismo importante para conter os fungos, evitando a sua disseminação. As citocinas IFN-γ, TNF-α e as associadas a Th17 (IL-6 e IL-23) são críticas para a formação/manutenção de granulomas na PCM. A resposta imune adaptativa desenvolvida na PCM pode ser modulada/moldada pela resposta imune inata, via reconhecimento de estruturas fúngicas conservadas pelos receptores Toll-like, receptores similares à lectina de tipo C como a dectina-1, receptores de manose e receptores de complemento, entre outros. O fungo *P. brasiliensis* também pode ser detectado pelo sensor citosólico, inflamassomo NLRP3, que além de amplificar a inflamação local/sistêmica, pode induzir resposta imune mediada por Th1 e Th17, promovendo uma defesa antifúngica mais eficaz na PCM.

Palavras-chave: Granuloma, *Paracoccidioides* spp, Th1, Th2, Th17

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous mycosis, caused by thermodimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides* spp. *P. brasiliensis* is considered a complex of four distinct phylogenetic strains (S1, PS2, PS3 and PS4) and the species *P. lutzii*, previously known as' Pb01-like, is considered monophyletic. The infection possibly occurs by inhaling airborne infectious propagules that undergo conversion to the yeast phase in the lungs and lymph nodes, inducing a response in the host characterized by the formation of granulomas, which can remain dormant or progress to the disease, spreading to the spleen, liver, skin and mucous membranes. The control of PCM depends on the efficiency of the cellular immune response, the balance between the Th1 and Th2 immune response patterns will determine the predominant immune

response and, consequently, resistance or susceptibility to develop the disease. The type of Th2/Th9 immune response is characteristic of acute PCM; this clinical form is more severe, as there is marked depression of cell-mediated immunity. Patients with chronic PCM exhibit a Th1/Th17 profile, with induction of granuloma formation. It is an important mechanism to contain fungi, preventing their spread. The cytokines IFN-γ, TNF-α and those associated with Th17 (IL-6 and IL-23) are critical for the formation/maintenance of granulomas in PCM. The adaptive immune response developed in PCM can be modulated/shaped by the innate immune response, via recognition of conserved fungal structures by Toll-like receptors, C lectin-like receptors type such as dectin-1, receptors of mannose and complement receptors, among others. The fungus *P. brasiliensis* can also be detected by the cytosolic sensor, inflammasome NLRP3, which in addition to amplifying local/systemic inflammation, can induce immune responses mediated by Th1 and Th17, promoting a more effective antifungal defense in PCM.

Key words: Granuloma, *Paracoccidioides* spp, Th1, Th2, Th17

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica granulomatosa, provocada pelos fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* spp., descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz, que isolou o fungo e descreveu a clínica da doença em 1908. Lutz denominou a doença como pseudococcidiana hifoblastomicose para diferenciá-la da coccidioidomicose, causada por *Coccidioides* spp., bem como da blastomicose, causada por *Blastomyces dermatitidis* (1). Splendore classificou o organismo fúngico como uma levedura do gênero Zymonema (2). Almeida, em 1930, num estudo comparativo de granuloma coccidioidico, diferenciou um novo gênero, o *Paracoccidioides* (3).

O gênero *Paracoccidioides* pertence ao Filo Ascomycota, Classe Euromycetes, Ordem Onygenales e Familia Ajellomycetaceae (Onygenaceae) (4). Atualmente destacam-se as espécies *P. brasiliensis* (5) e *P. lutzii* (6,7). *P. brasiliensis* é considerado um complexo de quatro linhagens filogenéticas

distintas (S1, PS2, PS3 e PS4) e *P. lutzii* foi denominado anteriormente como 'Pb01-like (6–10). Recentemente, Turissini et al. (2017) propuseram uma nova ordem taxonômica para o complexo *Paracoccidioides*: *P. americana* para PS2, *P. restrepiensis* para PS3 e *P. venezuelensis* para PS4. A espécie críptica S1, é representada por Pb18 e B339, encontrada no Brasil, Paraguai, Argentina, Venezuela e Peru, sendo isolada em tatus (*Dasypus novemcinctus*), pinguins e no solo das regiões endêmicas (11). Este fungo também foi isolado em tatus da espécie *Cabassous centralis*, a partir de identificação molecular de um isolado (12).

A espécie PS2 apresenta menor potencial virulento, porém, capaz de provocar a PCM em humanos e em modelos animais, distribuídas no Brasil e Venezuela. A espécie PS3 foi isolada de humanos e de tatus, encontrados na Colômbia (8). A espécie PS4 foi recentemente identificada em isolados clínicos na Venezuela (9). A espécie *P. lutzii* é considerada monofilética, encontrada com maior frequência nas regiões centro-oeste, sudeste e norte do Brasil e no Equador (6,7,13).

