



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANDREIA APARECIDA COFANI BIANCHINI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPLEMENTO DE CÃO "IN  
VITRO" SOBRE O FUNGO DIMÓRFICO *Paracoccidioides  
brasilensis***

---

Londrina  
2007

**ANDREIA APARECIDA COFANI BIANCHINI**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPLEMENTO DE CÃO "IN  
VITRO" SOBRE O FUNGO DIMÓRFICO  
*PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono.

Londrina  
2007

**ANDREIA APARECIDA COFANI BIANCHINI**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPLEMENTO DE CÃO "IN  
VITRO" SOBRE O FUNGO DIMÓRFICO  
*PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS***

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Mario Augusto Ono  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Marilda Carlos Vidotto  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 07 de Fevereiro de 2007.

Dedico este trabalho a meu esposo Rodrigo Ribeiro Bianchini e aos meus pais e irmãos, exemplos de dedicação, estudo e sabedoria. E a Deus pela oportunidade e pelo privilégio que me foi dado em compartilhar tamanha experiência.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mario Augusto Ono, orientador deste trabalho, por seus ensinamentos, incentivo e presteza no auxílio às atividades e discussões sobre o andamento desta dissertação.

Aos médicos veterinários Luiz Carlos Juliani, do Biotério Central da UEL, Donizete Rodrigues Belitardo e Rodrigo Ribeiro Bianchini, por fornecerem as amostras de soros dos cães. Sem essas amostras este trabalho não seria realizado.

Ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação, Mestrado em Patologia Experimental, pelos ensinamentos e conhecimentos a nós transmitidos durante o curso.

Ao Prof. Dr. Emerson Venâncio pela ajuda nos momentos de dúvidas, pelos conselhos e pela amizade.

À minha amiga do laboratório de imunologia, Tatiane Ferreira Petroni, que colaborou para que este trabalho fosse concretizado.

Aos colegas do laboratório de Imunologia, Paola Fernanda Fedatto, Fernanda Bovo, Érica Kavati, agradeço a todos vocês a atenção, a amizade e o companheirismo durante todo o tempo em que estivemos juntos.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação do Mestrado em Patologia Experimental, pela colaboração.

Não podendo me esquecer dos técnicos dos laboratórios do CCB, meu agradecimento a vocês.

A Fundação Araucária, obrigada pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa científica.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIANCHINI, A. A. C. **Avaliação do efeito do complemento de cão "in vitro" sobre o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis***. 2007. 39f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## RESUMO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose, a micose sistêmica mais prevalente na América Latina. A paracoccidioidomicose é uma doença granulomatosa humana e recentemente foi relatado o primeiro caso da doença natural em cães. Considerando que o sistema complemento é um importante mecanismo efetor da imunidade humoral, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito "in vitro" do complemento de cão sobre *P. brasiliensis*. Inicialmente foram avaliadas hemácias de carneiro, cobaia, coelho, galinha, e suíno para determinar a hemácia adequada para ativação da via alternativa em cães. A hemácia de cobaia apresentou maior capacidade de ativação da via alternativa. Foram avaliadas as atividades hemolíticas das vias clássica (CH50) e alternativa (AH50), em soros de 27 cães saudáveis. Os valores obtidos de CH50 e AH50 foram de 167,43/ml e 87,2/ml, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre em relação ao sexo e idade. No ensaio de ativação da via alternativa de cão pelo fungo *P. brasiliensis*, foi observado maior ativação nas amostras de cães adultos quando comparados aos cães filhotes e idosos ( $p \leq 0,05$ ). O efeito da via alternativa do complemento de cão sobre *P. brasiliensis* "in vitro", foi avaliado por meio da incubação de amostras de soro de dois cães com suspensão de células leveduriformes de *P. brasiliensis* em presença de EGTA seguido de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Um dos soros apresentou redução significativa no número de UFC e no diâmetro das colônias de *P. brasiliensis*, quando comparado com o controle incubado com soro inativado. A amostra de soro que apresentou maior atividade sobre *P. brasiliensis*, continha maior atividade da via alternativa que a amostra de outro cão. Estes resultados sugerem que a via alternativa do complemento pode ter um papel protetor na paracoccidioidomicose canina.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*. Cão. Complemento.

BIANCHINI, A. A. C. **Evaluation of the effect of the addition of dog "in vitro" on the fungus dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis***. 2007. 39f. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## ABSTRACT

*Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of paracoccidioidomycosis, the most prevalent systemic mycosis in Latin America. Paracoccidioidomycosis is a human granulomatous disease and recently the first case of natural disease in dogs was reported. Complement system is an important effector component of the humoral immunity against infectious agents. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of dog complement on *P. brasiliensis*. Initially, the ability of erythrocytes of guinea pig, rabbit, sheep, chicken and swine to activate the dog alternative pathway was evaluated. The guinea pig erythrocytes showed the greatest capacity to activate dog alternative pathway. The classical (CH50) and alternative (AH50) hemolytic activities were evaluated in 27 serum samples from healthy dogs and the mean values were 167.43/ml and 87.2/ml, respectively. No significant differences were observed in relation to sex and age. The alternative pathway activation by *P. brasiliensis* was higher in serum samples from adult dogs when compared to puppies and aged dogs ( $p \leq 0.05$ ). In order to evaluate the effect of dog complement on *P. brasiliensis*, two serum samples from adult dogs were incubated with *P. brasiliensis* yeast cells suspension, in presence of EGTA, followed by Colony Forming Unit (CFU) counting. One of the samples showed a significant reduction of the number and diameter of the colonies when compared to control with inactivated serum. These data suggest that the alternative complement pathway may play a protective role in canine paracoccidioidomycosis.

**Keywords:** *Paracoccidioides brasiliensis*. Dog. Complement system.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS

**PCM** – Paracoccidioidomicose

***P. brasiliensis*** – *Paracoccidioides brasiliensis*

**L** – levedura

**M** – micelial

**INF- $\gamma$**  – interferon – gama

**IgG** – Imunoglobulina G

**IgM** – Imunoglobulina M

**IgE** – Imunoglobulina E

**IgA** – Imunoglobulina A

**kDa** – Kilodalton

**gp43** – glicoproteína de massa molecular 43 KDa

**C3** – componente do sistema complemento

**CH50** – atividade hemolítica da via clássica do sistema complemento

**AH50** – atividade hemolítica da via alternativa do sistema complemento

**S.R.D.** – sem raça definida

**$\mu$ l** – microlitros

**M** – molaridade (unidade de concentração)

**n** – normalidade (unidade de concentração)

**%** – porcentagem

**Rpm** – rotações por minuto

**°C** – graus Celsius

**UFC** – unidades formadoras de colônias

**PBS** – Phosphate buffered saline (tampão salina - fosfato)

**ml** – mililitros

**ELISA** – Ensaio Imunoenzimático

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Determinação da atividade hemolítica da via alternativa .....	27
<b>Figura 2</b> – Atividade das vias clássicas (CH50) e alternativa (AH50) do complemento em cães de diferentes faixas etárias.....	28
<b>Figura 3</b> – Determinação da ativação da via alternativa de cão pelo <i>P. brasiliensis</i> .....	28
<b>Figura 4</b> – Análise "in vitro" do complemento sobre <i>P. brasiliensis</i> .....	29
<b>Figura 5</b> – Determinação do diâmetro (mm) das colônias da via alternativa do complemento de cão .....	29
<b>Figura 6</b> – Efeito do complemento de cão sobre o número e tamanho das colônias de <i>P. brasiliensis</i> .....	30

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM ANIMAIS .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
3.1 ANIMAIS .....	19
3.2 ISOLADOS DE <i>P. BRASILIENSIS</i> .....	20
3.3 DETERMINAÇÃO DE ERITRÓCITOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE ANIMAIS PARA ATIVAÇÃO DA VIA ALTERNATIVA DO COMPLEMENTO DE CÃO .....	20
3.4 ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO SORO DE CÃES PELA VIA CLÁSSICA (CH50) .....	20
3.5 TITULAÇÃO DO COMPLEMENTO HEMOLÍTICO TOTAL DA VIA ALTERNATIVA (AH50) .....	21
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO DA VIA ALTERNATIVA DE CÃO PELO FUNGO <i>P. BRASILIENSIS</i> .....	22
3.7 EFEITO DO COMPLEMENTO DE CÃO "IN VITRO" SOBRE A VIABILIDADE DE <i>P. BRASILIENSIS</i> (UFC) .....	22
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	23
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	31
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32

## 1 INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, endêmica na América Latina, cujo agente etiológico é o fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*.

No Brasil, a PCM é a oitava causa de óbitos entre as doenças infecciosas e parasitárias (COUTINHO et al. 2002), sendo que a maioria dos casos tem sido relatados nas regiões Sul, Sudeste e Centro - Oeste (BRUMMER et al. 1993; BLOTTA e CAMARGO, 1993). Os estados com a maior incidência são: São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (COUTINHO et al. 2002), Mato Grosso do Sul (PANIAGGO et al. 2003) e regiões de cerrado de Goiás e Mato Grosso (CERRI et al. 1998).

Em 1908, Adolfo Lutz descreveu os primeiros casos de PCM em dois pacientes adultos, naquela época denominada de micose pseudococcidica. Antes de receber a denominação de PCM, foi denominada de blastomicose brasileira, blastomicose sul-americana, doença de Lutz, doença de Lutz - Splendore - Almeida, entre outras (LACAZ, 1982).

O agente etiológico da PCM é o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, que, à temperatura de 25°C desenvolve-se na forma micelial (M) com colônias brancas, aderentes ao meio. A forma micelial é caracterizada microscopicamente por hifas multinucleadas, finas e septadas (ALMEIDA et al. 2003). No organismo humano ou *in vitro* na temperatura de 37°C, desenvolve-se na forma de levedura (L), caracterizada por células globosas com múltiplos brotamentos (BRUMMER et al. 1993). Na fase de levedura, as colônias apresentam coloração creme, e dependendo do inóculo as mesmas podem ser visualizadas em torno de 10 a 15 dias de incubação. Um aspecto típico dessa forma é o de "roda - de - leme" devido à presença de múltiplas células filhas periféricas circundando a célula mãe (ALMEIDA et al. 2003). De acordo com SAN-BLAS (1982) o dimorfismo do *P. brasiliensis* parece estar relacionado unicamente com a temperatura, sendo esse processo reversível.

A infecção ocorre provavelmente por inalação de propágulos de *P. brasiliensis* provenientes do solo. A transformação dos propágulos infecciosos para a forma L patogênica é o requerimento absoluto para o progresso da doença

(FRANCO et al. 1987; BORGES-WALMSLEY et al. 2002), provocando infecção pulmonar primária, podendo disseminar para outros órgãos e tecidos como fígado, baço, linfonodos e pele (SCULLY & ALMEIDA, 1992).

A patogenia da PCM não é totalmente explicada uma vez que não se conhece o habitat natural do *P. brasiliensis* (ARANGO & RESTREPO, 1988).

ONO et al. (2002), sugeriram que o uso de pesticidas agrícolas pode estar interferindo nas tentativas de isolar o *P. brasiliensis* em ambiente natural. Ensaio realizados em laboratório demonstraram que inseticidas, fungicidas e herbicidas inibiram o crescimento do fungo nos isolados de forma dose - dependente. Os fungicidas mais eficientes, que inibiram o crescimento do fungo foram Alto 100 e Benlate.

A PCM foi classificada em PCM infecção e PCM doença por FRANCO et al. (1987). A PCM infecção ocorre em indivíduos de ambos os sexos, aparentemente saudáveis, que residem ou residiram em zona endêmica e que apresentam reação intradérmica positiva para antígeno de *P. brasiliensis*, sem a manifestação clínica da doença. A PCM doença pode ser classificada nas formas clínicas aguda e subaguda (tipo juvenil) e crônica (tipo adulta).

De acordo com QUEIROZ-TELLES et al. (1998), a forma aguda ou subaguda é menos freqüente e ocorre em jovens de ambos os sexos ou em adultos com menos de trinta anos de idade. Representa menos de 10% dos casos em geral desta micose e suas manifestações clínicas decorrem do rápido e progressivo envolvimento de órgãos do sistema mononuclear fagocitário.

A forma juvenil é caracterizada pelo início agudo, com intenso envolvimento do sistema reticuloendotelial; a maioria dos pacientes acometidos são crianças e adultos jovens. Cerca de 5% dos casos de PCM apresentam-se nessa forma clínica, considerada a mais grave e com alta taxa de mortalidade, em torno de 10% (LONDERO & MELO, 1988). O acometimento pulmonar ocorre em menos de 5% dos casos, pode ocorrer envolvimento ocular, de sistema nervoso central, de ossos (nestes, as lesões são geralmente líticas, única ou múltiplas e os ossos mais atingidos são os ossos das extremidades, arcos costais, crânio, clavículas, escápulas), do sistema geniturinário, miocárdio, pericárdio, endocárdio, timo, hipófise e tireóide (FARHAT et al, 1986, RESTREPO, 1986).

De acordo com FRANCO (1986) a forma crônica da doença, ou tipo adulto, é prevalente em adultos do sexo masculino e pode ser unifocal, afetando

somente um órgão ou sistema, ou multifocal (afeta dois ou mais órgãos). A doença manifesta-se mais comumente por infecção pulmonar, seguida de disseminação para outros órgãos e tecidos como as mucosas, fígado, baço, linfonodos. A maioria dos casos acontece na faixa etária de 30-60 anos.

COUTINHO et al. (2002) realizaram um estudo sobre a mortalidade por paracoccidioidomicose no Brasil, entre 1980-1995. Neste período, a PCM se destacava como a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou recorrente, entre as infecciosas e parasitárias, e a mais alta taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. A taxa de mortalidade predominou na faixa etária de 30-59 anos, atingindo preferencialmente indivíduos do sexo masculino.

As mulheres são menos susceptíveis a PCM doença do que os homens, devido a fatores hormonais, afetando-as preferencialmente antes da menarca e após a menopausa. Hormônios femininos, como o estrógeno, bloqueiam a transição de conídio – ou micélio – para forma L, sendo que a resistência das mulheres à doença parece ser atribuída a este efeito hormonal (BORGES-WAMSLEY, 2002).

Há relatos de que a desnutrição, o tabagismo (SANTOS et al. 2003; VERLI et al. 2005) e o alcoolismo (MARTINEZ 1996; MARTINEZ & MOYA, 1992); constituem importantes fatores de risco para o desenvolvimento da PCM, sendo que os dois últimos estão relacionados com a forma crônica da PCM. Em estudo experimental da PCM em ratos, GOLDANI et al. (1991) verificaram que o alcoolismo pode atuar como fator de risco na progressão da doença. Foi possível verificar que ratos alcoolizados desenvolveram desnutrição, a qual estava associada ao agravamento da doença. Em pacientes portadores de doenças imunossupressoras, como a AIDS, o fungo pode se comportar como um agente oportunista (MARTINEZ, 1996).

Os mecanismos da imunidade inata do hospedeiro interagem com o fungo desde sua entrada no organismo. Com a persistência do fungo, respostas imunológicas específicas são desencadeadas visando sua eliminação (CAMARGO e FRANCO, 2000). Quando *P. brasiliensis* atinge os alvéolos pulmonares, interage com os macrófagos alveolares induzindo a liberação de peptídeos que atraem os neutrófilos, amplificando a resposta. Isto foi demonstrado através da circulação de neutrófilos e células originárias da lavado bronco-alveolar de pacientes com níveis normais de fagócitos ativos, embora eles possam falhar em sua capacidade de

digerir ambas as formas – L e M – de *P. brasiliensis* (BRUMMER et al. 1988; CANO et al. 1992). Estudos *in vitro* têm mostrado que células Natural Killer murinas limitam o crescimento do fungo, sugerindo um papel protetor durante a fase inicial da infecção. Por outro lado, linfócitos de pacientes apresentaram uma queda na capacidade de inibir o crescimento do *P. brasiliensis in vitro* quando comparados com linfócitos de indivíduos saudáveis (PERAÇOLI et al. 1991).