Paracoccidioides spp. pertencem à um gênero de fungos patogênicos termodimórficos que exibem duas formas: hifa e levedura. Em temperatura ambiente, apresentam-se na forma micelial ou filamentosa, com crescimento lento, após 20 a 30 dias de incubação entre 20 a 26°C. Nesta faixa de temperatura, esses fungos produzem colônias brancas, pequenas e irregulares, cobertas por um curto micélio aéreo, composta por hifas finas e septadas, sendo esta, a provável forma encontrada no ambiente (5). Entre 35 a 37 °C ou em cultura, o fungo apresenta-se na forma de levedura (14). Macroscopicamente, as colônias apresentam aspecto rugoso e cerebriforme, visíveis a partir de 10 a 15 dias de cultivo.

Microscopicamente, os blastoconídios são caracterizados por células globosas de tamanho variável, apresentando parede celular dupla e refringente, múltiplos brotamentos-exoesporulações, cercadas por células filhas, assemelhando-se a uma roda de leme. A temperatura é um fator importante no dimorfismo do *Paracoccidioides* spp., quando a proporção de α-1,3-glucana é maior do que a β-glucana, estes fungos encontram-se na forma

de levedura (15,16). Assim, a α-1,3-glucana, presente na levedura pode atuar como uma proteção contra mecanismos de defesa do hospedeiro (17,18).

No hospedeiro, o fungo passa a produzir mais α-glucana do que a β-glucana, porém, os estrógenos em mamíferos impedem essa transição (19). Assim, a PCM é mais frequente em homens do que em mulheres (proporção homem/mulher: 22:1) (20), constatação que pode ser atribuída à proteção conferida pelo hormônio feminino 17-β-estradiol. No curso da infecção em camundongos machos e fêmeas, após infecção por conídios de *P. brasiliensis*, os machos apresentaram infecção de forma progressiva, enquanto as fêmeas controlaram a infecção. Esses resultados confirmaram que 17-β-estradiol confere proteção durante a primeira infecção em mulheres (21).

Estudos filogenéticos sugerem que *P. brasiliensis*, *P. lutzii* e outros organismos dimórficos Ascomycota, como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *C. posadasii*, evoluíram, adaptando-se a dois nichos ecológicos distintos: o primeiro representado por condições saprofíticas naturais no solo, e o segundo representado pelos tecidos vivos dos hospedeiros animais (22). O habitat natural de *Paracoccidioides* e fungos relacionados provavelmente consiste no solo das diversas áreas úmidas tropicais e subtropicais das regiões endêmicas da América Latina (5). *P. brasiliensis* e *P. lutzii* foram detectados molecularmente em amostras de solo de tocas e nos ambientes habitados por tatus (23).

As avaliações de infecção fúngica em animais por *P.brasiliensis* foram realizadas principalmente utilizando testes sorológicos e a maioria desses estudos foi realizada no sul e sudeste do brasil. As taxas de positividade observadas foram de 78% em cães de Botucatu (São Paulo, Brasil), 74% em cães de São Paulo (São Paulo, Brasil) (24) e 90%, 49% e 15% em cães das áreas rurais, suburbanas e urbanas de Londrina (Paraná, Brasil), respectivamente (25). No entanto, a infecção de animais por *P. lutzii* foi observada no Estado do Rio Grande do Sul e um total de 481 amostras de soro (200 de cavalo, 196 de cães domésticos e 85 de mamíferos selvagens) foram testadas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para detectar anticorpos anti-*P. lutzii*, das quais, 54 foram positivas para *P. brasiliensis*. Um

total 10,5% dos cavalos, 28,8% dos cães e 9,5% dos mamíferos selvagens foram positivos apenas para *P. lutzii*. A detecção de anticorpos anti-*P. lutzii* em animais do Estado de Rio Grande do Sul sugere que o fungo pode ser encontrado no sul do Brasil, apesar de ser descrito principalmente no centro-oeste e sudeste do país (26).

O complexo de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* produzem propágulos infecciosos e é certo que essa fase saprofítica é transitória, ocorrendo somente em condições ambientais específicas, como abaixo da superfície do solo, em tocas e habitats protegidos (4). Os indivíduos estão expostos ao risco de inalação desses propágulos infectantes dispersos no solo. Existem evidências indiretas de que *P. brasiliensis* cresce preferencialmente entre 2-20 centímetros abaixo da superfície do solo, e após longos períodos de precipitação e aumento da umidade, ocorre maior liberação de esporos (27). Estudos experimentais sugeriram que a capacidade de produzir propágulos infecciosos difere entre grupos genéticos de *Paracoccidioides*, que, por sua vez, podem determinar a incidência de infecção. Por exemplo, os genótipos S1 e PS2 ocorrem no sudeste do Brasil a uma taxa de 9:1 (S1:PS2) e a produção de conídios foi identificada como sendo mais alta em isolados S1 do que PS2 em condições laboratoriais de cultivo (7).

Inquéritos epidemiológicos indicam que 70% dos moradores das áreas endêmicas já foram expostos ao agente etiológico dessa micose, todavia, apenas uma pequena porção desse número apresentou alguma manifestação clínica (28). A infecção possivelmente ocorre pela inalação de propágulos fúngicos aéreos que passam por conversão para fase leveduriforme nos pulmões e linfonodos, induzindo uma resposta no hospedeiro caracterizada pela formação de granulomas, que podem permanecer dormentes ou progredir para a doença, disseminando para baço, fígado, pele e mucosas (5,29).