Evidências clínicas e estudos experimentais demonstram que a imunidade celular é o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra *P. brasiliensis*, sendo observada maior susceptibilidade em camundongos atímicos (BURGER et al. 1996). Os macrófagos ativados pelo INF- $\gamma$ , inibem significativamente a replicação intracelular de *P. brasiliensis* (MOSCARDI-BACCHI et al., 1994).

A principal defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis* é a resposta imune celular. Em pacientes com a doença menos grave, a resposta imune do hospedeiro induz granulomas densos e compactos com reduzido número de células fúngicas; pacientes com a doença mais severa, freqüentemente possuem granulomas frouxos com elevado número de células na forma L viáveis (BORGES-WALMSLEY, 2002).

Os pacientes com PCM apresentam acentuada depressão da resposta celular, demonstrada pelos testes cutâneos (tuberculina, candidina, paracoccidiodina) e normalmente apresentam recuperação de resposta celular com o tratamento (MUSSATI et al. 1994).

Há vários métodos para o diagnóstico da PCM, tais como os diagnósticos laboratoriais baseados na visualização do fungo em amostras clínicas e por isolamento do fungo em culturas (BRUMMER et al., 1993). Embora estas técnicas apresentem maior confiabilidade, uma vez que há a visualização do microrganismo na amostra, estas requerem maior tempo. Existem também as técnicas sorológicas, que baseiam-se na detecção de anticorpos contra *P. brasiliensis*, tais como: fixação do complemento, precipitação em gel e ensaios imunoenzimáticos (CAMARGO et al. 1984; CANO et al. 1986; TABORDA et al. 1994). Alta sensibilidade e especificidade têm sido relatadas em ensaio de ELISA com antígenos purificados de *P. brasiliensis* (MENDES-GIANNINI et al. 1989, 1990).

Desde 1916 já se realizam métodos imunodiagnósticos (reação de fixação de complemento) para PCM (BRUMMER et al, 1993), sendo que esse método foi o único disponível até os anos 60. Existem vários métodos para confirmar

o diagnóstico e para o seguimento pela demonstração de anticorpos. A fixação de complemento demonstra sensibilidade em torno de 90%. Essa técnica é de uso limitado pela sua complexidade e pela instabilidade dos reagentes (MENDES-GIANNINI, DEL NEGRO, SIQUEIRA, 1994).

SILVA et al. (2004) utilizaram o ensaio de ELISA para detectar o antígeno gp70 em diferentes amostras biológicas de pacientes suspeitos de PCM e concluíram que esse método é sensível para diagnóstico da PCM e pode ser usado para avaliar o andamento do tratamento dos pacientes; não foi observada reação cruzada quando soros de pacientes com outras micoses foram testados.

Os testes sorológicos são importantes não só para diagnóstico, mas também como prognóstico na PCM e no monitoramento do tratamento. Altos níveis de IgG são comuns na PCM, por outro lado, IgM tendem a ser normais; enquanto que IgA pode estar diminuída, normal ou aumentada. Uma elevação de IgE pode ser encontrada em alguns pacientes com PCM ativa que manifestaram uma depressão da imunidade celular (ARANGO & YARZABAL, 1982).

O fungo *P. brasiliensis* tem uma estrutura antigênica complexa; entretanto, somente a glicoproteína de 43 kDa (gp43) é reconhecida por 100% dos pacientes PCM (SOUZA et al. 1997).

A identificação e purificação da gp43 (PUCCIA et al. 1986), foi um grande passo na sorologia da PCM. A gp43 é um componente da superfície celular, liberada pelo fungo em sua fase exponencial de crescimento, com atividade de proteinase em meio ácido; pode ser processada e secretada através do retículo endoplasmático. A gp43 tem sido usada no imunodiagnóstico da PCM, mostrando alta especificidade (PUCCIA et al. 1986; TRAVASSOS et al. 1995).

A gp43 é o principal antígeno reconhecido por soros de pacientes com paracoccidioidomicose em vários ensaios sorológicos. A secreção da gp43 como uma função da curva de crescimento, sua agregação parcial com uma enzima proteolítica, habilidade de se ligar a laminina, bem como de formar imunocomplexos circulantes *in vitro* poderia exercer uma função na patogênese (TRAVASSOS et al., 1995).

## 1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM ANIMAIS

O papel de animais na ecologia do *P. brasiliensis* é pouco conhecida. O fungo foi isolado de morcegos (GROSE, 1965), fezes de pingüim (GEZUELE, 1989), tatus (NAIFF, 1986; BAGAGLI, 1998; CORREDOR, 1999; SILVA - VERGARA, 2000). JOHNSON (1977) observou a presença do fungo em órgãos de um macaco, em exame histopatológico. Em cavalos, CONTI - DIAZ (1972) observou reação intradérmica positiva em 23% dos animais. COSTA et al. (1978) realizaram um estudo epidemiológico em bovinos, ovinos e eqüinos e observaram uma positividade de 44,8%, 42,8% e 77%, respectivamente na intradermorreação à paracoccidiodina.

A dificuldade de isolamento do fungo a partir do solo levou à busca de novos mecanismos para elucidação do hábitat desse fungo. Uma abordagem possível seria a utilização de um indicador da presença do fungo no ambiente. O cão devido ao hábito de escavar e farejar o solo, provável habitat do fungo (NEGRONI, 1966; ALBORNOZ, 1971), poderia ser um bom indicador da presença do fungo no meio ambiente.

O primeiro estudo de infecção experimental em cães foi realizado por PEREIRA e VIANA (1911), no qual o pus de um paciente com PCM inoculado em um cão provocou a morte do animal 21 dias após a inoculação, com apresentação de sinais clínicos de PCM. Dois estudos de infecção experimental em cães adultos com *P. brasiliensis* por via intratesticular (MÓS e FAVA NETTO, 1974) e por via endovenosa (EISELE et al.2004), não obtiveram êxito na indução de PCM doença. Por outro lado, ONO et al. (2003) relataram a susceptibilidade de cães filhotes ao desenvolvimento de PCM doença.

MÓS e FAVA NETTO (1974), utilizando a reação de Fixação do Complemento, observaram altos índices de infecção por *P. brasiliensis* em cães de São Paulo. Ono et al. (2001) demonstraram que cães de área rural da Região Norte do Paraná apresentavam 89% de positividade em ensaio de ELISA, utilizando gp43 como antígeno. FAGUNDES et al. (2002), observaram 26,5% de positividade em cães da região de Botucatu (SP), por ensaio de ELISA, utilizando exoantígeno de *P. brasiliensis*.

Em 2002, foi relatado o primeiro caso de PCM doença em cães. Uma fêmea da raça Doberman do interior do estado de São Paulo, apresentou aumento dos linfonodos cervicais, porém a confirmação da doença foi feita após dois anos através da análise histopatológica e imunoquímica utilizando anticorpo monoclonal específico anti-*P. brasiliensis*, embora não tenha ocorrido isolamento do fungo (RICCI e cols 2004).

FARIAS et al. (2005), relataram o segundo caso de PCM-doença em cão fêmea também da raça Doberman, residente na região metropolitana de Curitiba. O animal apresentava emagrecimento e hipertrofia generalizada dos linfonodos e do baço. A confirmação foi realizada por meio de exame histopatológico e imunoquímico e por seqüenciamento do gene gp43 e rDNA ITS/5,8S.

Embora altos índices de PCM infecção tenham sido relatados em cães, há até o momento apenas dois relatos da doença natural em cães (RICCI et al. 2004; FARIAS et al. 2005). Em dois estudos de infecção experimental de cães adultos com *P. brasiliensis* não foi possível induzir a paracoccidiodomicose, reforçando a hipótese de que o cão adulto é resistente ao desenvolvimento de PCM-doença (MÓS et. al., 1974; EISELE et al. 2004).

O sistema complemento é o principal mediador humoral do processo inflamatório no sistema imune, constituindo um conjunto de mais de trinta proteínas solúveis no plasma ou expressas na membrana celular, ativa uma série de proteases que conduzem à polimerização ordenada do complexo protéico de ataque à membrana (MAC), que promove a lise de microorganismos; é ativado por três vias: a clássica, alternativa e da lectina ligadora de manose (KIRSCHFINK & MOLLNES; 2003).

*P. brasiliensis* é capaz de ativar o sistema complemento em humanos, apesar do pouco conhecimento sobre a deposição dos componentes do complemento sobre as formas de leveduras; ativa a via alternativa *in vitro*, resultando na opsonização e na fagocitose dos fungos por macrófagos (CALICH et al., 1979; MUNK et al. 1992).

Há poucos estudos sobre o sistema complemento em cães (WOLFE; HALLIWELL, 1980). LARIN et al. (1957) estudaram a ativação do complemento em soro de cães, que foram comparados com cobaias, utilizando a reação de fixação do complemento para diagnósticos de doenças virais.

LUCENA et al. (1999) determinaram os níveis de C3 do complemento no soro canino em cães tratados com diferentes doses de prednisona e dexametasona, e não observaram alterações.

Considerando que o sistema complemento é um dos principais mecanismos efetores da resposta imune humoral, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do complemento de cão sobre o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do complemento de cão *in vitro* sobre o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade hemolítica da via clássica e alternativa em soros de cães normais;
- Avaliar a ativação da via alternativa do complemento em soros de cães saudáveis pelo fungo *P. brasiliensis*;
- Avaliar o efeito *in vitro* do complemento de cão sobre a viabilidade de *P. brasiliensis*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram coletadas 27 amostras de sangue de cães desverminados e vacinados contra cinomose, adenovírus, coronavírus, parainfluenza, parvovirose e leptospirose canina, da cidade de Londrina - PR, região Norte do Paraná, para a avaliação da atividade hemolítica total (CH50) e atividade hemolítica da via alternativa (AH50) do complemento. No momento da coleta, os animais não apresentavam sinais clínicos de nenhuma doença. Foram coletados dados como sexo, raça e idade dos animais. A faixa etária variou de 1 a 15 anos de idade, entre fêmeas (n= 11 ) e machos (n= 16).

As amostras de sangue (5 ml por animal) foram coletadas por médicos veterinários, através da punção da veia jugular ou cefálica, com seringas e agulhas descartáveis, sendo o sangue, acondicionado em frascos de vidros esterilizados. O soro foi obtido após centrifugação das amostras, no máximo 1 hora após a coleta. As amostras de soro foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

Amostras de sangue para avaliação do efeito do complemento sobre a viabilidade de *P. brasiliensis* LDR1 (ensaio UFC), foram obtidos de 2 cães S.R.D. sadios desverminados e vacinados contra cinomose, adenovírus, coronavírus, parainfluenza, parvovirose e leptospirose canina e que foram testados quanto a presença de anticorpos anti-gp43 e reação intradérmica com gp43, apresentaram-se negativos em ambos os testes.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL.

### **3.2 ISOLADOS DE *P. BRASILIENSIS***

Foram utilizados o isolado de *P. brasiliensis* LDR1 e B339. Os isolados foram cultivado em ágar Sabouraud por 7 dias à 37°C.

### **3.3 DETERMINAÇÃO DE ERITRÓCITOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE ANIMAIS PARA ATIVAÇÃO DA VIA ALTERNATIVA DO COMPLEMENTO DE CÃO**

Para análise da ativação da via alternativa do complemento, foram utilizadas suspensões de eritrócitos de diferentes espécies animais. Suspensões de eritrócitos 2.8% (100 µl) de coelho, galinha, carneiro e cobaia, em tampão borato  $Mg^{+2}/EGTA$  2.5mM, foram incubados com soro canino (1:5 e 1:10) por 30 minutos a 37° C. Foram feitos controles de 100% e 0% de lise (100 µl suspensão de eritrócito com 100 µl de água destilada e Tween20; e tampão, respectivamente). As amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes analisados a 492 nm. As porcentagens de lise foram calculadas em relação aos controles 100%.

### **3.4 ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO SORO DE CÃES PELA VIA CLÁSSICA (CH50)**

As hemácias de carneiro, coletadas e estocadas em solução de Álsever, foram ressuspensas em solução salina 0,85% e centrifugadas 3 vezes a 2000 rpm por 5 minutos. Após lavagem, foi realizada a sensibilização da hemácia 2,8% com uma concentração de hemolisina de coelho 1:1000 diluídos em tampão borato  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$  com pH entre 7,0 e 7,4 e incubou-se por 30 minutos a uma temperatura de 37°C de acordo com Wallace, Osler & Mayer (1950) (LARIN et al. 1957).

O soro de cão diluído 1:50 foi adicionado aos tubos nos seguintes volumes: 200, 250, 300 e 400µl. O tampão borato  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$  foi adicionado na

quantidade suficiente para alcançar o volume de 800 µl. Foram então adicionados 200 µl da suspensão de hemácia de carneiro sensibilizada com hemolisina a todos os tubos. Incubou-se os tubos a 37°C por 30 minutos e seguida de centrifugação a 5000 rpm por 3 minutos; realizou-se a leitura do sobrenadante a 541 nm em espectrofotômetro e a porcentagem de lise foi calculada em relação ao controle 100% de lise.

No controle 100% de lise foi utilizado 200 µl da suspensão de hemácias sensibilizadas com hemolisina e 800 µl de água destilada e para controle 0% de lise foi utilizado a mesma quantidade da suspensão de hemácia e 800 µl de tampão borato  $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ .

A porcentagem de lise (y) foram utilizados para calcular os valores de  $y/100-y$  e estes foram plotados no gráfico juntamente com o volume de soro utilizado obtendo assim a curva correspondente e o volume de soro que contém um CH50.

### **3.5 TITULAÇÃO DO COMPLEMENTO HEMOLÍTICO TOTAL DA VIA ALTERNATIVA (AH50)**

Para a realização da titulação do complemento de cão pela via alternativa foi utilizada uma microtécnica, conforme PHIMISTER & WHALEY (1990), utilizando hemácias de cobaia estocadas em solução Álsever. Foram lavadas três vezes em solução salina 0,85% e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos.

Suspensão de hemácia de cobaia 2,8% foram preparadas em tampão  $\text{Mg}^{+2}/\text{EGTA}$ . O soro de cão diluído 1:10 foi adicionado aos tubos nos seguintes volumes: 40, 60, 80 e 100 µl; e completou-se para 100 µl finais o volume de cada tubo com tampão  $\text{Mg}^{+2}/\text{EGTA}$ , e posteriormente adicionou-se 100 µl da suspensão de hemácias 2,8% em todos os tubos. Foram realizados controles de 100% e 0% de lise (100µl suspensão de eritrócito com 100µl água destilada / Tween20; e tampão, respectivamente). Estes foram incubados a 37°C por 30 minutos e centrifugados a 5000 rpm por 3 minutos. A leitura do sobrenadante foi realizada a 492 nm em leitora Multiskan e a porcentagem de lise foi calculada em relação ao controle 100 % de lise.

A porcentagem de lise (y) foram utilizados para calcular os valores de  $y/100-y$  e estes foram plotados no gráfico juntamente com o volume de soro utilizado obtendo assim a curva correspondente e o volume de soro que contém um AH50.