A capacidade de formação de biofilme é um importante fator de virulência dos microrganismos, incluindo fungos. Biofilme é uma comunidade estruturada complexa de microrganismos embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares aderentes a uma superfície inerte ou viva, essa matriz extracelular providencia proteção contra mecanismos de

defesa do hospedeiro e antifúngicos (30,31). Recentemente, foi observada a formação de biofilme em *Paracoccidioides* spp., *in vitro* (32). Além disso, foi relatado que leveduras de *P. brasiliensis* são capazes de formar biofilmes em condições associadas à superexpressão de adesinas e enzimas (33), o que pode favorecer a infecção disseminada do fungo.

Paracoccidioides spp. são reconhecidos pelas estruturas fúngicas conservadas, conhecidas como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes na superfície da célula hospedeira. PRRs incluem várias moléculas, incluindo receptores Toll-like (TLR), receptores similares à lectina de tipo C (CRL) como a dectina-1, receptores de manose (MR) e receptores de complemento (CR), entre outros (34,35). A dectina-1, o receptor que reconhece β-glucana, desempenha um papel importante na imunidade contra *P. brasiliensis*. A infecção dos macrófagos deficientes em dectina-1 por *P. brasiliensis*, resulta na baixa capacidade fungicida, baixa produção de óxido nítrico e síntese elevada de interleucina-10 (IL-10) (36). A ligação do fungo *P. brasiliensis* aos receptores TLR2, manose e dectina-1 em células polimorfonucleares humanas induz a produção de interleucina-12 (IL-12), IL-10, prostaglandina E2 (PGE2) e leucotrieno B4 (LTB4), sendo que a cepa mais virulenta de *P. brasiliensis* induz um padrão de resposta anti-inflamatória (37).

Algumas proteínas de *Paracoccidioides* spp., conhecidas como adesinas, podem mediar o processo de invasão celular. A glicoproteína de 43 kDa (gp43), por exemplo, pode participar da degradação da citoqueratina, levando à perda das características filamentosas e facilitando a invasão do hospedeiro (38). *Paracoccidioides* spp. induzem apoptose quando invadem células epiteliais ou fagócitos, favorecendo a sua sobrevivência (39,40). Além disso, verificou-se que a apoptose induzida está associada à expressão da caspase-2, 3 e 8 e estes fungos podem modular a apoptose das células epiteliais (A549) através da expressão de moléculas, como Bcl-2, Bak e caspase-3, apoiando a hipótese de que a apoptose pode ser induzida pelo fungo para promover sua sobrevivência e disseminação (41).

Como observado em outras doenças causadas por patógenos intracelulares, o controle da PCM depende da eficiência da resposta imune celular (42). A internalização de muitos microrganismos patogênicos por células epiteliais pode estar associada à capacidade de induzir o processo de fagocitose em células “não profissionais”, fornecendo um mecanismo pelo qual as células fúngicas podem escapar dos fagócitos profissionais, facilitando a sua disseminação (43). De acordo com Barros et al. (2016) (44), ao incubar leveduras de *P. brasiliensis* com células epiteliais, ocorre um aumento de integrinas α3 e α5 nestas células, o fungo então interage com esses receptores de membrana promovendo o agrupamento dessas integrinas. Este agrupamento leva à secreção de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) pelas células epiteliais, sugerindo que *P. brasiliensis* pode modular a resposta inflamatória do hospedeiro.

No processo de fagocitose, os neutrófilos liberam estruturas chamadas armadilhas extracelulares (NETs), que são compostos de DNA, histonas e material granular como a elastase. Foi demonstrado que embora *P. brasiliensis* seja capaz de induzir NETs, esse mecanismo é ineficiente contra o fungo (45). As células NK (do inglês, *Natural Killer*) realizam duas funções: (a) são capazes de matar *P. brasiliensis* diretamente ou reconhecer e matar células infectadas através de um mecanismo citotóxico; (b) produzem citocinas pró-inflamatórias como interferon-gama (IFN-γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) que por sua vez, influenciam a resposta imune adquirida contra esse fungo (46).

A formação de granuloma é um mecanismo importante para conter os fungos, evitando a sua disseminação. A inflamação granulomatosa na PCM é caracterizada pela presença de células gigantes multinucleadas (MGC) e células epitelioides e o granuloma pode ser classificado como solto ou denso, incluindo corpo estranho e células gigantes de Langhans (47). Em PCM experimental bem como na PCM humana, em casos de doença menos grave pode-se observar granulomas densos com menor número de leveduras fúngicas em relação a doença mais grave, onde se observa granuloma solto, associado a um maior número de leveduras (48). Os fungos podem se reproduzir em macrófagos e em células epiteliais, estimulando a resposta imune mediada por células (47). Esse estímulo é baseado na liberação de

citocinas pró e anti-inflamatórias como interleucina-1 beta (IL-1β), IL-6, TNF-α, fator transformador de crescimento beta (TGF-β) e IL-10 (49). As citocinas IFN-γ e TNF-α estão associadas com a formação de granuloma, controle da disseminação do fungo e resistência ao fungo *P. brasiliensis* (50). Além disso, de acordo com Tristão et al., 2017 (51), as citocinas associadas a Th17 (IL-6 e interleucina-23 (IL-23)) são determinantes para a formação de granulomas durante a PCM experimental.