### **3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO DA VIA ALTERNATIVA DE CÃO PELO FUNGO *P. BRASILIENSIS***

Para determinação da ativação da via alternativa pelo *P. brasiliensis*, foi utilizada uma microtécnica conforme PHIMISTER & WHALEY, 1990. Foram utilizadas amostras de soros de 27 cães (diluição 1:10 ) divididos por faixa etária, filhotes (1 mês a 11 meses), adultos (12 m a 8 anos) e idosos (9 a 15 anos). Adicionou-se 200µl do fungo *P. brasiliensis* B - 339 na concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml diluído em tampão  $Mg^{+2}/EGTA$  2.5mM. Utilizou-se suspensão de eritrócito de cobaia 2.8 % em tampão borato  $Mg^{+2}/EGTA$  2.5mM, e foram distribuídos nos seguintes volumes: 40, 60, 80 e 100 µl, incubados com tampão borato  $Mg^{+2}/EGTA$  2.5mM, realizados controles de 100% e 0% de lise (100µl suspensão de eritrócito com 100µl água destilada / Tween20; e tampão, respectivamente) e mantidos por 30 minutos a 37° C. As amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes analisados a 492 nm. As porcentagens de lise (y) foram calculadas em relação ao controle 100%. Após o cálculo da relação  $(y/100-y)$ , os valores foram plotados num gráfico de volume de complemento *versus*  $y/100-y$  para determinação do volume de soro que lisa 50% das hemácias (1AH50).

### **3.7 EFEITO DO COMPLEMENTO DE CÃO "IN VITRO" SOBRE A VIABILIDADE DE *P. BRASILIENSIS* (UFC)**

Foram utilizadas amostras de soro de 2 cães S.R.D. sadios do biotério central da Universidade Estadual de Londrina, desverminados, vacinados e negativos quanto a presença de anticorpos anti-gp43 e reação intradérmica com

gp43 (EISELE et al. 2004), foram utilizados para a avaliação da ativação da via alternativa com tampão  $Mg^{+2}/EGTA$ . O soro do cão foi dividido em duas alíquotas, sendo testado uma alíquota do soro inativando o complemento à 65°C por 30 minutos e a outra alíquota do soro com complemento ativo.

Leveduras de *P. brasiliensis* (LDR1) cultivadas em Ágar Sabouraud por 5 dias a 37°C, foram lavadas em PBS estéril, filtradas com gaze e algodão estéreis, contadas em câmara de Neubauer. A massa celular foi transferida para o tampão  $Mg^{+2}/EGTA$  na concentração de  $1 \times 10^4$  células/ml.

Para a avaliação da via alternativa do complemento, as suspensões de *P. brasiliensis* em tampão  $Mg^{+2}/EGTA$ , foram incubadas com o soro do cão com complemento ativo e soro do cão com complemento inativado, durante 1 hora a 37°C e o controle realizado com suspensão de *P. brasiliensis* em tampão  $Mg^{+2}/EGTA$ , sem o soro do cão e incubados durante 1 hora a 37°C; após foram inoculados em placas de petri estéreis em meio ágar BHI conforme protocolo de SINGER - VERMES et al. (1992) (infusão coração cérebro, ágar, soro equino a 4% inativado, fator de crescimento a 5%, estreptomicina-penicilina 1%) incubadas a 37°C; em duplicata e observadas até 15 dias após o plaqueamento para contagem das colônias (UFC) e diâmetro das colônias. Para medir o diâmetro das colônias foi utilizado um aparelho “Paquímetro Digital 6” (Import: Socinter Sul Com. Interm. LTDA).

Os soros dos cães adultos, aparentemente saudáveis, com sorologia negativa para *P. brasiliensis*, foram utilizados como fonte de complemento. Neste estudo estes soros apresentaram atividade hemolítica da via alternativa de 125,0 e 66,67 AH50/ml. Como controle foram utilizados os soros inativados a 65°C por 30 minutos.

### **3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram analisados utilizando o programa STATISTIC 6.0, como teste de análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey-Kramer. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há poucos estudos sobre a PCM em animais, e o papel de algumas espécies como reservatórios ou hospedeiros intermediários do fungo *P. brasiliensis* permanece obscuro (MCEWEN & RESTREPO, 1995).

A infecção por *P. brasiliensis* foi observada por meio de sorologia e reação intradérmica em diferentes espécies de animais domésticos e silvestres, porém o fungo foi isolado repetidas vezes em diferentes locais apenas do tatu (*Dasypus novemcinctus*) (NAIFF, 1986; BAGAGLI, 1998).

O cão devido aos hábitos de farejar e escavar o solo poderia ser um bom indicador epidemiológico de paracoccidioomicose (ONO et al. 2001).

Estudos epidemiológicos foram realizados para verificar a prevalência de infecção e doença e sua distribuição geográfica. Em experimentos realizados por MÓS e FAVA NETTO (1974), utilizando a reação de fixação do complemento e a reação de precipitação com o antígeno polissacarídico de *P. brasiliensis* em 145 cães, sendo 113 de São Paulo e 32 de Botucatu - SP. Foi observado que 74,3% dos cães de São Paulo e 78,1% dos cães de Botucatu, apresentaram positividade na reação de fixação do complemento, enquanto que na reação de precipitação apenas um animal apresentou positividade.

ONO et al. (2001) realizaram estudos epidemiológicos em cães por meio do ensaio de ELISA utilizando a gp43 como antígeno sendo relatado elevado índice de infecção por *P. brasiliensis* em cães da Região Norte do Paraná, com positividade de 14%, 48,8% e 89,5% em cães da zona urbana, periurbana e rural, respectivamente.

Recentemente, os dois primeiros casos de PCM natural em cães foram relatados (RICCI et al. 2004 e FARIAS et al. 2005). Os altos índices de infecção demonstrados em estudos epidemiológicos e o reduzido número de casos de PCM doença em cães, sugerem que esta espécie deve ser resistente ao desenvolvimento de PCM.

Considerando que o sistema complemento é um dos principais mecanismos efetores do sistema imune (KIRSCHFINK & MOLLNES, 2003), neste estudo foi avaliado o efeito do sistema complemento do cão sobre o fungo dimórfico *P. brasiliensis*.

Inicialmente, para determinação da atividade hemolítica da via alternativa foi realizado um experimento para determinar a hemácia adequada para ativação da via alternativa em cães. Foram utilizadas hemácias de carneiro (10,75%), galinha (12,60%), coelho (12,75%), suíno (18,93%) e cobaia (66,62%). A hemácia de cobaia apresentou maior capacidade de ativação da via alternativa e portanto foi escolhida para os ensaios de determinação de AH50 (figura 1).

A avaliação do resultado de eritrócitos de diferentes espécies de animais, obtida neste estudo não está de acordo com TANAKA et al. 1987, que avaliou a via alternativa do complemento, em cães da raça Beagle, apresentando o melhor eritrócito de suíno (AH50 U/ml 20,4), seguido de cobaia (AH50 U/ml 14,6) e de coelho (AH50 U/ml 14,4).

TANAKA et al. 1987, avaliando a via alternativa do complemento utilizando eritrócitos de 13 diferentes espécies de animais, foram obtidos altos valores de AH50 em soro de bovino, suíno, carneiro e coelho, quando medidos com eritrócito de cobaia.

As atividades hemolíticas das vias clássica (CH50) e alternativa (AH50), em 27 soros de cães aparentemente saudáveis, foram 167,43/ml e 87,2/ml, respectivamente. Não foi observada diferença significativa em relação ao sexo para ambas as vias (Tabela 1).