O saldo entre os padrões de resposta imune Th1 e Th2 determinará a resposta imune predominante e, consequentemente, resistência ou suscetibilidade em desenvolver a doença (42). O tipo de resposta imune Th2/Th9 é característico da PCM aguda, pacientes com essa forma clínica da doença exibem altos níveis de interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-9 (IL-9) e testes cutâneos de paracoccidioidina não reativos. Esta descoberta reflete a depressão acentuada da imunidade mediada por células que ocorre na PCM aguda. Além disso, esses pacientes produzem grandes quantidades de IgA, IgE e IgG4, isótipos de anticorpos com baixa capacidade de fixação do complemento e baixa afinidade pelos receptores Fc (FcR, que se ligam a anticorpos) presentes nos fagócitos, resultando em macrófagos menos eficientes que subsequentemente permitem a multiplicação e disseminação de fungos (52).

A PCM aguda é a forma mais severa desta doença e afeta predominantemente crianças, adolescentes e adultos jovens. A incidência desta forma clínica tende a ser distribuída igualmente entre os sexos, principalmente entre a população adolescente (29). Esta forma clínica evolui rapidamente e se difunde para múltiplos órgãos e sistemas, envolve o sistema fagocítico-mononuclear, com presença de linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia. Os sintomas também podem incluir manifestações digestivas, lesões cutâneas (ou mucosas), envolvimento osteoarticular, febre, perda de peso e anorexia. Raramente apresenta manifestações pulmonares e, em geral, os pacientes são diagnosticados algumas semanas após o início dos sintomas (53).

Os pacientes com a PCM crônica exibem um perfil Th1/Th17 em que os linfócitos Th1 efetores são recrutados para o local da infecção e produzem IFN-γ melhorando a ativação dos macrófagos (54). Na resposta Th1 contra *Paracoccidioides* sp., a morte celular pode ser induzida por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido por macrófagos (55,56). Os níveis de anticorpos também podem ser altos, no entanto, esta resposta é caracterizada por anticorpos isotípicos IgG1 e IgG2, que mostram alta capacidade de fixação de complemento e alta afinidade para FcR (IgG1> IgG2> IgG4) (52).

A maioria dos casos de PCM são da forma crônica, que mais comumente se manifesta em homens adultos entre as idades de 30 e 60 anos. A PCM crônica se instala lentamente e os sintomas geralmente perduram entre 4 a 6 meses e, por vezes, mais de um ano (20). Em 90% dos pacientes com PCM, a doença se manifesta pelo comprometimento pulmonar (57). Além dos pulmões, os órgãos mais afetados são a mucosa das vias aéreas superiores, sistema digestório e pele (20). Os pacientes que apresentam a PCM crônica podem apresentar sequelas, incluindo fibrose pulmonar, enfisema, disfonia e síndrome de Addison (57,58). Também há relato de choque séptico fatal por *P. brasiliensis* em paciente jovem imunocompetente (59).

O fungo também é capaz de penetrar a barreira hematoencefálica por mecanismos ainda não estabelecidos, causando a neuroparacoccidioidomicose (NPCM) (60). Casos de PCM aguda em pacientes receptores de órgãos transplantados foram relatados (61–63), assim como PCM nos olhos e anexos (64,65). Podem ocorrer também lesões no aparelho genital (66), PCM localizada na mama (67) e envolvimento de glândula adrenal, tireoide, rins, medula óssea e coração (68). Em alguns casos, o microrganismo permanece latente, possibilitando manifestações clínicas após anos da infecção (5,69).

Mota et al. (1985) (70) mostraram que os pacientes com ambas as formas clínicas da PCM exibiam diminuição do número absoluto de linfócitos T. Bava et al. (1991) (71) observaram que pacientes crônicos sem tratamento estavam linfopênicos, com baixas taxas de células T CD4/CD8 e que pacientes em tratamento apresentaram contagem normal de todas as subpopulações de linfócitos. Venturini et al. (2014) (72) verificou que os pacientes com PCM

crônica antes e após o tratamento completo apresentaram alta contagem de monócitos inflamatórios $CD14^{+}$ $CD16^{++}$ e alta produção de TNF-α pelos monócitos, além disso, os pacientes com cura aparente permaneceram com alta contagem de monócitos $CD14^{+}$ $CD16^{++}$ e alta produção de TNF-α por vários anos. As sequelas pulmonares em pacientes com PCM crônica pioram após o tratamento antifúngico (57), portanto, a expansão de linfócitos T, de monócitos $CD14^{+}$ $CD16^{++}$ e alta produção de TNF-α, durante e após o tratamento do paciente com PCM crônica, pode ser consequência ou parte da sequela pulmonar. Em resposta aos baixos níveis de oxigênio no tecido, as células tentam restaurar a homeostase através da ativação de um sistema regulatório central para hipóxia, envolvendo fatores induzíveis à hipóxia (HIF) (73).

Não se sabe exatamente quais mecanismos levam a uma resposta imune prejudicada durante a infecção por *P. brasiliensis*, no entanto, diversos mecanismos têm sido propostos. Estudos mostraram que a infecção por este fungo leva a involução tímica (74), alterações no arranjo das regiões cortical e medular e aumento da expressão de interleucina-7 (IL-7), interleucina-2 (IL-2), IL-17, TNF-α e Regulador Autoimune (AIRE) no timo. Além disso, a infecção também leva ao aumento da expressão de ligante 19 de quimiocina (motivo C-C) (CCL19) e o receptor 7 de quimiocina CC (CCR7) correlacionado com o aumento da migração de timócitos. *P. brasiliensis* também leva a alta frequência de linfócitos T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ que expressam sequências “proibitivas” de receptor de célula T (TCRVβ5 e Vβ12), sugerindo um comprometimento do processo de seleção no timo (75).

Em pacientes com PCM crônica, a inflamação progressiva pode levar a sequelas fibróticas mesmo após o tratamento, porém, para tratar a fibrose pulmonar não há terapia eficaz (20). No entanto, existem estudos em animais com uso de drogas imunossupressoras demonstrando resultados promissores na redução da inflamação e fibrose pulmonar. Por exemplo, em um estudo com uso de modelo animal de PCM pulmonar tratada com um anticorpo monoclonal para depleção de neutrófilos, foi observado um melhor controle da infecção e atenuação da fibrose pulmonar (76). Em um estudo posterior, foi avaliado o efeito do itraconazol em combinação com a depleção de neutrófilos com

anticorpo monoclonal em animais infectados. Esta combinação reduziu a inflamação e a fibrose pulmonar regulando negativamente genes pró-inflamatórios e pró-fibróticos (77).

Devido às sequelas que incapacitam pessoas em idade economicamente ativa, a PCM representa um grave problema de saúde pública e, sendo assim, possíveis abordagens imunoprofiláticas contra o fungo seriam de grande importância. Considerando isto, Holanda et al. (2017) (78) desenvolveram formulações de vacinas candidatas contra a PCM. A vacina consiste em partículas semelhantes a vírus (VLP) que carregam várias cópias do peptídeo imunodominante P10 da gp43 de *P. brasiliensis*. A cepa Pb18 altamente virulenta de *P. brasiliensis* foi utilizada para desafiar a vacina e, como resultado, houve melhora da imunidade celular com células T $CD4^+$ de memória robusta específicas para P10, controle da carga fúngica e impedimento da disseminação sistêmica do fungo.

As células T reguladoras (Treg) agem equilibrando as respostas imunes durante infecções persistentes para promover o controle da doença imunomediada, evitando respostas inflamatórias hiper-reativas (79). As respostas imunes por Treg estão presentes em ambas as formas clínicas da PCM e foram caracterizadas pela expressão de FoxP3 (*Forkhead box P3*) em lesões teciduais e alta produção de IL-10 e TGF-β1 por células mononucleares do sangue periférico. Camundongos resistentes desenvolvem maior número de células Treg e mais potentes do que indivíduos suscetíveis (80).

Trabalhos recentes demonstram que as vias de sinalização das respostas imunes inatas na PCM podem modular a resposta adaptativa. Ketelut-Carneiro et al. (2015) (40), demonstraram que o fungo *P. brasiliensis* é detectado pelo sensor inflamassomo NLRP3, que orquestra uma ativação vigorosa da caspase-1 e resposta pró-inflamatória, mediando a produção de interleucina-18 (IL-18), promovendo uma defesa antifúngica do hospedeiro com uma forte resposta imune mediada por Th1. Além disso, durante a infecção por *P. brasiliensis* há ativação de inflamassomo de caspase-11 que promove a formação de poros e piroptose, um tipo de morte celular programada mediada por inflamassomo. Durante este processo ocorre vazamento de moléculas pró-

inflamatórias do citosol destas células, amplificando a inflamação local ou sistêmica (81). De acordo com estes autores, a caspase-11 juntamente com interferon-beta (IFN-β) promove a morte celular piroptótica e a liberação de IL-1α por macrófagos que medeiam a produção eficaz de óxido nítrico (NO) e IL-6, aumentando o controle de crescimento fúngico. Além disso, a IL-1α é importante para a imunidade antifúngica mediada por linfócitos Th17, aumentando os níveis de interleucina-17 (IL-17) para regulação do recrutamento de neutrófilos.

Concluímos, portanto, que os padrões de resposta imune desenvolvidas pelo hospedeiro determinam uma maior ou menor gravidade da doença, sendo benéfico o perfil Th1/Th17 e, prejudicial o perfil Th2/Th9. Além disso, o perfil de resposta imune desenvolvida depende das vias de ativação de resposta imune inata. Como a descoberta da existência das espécies crípticas de P. brasiliensis e da nova espécie P. lutzii é muito recente, há uma grande lacuna de conhecimentos a respeito da resposta imune a esses novos agentes, principalmente *P. lutzii*.