As médias de CH50 para cães filhotes, adultos e idosos foram de 144,39 +/- 80,65; 194,97 +/- 39,14; 157,30 +/- 98,07, respectivamente; enquanto que as médias de AH50, para as mesmas faixas etárias, foram de 67,94 +/- 52,86; 88,79 +/- 54,90; 101,10 +/- 52,02, respectivamente (figura 2). Não foi observada diferença significativa entre as atividades hemolíticas, tanto da via clássica quanto da alternativa e as diferentes faixas etárias.

LEVY (1958) obteve valores de CH50 de várias espécies de mamíferos, inclusive cães, em experimento realizado com amostra de sete cães apresentando um valor de 21,7 - 47,3 CH50. BARTA & BARTA (1973), avaliaram o CH50 em soro de cães, e observaram valores entre 32 a 96 CH50.

WOLF et al. (1980), observaram média de CH50 significativamente menores em cães abaixo de 6 meses de idade, quando comparados com cães de idade superiores a 6 meses. Em nosso estudo, observamos uma tendência de menores níveis de CH50 em filhotes; porém a diferença não foi estatisticamente significativa.

A avaliação do resultado da média de CH50 obtida neste estudo entre a faixa etária dos cães foram de 165,55 +/- 30,27; que está de acordo com a média de 185 CH50 de amostras de cães obtidas de 113 cães por WOLF et al. (1980).

Os valores observados de CH50 em cães normais por WOLF et al. (1980) foram superiores aos apresentados por LEVY, (1958) e de BARTA & BARTA, (1973). Esta discrepância provavelmente resulta das diferenças nas condições de cada estudo, como concentração de hemácias, tempo de incubação, bem como as diferenças em relação as populações de animais estudadas.

No experimento para avaliação da ativação da via alternativa de cão pelo fungo *P. brasiliensis*, foi observada uma maior ativação da via alternativa, estatisticamente significativa, em cães adultos quando comparados aos cães filhotes e idosos (figura 3).

A maior capacidade de ativação da via alternativa observada nos cães adultos, sugere que esses animais estariam mais protegidos e responderiam mais adequadamente à infecção por *P. brasiliensis*. ONO et al. (2003), relataram a suscetibilidade de cães filhotes à infecção experimental com *P. brasiliensis*, podendo estar relacionada à menor capacidade de ativação da via alternativa do complemento. EISELE et al.(2004), realizaram infecção experimental com *P. brasiliensis* em 6 cães adultos e nenhum dos animais desenvolveram a PCM doença, sugerindo que cães adultos são resistentes.

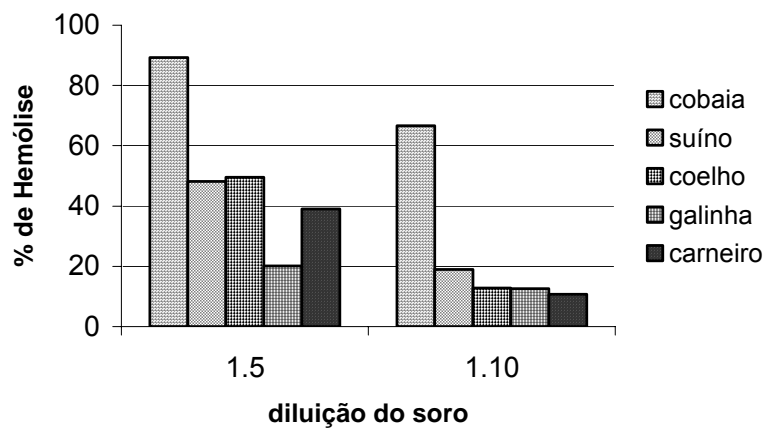
O efeito protetor da via alternativa do complemento de cão foi avaliado por meio de incubação de suspensão de *P. brasiliensis* com soro de cão em presença de EGTA, que bloqueia a ativação da via clássica (PHIMISTER & WHALEY, 1990).

Foram utilizadas amostras de soro de dois cães com sorologia negativa para *P. brasiliensis*. O soro do cão 1 apresentou maior atividade sobre o fungo *P. brasiliensis*, pois continha maior atividade da via alternativa que a amostra do cão 2 (125 e 66,67 AH50/ml, respectivamente) (figura 4). O soro do cão 1 apresentou redução significativa no número de UFC, quando comparado com o controle incubado com o soro inativado. Este mesmo cão apresentou uma redução significativa no diâmetro das colônias de *P. brasiliensis*. O soro do cão 2 entretanto, não apresentou redução no número de UFC do fungo e a redução no diâmetro das

colônias não foi estatisticamente diferente do controle com soro inativado (figura 5 e 6).

Estes resultados sugerem que a via alternativa do complemento pode ter um papel protetor na paracoccidiodomicose canina, porém mais estudos são necessários para efetivamente determinar o papel efetor do sistema complemento.

Estes resultados sugerem que a via alternativa do complemento pode ter um papel protetor na paracoccidiodomicose canina, porém mais estudos são necessários para efetivamente determinar o papel efetor do sistema complemento.

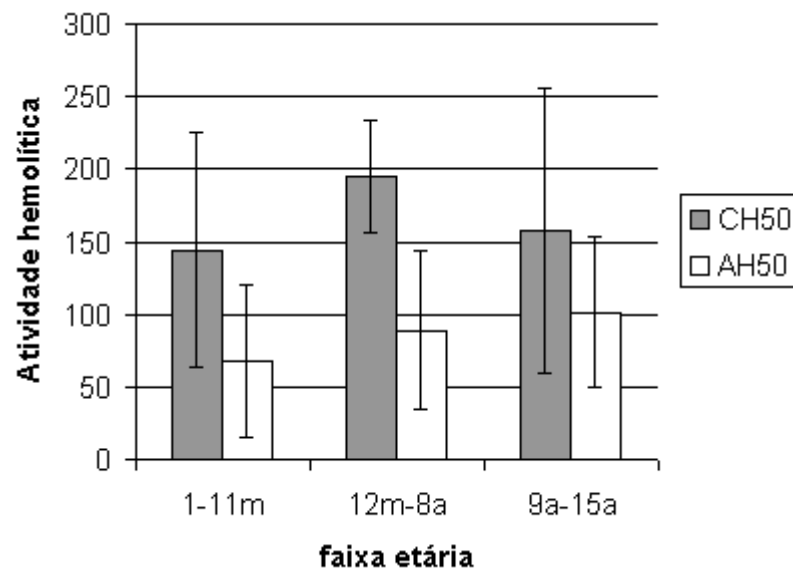


**Figura 1** – Determinação da atividade hemolítica da via alternativa. Foram avaliados a lise de eritrócitos de diferentes espécies de animais pela via alternativa do complemento de cão.

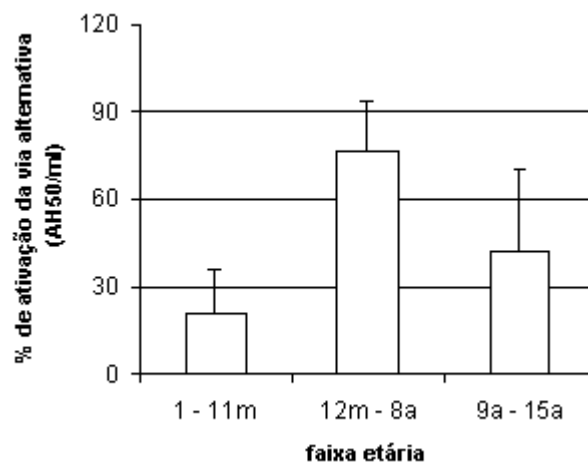
**Tabela 1** – Atividade hemolítica das vias clássica (CH50) e alternativa (AH50) em soros de cães, de acordo com o sexo.