Referências

1. Lutz A. Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil . Contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. Adolpho Lutz - Obra Complet, 1:483–94, 1908.
2. Splendore A. Zimonematosi com localizzazione nella cavita dela boca osservata nel Brasile. Bull la Société Pathol Exot, 5:313–319, 1912.
3. Almeida F. Estudos comparativos do granuloma coccidioidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. Rev do Hosp das clínicas/Faculdade Med Univ São Paulo, 5:125–141, 1930.
4. Bagagli E, Theodoro RC, Bosco SMG, McEwen JG. *Paracoccidioides brasiliensis*: Phylogenetic and ecological aspects. Mycopathologia, 165(4–5):197–207, 2008.
5. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: An update. Clin Microbiol Ver, 6(2):89–117, 1993.
6. 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, 52(June 2013):1–10, 2013.
7. Theodoro RC, Teixeira M de M, Felipe MSS, Paduan K dos S, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. PLoS One, 7(5):e37694, 2012.
8. 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, 23(1):65–73, 2006.
9. Salgado-Salazar C, Jones LR, Restrepo Á, McEwen JG. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. Cladistics, 26(6):613–624, 2010.
10. 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, 52(2):273–283, 2009.
11. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides.* Fungal Genet Biol, 106(June):9–25, 2017.
12. Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, et al. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. Med Mycol, 43(3):275–280, 2005.
13. 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, 45(5):605–612, 2008.
14. Lacaz CS., Porto E., Martins JEC., Heins-Vaccari, E.M. & Takahashi de Melo N. Tratado de Micologia médica. Sarvier, 44(5):297–298, 2002.
15. Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. Biochemical Studies on the Thermal Dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis.* J Bacteriol, (1):208–18, 1972.
16. San-Blas G, NiÑo-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. Med Mycol, 40(3):225–242, 2002.
17. Rappleye CA, Goldman WE. Defining Virulence Genes in the Dimorphic Fungi. Annu Rev Microbiol, 60(1):281–303, 2006.
18. San-Blas G, San-Blas F, Ormaechea E, Serrano LE. Cell wall analysis of an adenine-requiring mutant of the yeast-like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. Med Mycol, 15(3):297–303, 1977.
19. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. Infect Immun, 46(2):346–353, 1984.
20. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F de, Kono ASG, Paniago AMM, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. Rev Soc Bras Med Trop, 50(5):715–740, 2017.
21. Aristizábal BH, Clemons K V., Cock AM, Restrepo A, Stevens DA. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. Med Mycol, 40(2):169–78, 2002.
22. Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Shikanai-Yasuda MA, Soares Felipe MS. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. Future Microbiol, 8(9):1177–1191, 2013.
23. 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, 10(4):1–18, 2016.
24. Mós EN, Fava Netto C. Contribuicão ao estudo da para coccidiodomicose. Possivel papel epidemiológico dos caés. Estudo sorológico e anátomo-patológico. Rev Inst Med Trop São Paulo, 16:154–159, 1974.
25. Ono MA, A. P. F. R. L. Bracarense, Morais HSA, Trapp SM, Belitardo DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. Med Mycol, 39(3):277–282, 2001.
26. 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, 60(6):402–406, 2017.
27. Barrozo LV, Benard G, Silva MES, Bagagli E, Marques SA, Mendes RP. First Description of a Cluster of Acute/Subacute Paracoccidioidomycosis Cases and Its Association with a Climatic Anomaly. PLoS Negl Trop Dis, 4(3):e643, 2010.
28. Marques SA, De Camargo RMP, Cortez DB, Marques MEA, Lastória JC. Paracoccidioidomicose: Freqüência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. An Bras Dermatol, 82(5):411–417, 2007.
29. Bellissimo-Rodrigues F, Bollela VR, Da Fonseca BAL, Martinez R. Endemic paracoccidioidomycosis: Relationship between clinical presentation and patients' demographic features. Med Mycol, 51(3):313–318, 2013.
30. Costerton JW. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science 284(5418):1318–1322, 1999.
31. Hurlow J, Couch K, Laforet K, Bolton L, Metcalf D, Bowler P. Clinical Biofilms: A Challenging Frontier in Wound Care. Adv Wound Care, 4(5):295–301, 2015.
32. 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, 182(7–8):747–749, 2017.
33. Sardi J de CO, Pitangui N de 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, 6(6):642–651, 2015.
34. LeibundGut-Landmann S, Wüthrich M, Hohl TM. Immunity to fungi. In: Current Opinion of Immunology. Dordrecht: Springer Netherlands, 449–58, 2012.
35. Brown GD. Innate Antifungal Immunity: The Key Role of Phagocytes. Annu Rev Immunol, 29(1):1–21, 2011.
36. Loures F V., Araújo EF, Feriotti C, Bazan SB, Costa TA, Brown GD, et al. Dectin-1 Induces M1 Macrophages and Prominent Expansion of CD8+IL-17+ Cells in Pulmonary Paracoccidioidomycosis. J Infect Dis, 210(5):762–773, 2014.
37. Balderramas HA, Penitenti M, Rodrigues DR, Bachiega TF, Fernandes RK, Ikoma MRV, et al. Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis.* Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. Cytokine, 67(1):36–43, 2014.
38. de Oliveira HC, da Silva J de F, Scorzoni L, Marcos CM, Rossi SA, de Paula e Silva ACA, et al. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. Front Microbiol, 6(MAR):1–14, 2015.
39. Souto PCS, Brito VN, Gameiro J, Maria Alice C-H, Verinaud L. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. Med Microbiol Immunol, 192(4):225–229, 2003.
40. Ketelut-Carneiro N, Silva GK, Rocha FA, Milanezi CM, Cavalcanti-Neto FF, Zamboni DS, et al. IL-18 Triggered by the Nlrp3 Inflammasome Induces Host Innate Resistance in a Pulmonary Model of Fungal Infection. J Immunol, 194(9):4507–4517, 2015.
41. Del Vecchio A, Silva J de F da, Silva JLM da, Andreotti PF, Soares CP, Benard G, et al. Induction of apoptosis in A549 pulmonary cells by two P*aracoccidioides brasiliensis* samples. Mem Inst Oswaldo Cruz, 104(5):749–754, 2009.
42. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. Mycopathologia, 165:209–221, 2008.
43. Mendes-Giannini MJS, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VLG, Escalante ED, et al. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. Med Mycol, 38(1):113–123, 2000.
44. Barros BCSC, Maza PK, Alcantara C, Suzuki E. *Paracoccidioides brasiliensis* induces recruitment of α3 and α5 integrins into epithelial cell membrane rafts , leading to cytokine secretion. Microbes Infect, 18(1):68–77, 2016.
45. Mejía SP, Cano LE, López JA, Hernandez O, González Á. Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbiology. 161(5):1008–1117, 2015.
46. Longhi LNA, da Silva RM, Fornazim MC, Spago MC, de Oliveira RTD, Nowill AE, et al. Phenotypic and Functional Characterization of NK Cells in Human Immune Response against the Dimorphic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. J Immunol, 189(2):935–945, 2012.
47. Borges-walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Trends Microbiol, 10(2):80–87, 2002.
48. Itano EN, Massuda TYC, Ono MA KM. Aspectos imunológicos da paracoccidioidomicose humana. Ed da Univ Estadual Londrina, 18–35, 2008.
49. Kurokawa CS, Araujo JP, Soares AMVC, Sugizaki MF, Peraçoli MTS. Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Produced by Human Monocytes Challenged *In Vitro* with *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbiol Immunol, 51(4):421–428, 2007.
50. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-γ and Tumor Necrosis Factor-α Determine Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Mice. Am J Pathol, 156(5):1811–1120, 2000.
51. Tristão FSM, Rocha FA, Carlos D, Ketelut-Carneiro N, Souza COS, Milanezi CM, et al. Th17-Inducing Cytokines IL-6 and IL-23 Are Crucial for Granuloma Formation during Experimental Paracoccidioidomycosis. Front Immunol, 8:8:949, 2017.
52. Juvenale M, Del Negro GM., Duarte AJS. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. J Med Microbiol, 50(2):127–134, 2001.
53. Fabris LR, Andrade ÚV, Santos AF Dos, Marques AP da C, Oliveira SM do VL de,