	CH50/ml	AH50/ml
<b>Macho</b> (n= 16)	157,27(± 78,77)*	80,94 (± 53,63)*
<b>Fêmea</b> (n=11)	182,20 (± 72,03)*	96,32 (± 50,58)*
<b>Total</b> (n=27)	167,43 (± 75,71)*	87,20 (± 51,98)*

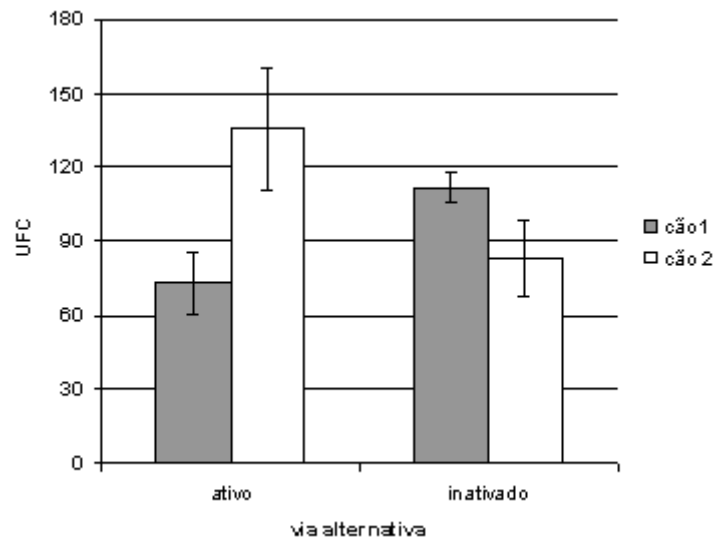
\* Desvio Padrão



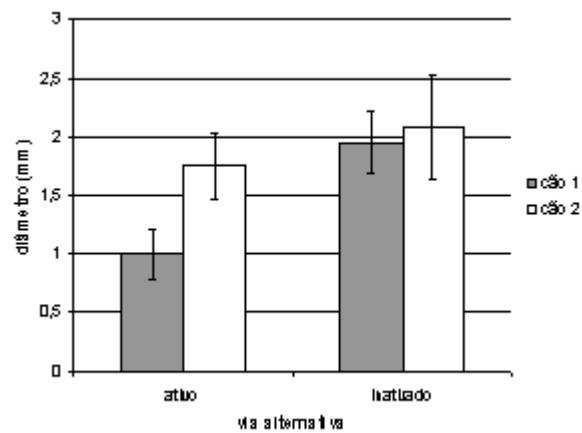
**Figura 2** – Atividade das vias clássicas (CH50) e alternativa (AH50) do complemento em cães de diferentes faixas etárias. Foram avaliados 27 cães divididos por faixa etária filhotes (1-11m), adultos (12m -8 anos) e idosos (9anos - 15 anos). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias.



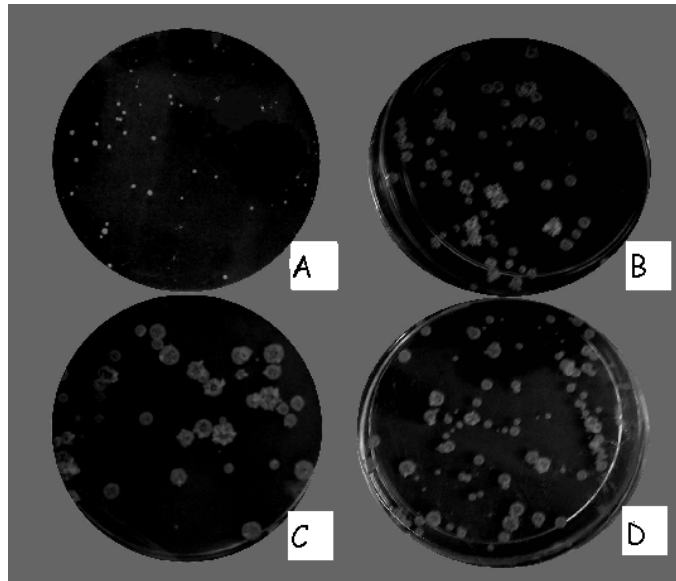
**Figura 3** – Determinação da ativação da via alternativa de cão pelo *P. brasiliensis*. Foi avaliada a via alternativa do complemento por *P. brasiliensis* em soro de cão de diferentes faixas etárias. Houve diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias.



**Figura 4** – Análise "in vitro" do complemento sobre *P. brasiliensis*. Foi avaliado o efeito da via alternativa do complemento de cão sobre a viabilidade de *P. brasiliensis* (UFC).



**Figura 5** – Determinação do diâmetro (mm) das colônias da via alternativa do complemento de cão. O diâmetro das colônias do fungo *P. brasiliensis* foram analisados, quando incubados com soro do cão 1 e cão 2, com complemento ativo e inativado.



Placas A e B: soro ativo dos cães 1 e 2, respectivamente,  
Placas C e D: soro inativado dos cães 1 e 2, respectivamente.

**Figura 6** – Efeito do complemento de cão sobre o número e tamanho das colônias de *P. brasiliensis*.

## 5 CONCLUSÕES

- A atividade hemolítica das vias clássica e alternativa do complemento de cão, não apresentaram diferença estatística em relação ao sexo e a faixa etária.
- Os cães adultos apresentaram maior capacidade de ativação da via alternativa pelo fungo *P. brasiliensis*, que os cães filhotes e idosos.
- A via alternativa do complemento do cão apresentou atividade biológica sobre o fungo *P. brasiliensis* "in vitro", reduzindo a viabilidade e o crescimento.

## REFERÊNCIAS

- ALBORNOZ, M.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia*. v. 9: 248-53, 1971.
- ALMEIDA, O. P., JACKS, J. Jr. Paracoccidioidomycosis of the mouth: na emerging deep mycosis. *Crit. Rev. Oral Biol Med*, vol.14; 4: 268-274, 2003.
- ARANGO, M., OROPEZA, F., ANDERSON, O., CONTRERAS, C., BIANCO, N. & YARZABAL, L. Circulating immune complexes *and in vitro* cell reactivity in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, 79, 153-158, 1982.
- ARANGO, R., RESTREPO, A.. Growth and production of iron chelants by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial and yeast forms. *Rev. J. Med Vet Mycol*, vol 26; 2: 113-8, 1988.
- BAGAGLI E, SANO A, COELHO KI, ALQUATI S, MIYAJI M, CAMARGO ZP, *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 58:505-512, 1998.
- BARTA, O AND BARTA, V., Canine Hemolytic Complement: Optimal Conditions for its Titration. *Am. J. Vet. Res.*, 34, 653-657, 1973.
- BLOTTA, M. H. S. L.; CAMARGO, Z. P. Immunological Response to Cell-Free Antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: Relationship with Clinical Forms of Paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 31, 3: 671 -676, Mar, 1993.
- BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A. R. The pathology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends in Microbiology*, 10: 80-87, 2002.
- BRUMMER, E.; HANSON, L.H; STEVENS, D. A. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *P. brasiliensis*: evidence for nonoxidative mechanisms. *Intern. J. Immunopharmacol*, 10:945-952, 1988.
- BURGER, E.; VAZ, C. A.; SANO, A. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell dependent e T cell-independent components. *Am. J. Trop. Med.*, v. 55, p. 391-8, 1996.

CALICH, V. L. G., KIPNIS, T. L., MARIANO, M., FAVA NETTO, C. & DIAS DA SILVA, W.. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 12, 20-30, 1979.

CAMARGO, Z. P.; GUESDON, J. L.; DROUHET, E.; IMPROVISI, L. Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparison with counter immunoelectrophoresis and erythro-immunoassay. *Mycopathologia*, 81: 31-7, 1984.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev. Iberoam Mycol*, 17; 41-48, 2000.

CANO, L.E. et. al. An evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.*, 24: 467-475, n.. 6, 1986.

CANO, L. E.; ARANGO, R.; SALAZAR, M. E. et al. Killing of *P. brasiliensis* by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J. Med. Vet. Mycol*, 30:161-168, 1992.