Mendes RP, et al. DECREASING PREVALENCE OF THE ACUTE/SUBACUTE CLINICAL FORM OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS IN MATO GROSSO DO SUL STATE, BRAZIL. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 56(2):121–125, 2014.

54. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH de SL, Longhi LNA, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. J Infect, 67(5):470–485, 2013.
55. Calvi SA, Peraçoli MTS, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, et al. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. Microbes Infect, 5(2):107–113, 2003.
56. Carmo JPM, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. TNF-α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H_2O_2-dependent mechanism. Med Mycol, 44(4):363–368, 2006.
57. Costa AN, Benard G, Pereira Albuquerque AL, Fujita CL, Kono Magri AS, Salge JM, et al. The lung in paracoccidioidomycosis: New insights into old problems. Clinics, 68(4):441–448, 2013.
58. Weber SAT, Brasolotto A, Rodrigues L, Marcondes-Machado J, Padovani CR, Carvalho LR, et al. Dysphonia and laryngeal sequelae in paracoccidioidomycosis patients: a morphological and phoniatric study. Med Mycol, 44(3):219–225, 2006.
59. Macedo PM de, Almeida-Paes R, Almeida M de A, Coelho RA, Andrade HB, Ferreira ABTBC, et al. Paracoccidioidomycosis due to P*aracoccidioides brasiliensis* S1 plus HIV co-infection. Mem Inst Oswaldo Cruz, 113(3):167–172, 2018.
60. Pedroso VSP, Vilela MDC, Pedroso ERP, Teixeira AL. Paracoccidioidomicose com comprometimento do sistema nervoso central: revisão sistemática da literatura. Rev Soc Bras Med Trop, 42(6):691–697, 2009.
61. Zavascki AP, Bienardt JC, Severo LC. Paracoccidioidomycosis in organ transplant recipient: case report. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 46(5):279–281, 2004.
62. Pontes AM, Borborema J, Correia CRB, de Almeida WL, Maciel RF. A Rare Paracoccidioidomycosis Diagnosis in a Kidney Transplant Receptor: Case Report. Transplant Proc, 47(4):1048–1050, 2015.
63. Radisic M, Linares L, Afeltra J, Pujato N, Vitale R, Bravo M, et al. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: analysis of results obtained in the DULCIS study. Int J Lab Hematol, 38(1):42–49, 2016.
64. Silva MRB de M, Mendes RP, Lastória JC, Barraviera B, Marques SA, Kamegasawa A. Paracoccidioidomycosis: Study of six cases with ocular involvement. Mycopathologia, 102(2):87–96, 1988.
65. Arruda WO, Canto MAS, Loddo G, Rebuffi VF, Cardoso M de A. Paracoccidioidomicose ocular: relato de um caso com coriorretinite posterior. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 28(3):190–193, 1986.
66. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Microbiologia Médica. In: Microbiologia Médica. 2000.
67. Fernandes FF, Alves VO, Sánchez TE, Paula WD, Santana AN. CHYLOTHORAX IN PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 58(1):57–59, 2016.
68. Mendes RP, Cavalcante RDS, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. Open Microbiol J, 11(1):224–282, 2017.
69. Polonelli L, Casadevall A, Han Y, Bernardis F, Kirkland TN, Matthews RC, et al. The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections. Med Mycol, 38(s1):281–292, 2000.
70. Mota N, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. Trans R Soc Trop Med Hyg, 79(6):765–772, 1985.
71. Bava AJ, Mistchenko AS, Palacios MF, Estevez ME, Tiraboschi NI, Sen L, et al. Lymphocyte Subpopulations and Cytokine Production in Paracoccidioidomycosis Patients. Microbiol Immunol, 35(3):167–174, 1991.
72. Venturini J, Cavalcante RS, de Assis Golim M, Marchetti CM, de Azevedo PZ, Amorim BC, et al. Phenotypic and functional evaluations of peripheral blood monocytes from chronic-form paracoccidioidomycosis patients before and after treatment. BMC Infect Dis, 14(1):552, 2014.
73. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci,

92(12):5510–5514, 1995.
74. Brito VN, Souto PCS, Cruz-Höfling MA, Ricci LC, Verinaud L. Thymus invasion and atrophy induced by *Paracoccidioides brasiliensis* in BALB/c mice. Med Mycol, 41(2):83–87, 2003.
75. Di Gangi R, Alves da Costa T, Thomé R, Peron G, Burger E, Verinaud L. *Paracoccidioides brasiliensis* infection promotes thymic disarrangement and premature egress of mature lymphocytes expressing prohibitive TCRs. BMC Infect Dis, 16(1):209, 2016.
76. Puerta-Arias JD, Pino-Tamayo PA, Arango JC, González Á. Depletion of Neutrophils Promotes the Resolution of Pulmonary Inflammation and Fibrosis in Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. PLoS One, 11(9):e0163985, 2016.
77. Puerta-Arias JD, Pino-Tamayo PA, Arango JC, Salazar-Peláez LM, González A. Itraconazole in combination with neutrophil depletion reduces the expression of genes related to pulmonary fibrosis in an experimental model of paracoccidioidomycosis. Med Mycol, 56(5):579–590, 2018.
78. Holanda RA, Muñoz JE, Dias LS, Silva LBR, Santos JRA, Pagliari S, et al. Recombinant vaccines of a CD4+ T-cell epitope promote efficient control of *Paracoccidioides brasiliensis* burden by restraining primary organ infection. PLoS Negl Trop Dis, 11(9):e0005927, 2017.
79. Rowe JH, Ertelt JM, Way SS. Foxp3+ regulatory T cells, immune stimulation and host defence against infection. Immunology, 136(1):1–10, 2012.
80. Felonato M, Pina A, Araujo EF de, Loures F V., Bazan SB, Feriotti C, et al. Anti-CD25 Treatment Depletes Treg Cells and Decreases Disease Severity in Susceptible and Resistant Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. PLoS One, 7(11):e51071, 2012.
81. Ketelut-Carneiro N, Souza COS, Benevides L, Gardinassi LG, Silva MC, Tavares LA, et al. Caspase-11-dependent IL-1α release boosts Th17 immunity against *Paracoccidioides brasiliensis.* PLOS Pathog, 15(8):e1007990, 2019.

CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho demonstra pela primeira vez que os antígenos de *P. lutzii* LDR2 podem ser detectados na urina, evidenciando desta forma que a determinação dos níveis de antígenos urinários também é viável em pacientes infectados com esta nova espécie. Demonstra também que o efeito da infecção em ratos pelo fungo *P. lutzii* difere do infectado por *P. brasiliensis*, desenvolvendo doença menos grave, com menos fungo no tecido pulmonar e, com indução de menor nível de anticorpos IgG.