CERRI, A.; SILVA, C. E. X. R.; PACCA, F. O. Paracoccidioidomycose: aspectos de interesse para o cirurgião-dentista. *Revista Paulista de Odontologia*. São Paulo, 20: 19-24, 1998.

CONTI-DIAZ, I. A.; ALVAREZ, B. J.; GEZUELE, E.; GONZALEZ MARINI, H.; DUARTE, J.; FALCON, J. Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 14(6): 372-6, 1972.

CORREDOR, G.G., CASTAÑO, J. H., PERALTA, L.A. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in na dendemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev. Iberoam Micol*; 16: 216-220, 1999.

COSTA, E., FAVA NETTO, C. Paracoccidioidina and histoplasmina intradermic tests in domestics animals. *Sabouradia*, 16:103-111, 1978.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M. O.; SABORZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995) *Caderno Saúde Pública Rio de Janeiro*, 1441-1454, 2002.

DEL NEGRO, G. M.; SIQUEIRA, A. M. Serodiagnosis. In: FRANCO, M. F.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. *Paracoccidioiodomycosis*, CRC Press, p. 345-63, 1994.

EISELE, R.C.; JULIANI, L.C.; BELITARDO, D.R.; ITANO, E.N.; ESTEVÃO, D.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; CAMARGO, Z.P.; ONO, M.A. Immune response in dogs experimentally infected with *Paracoccidiooides brasiliensis*. *Med. Mycol.*, 42: 549-553, 2004.

FAGUNDES, R.Q. Pesquisa da paracoccidioidomicose em cães (*Canis familiaris*) na região endêmica de Botucatu, São Paulo. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu da Universidade Estadual Paulista - Unesp. 2002.

FARHAT, C.K.; RAYMUNDO, M.E.C.; GASPAR, J. M. *et al.* Paracoccidioidomicose na criança: relato de dois casos. *J. Pediat.* (Rio de J.), 60: 226-231, 1986.

FARIAS, M. R.; WERNER, J; MURO, M.; MARQUES, S. A.; MARQUES, M. E.; FRANCO, M.; RIBEIRO, M. G.; CUSTÓDIO, C. C.; CONDAS, L. A. Z.; BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, E. Canine Paracoccidioiodomycosis: case report of generalized lymphadenitis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, October, 47(14), 64, 2005.

FRANCO, M. Host-parasite relationship in paracoccidioiodomycosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 25, 5-18, 1986.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. Paracoccidioiodomycosis: a recently proposed classification on its clinical forms. *Soc. Bras. Med. Trop.*, 20: 129-133, 1987.

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

GOLDANI, L. Z., VANUCCHI, H., ZUCOLOTO, S., MARTINEZ, R. Experimental paracoccidioiodomycosis in alcoholic rats. *Braz J Med Biol.*; 24: 902-907, 1991.

GROSE, E. and TAMSITT, J. R. *Paracoccidiooides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colômbia. *Sabouraudia*, v. 4, p. 124-5, 1965.

JOHNSON, W.D.; LANG, C.M. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet. Pathol.*, 14: 368-371, 1977.

KIRSCHFINK, M;MOLLNES, T.E. Modern Complement Analysis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol.10, p.982-989, 2003.

LACAZ C. S. Aspectos clínicos gerais. Formas polares de paracoccidioidomicose. In: Del Negro G., Lacaz CS, Fialho AM (Eds) Paracoccidioidomycosis. São Paulo, Sarvier-EDUSP, 1982.

LARIN, N.M.;GADDUM, R.;ORBELL, W.G. The Complement Activity of Canine Serum. *Journal of Hygiene.*, vol.55, p.402-413, 1957.

LEVY, A.L. Complement levels in mammals. *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, vol.99, p.584-585, 1958.

LONDERO, A.T., MELLO, I. Paracoccidioidomicose. *Jornal Brasileiro de Medicina* 55:96-115, 1988.

LUCENA, R.; GINEL, P.J.; HERNANDEZ, E.; NOVALES, M. Effects of short courses of different doses of prednisone and dexamethasone on serum third component of complement(C3) levels in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol.68, p.187-192, 1999.

MARTINEZ, R.; MOYA, M. J. Associação entre paracoccidioidomicose e alcoolismo. *Revista de Saúde Pública*, 26:12-16, 1992.

MARTINEZ, R. Blastomicose Sul-Americana (Paracoccidioidomicose): Etioepidemiologia e ecologia. Tratado de Infectologia (R. Veronesi & R. Focaccia, org.), 1081-1083, São Paulo, Editora Atheneu, 1996.

MCEWEN, J. G., GARCIA, A. M.,ORTIZ, B. L., BOTERO, S., RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Arch Med Res*, vol 26; 3: 305-6, 1995.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; BUENO, J. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Detection of 43,000 molecular-weight-glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.27, p.2842-2845, 1989.

MENDES-GIANNINI, M. J.; MORAES, R. A.; RICCI, T. A. Proteolytic activity of 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 32:384-385, 1990.

MENDES-GIANNINI, M. J.; MORAES, R. A.; BRANCO, F. C.; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis manifesting as oral lesions: clinical, cytological and serological investigation. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 23, p. 85-7, 1994.

MONTENEGRO, M. R. G. Formas clínicas da paracoccidioidomicose. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 28, p. 203-4, 1986.

MÓIS, E. N. e FAVA NETTO, C. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. I. Possível papel epidemiológico dos cães. Estudo sorológico e anatomo-patológico. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 16, p. 154-9, 1974.

MOSCARDI-BACCHI, M., BRUMMER, E., STEVENS, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *Rev. J Med Microbiol*, vol 40; 3: 159-64, 1994.

MUNK, E. M. AND DIAS DA SILVA, W.; Activation of human complement system *Paracoccidioides brasiliensis* and its deposition on the yeast form cell surface. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 30, 481-484, 1992.

MUSSATI, C.C, PERAC, O. OLI, M.T.S, SOARES, A.M.V.C., Rezkallah-Iwasso MT. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. Paracoccidiodomycosis. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 175-86, 1994.

NAIFF, R.D.; FERREIRA, L.C.P.; BARRTE, T.V. et al. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 28: 19-27, 1986.

NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. *Prensa Med. Argent.*, v. 53, p. 2831-2, 1966.

ONO, M.A. Contribuição ao estudo de eco-epidemiologia do *Paracoccidioides brasiliensis*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo, 2000.

ONO, M.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; MORAIS, H.S.A.; TRAPP, S.M.; BELITARDO, D.R.; CAMARGO, Z.P. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med. Mycol.*, 39: 277-282, 2001.

ONO, M.A.; ITANO E.N.; MIZUNO L.T.; MIZUNO E.H.; CAMARGO Z.P. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: Is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? *Med. Mycol.*, 40: 493-499, 2002.

ONO, M.A.; KISHIMA, M.O.; ITANO, E.N.; BRACARENSE, A.P.; CAMARGO, Z.P. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. *Med. Mycol.*, 41: 265-268, 2003.

PANIAGO, A. M. M.; AGUIAR, J. I. A.; AGUIAR, E. S.; CUNHA, R. V.; PEREIRA, G. R. O. L.; LONDERO, A. T.; WANKE, B. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado do Mato Grosso do Sul. *Ver. Da Soc. Bras. De Med. Trop.*, 36(4)455-459, 2003.

PERAÇOLI, M.T.S.; SOARES, A.M.V.C.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; PEREIRA, P.C.M.; RESKALLAH-IWASSO, M.T. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 29: 373-380, 1991.

PEREIRA, M.; VIANNA, G. A propósito de um caso de blastomicose (*Pyohemia blastomycotica*). *Arq. Brasil. Med.*, v. 1, p. 65-83, 1911.

PHIMISTER, G.M. & WHALEY, K. Measurement of complement In: *Clinical Immunology: A practical approach*. GOOL & CHAPEL, H. Oxford University Press, New York, p.263, 1990.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect. Immunol.*, v. 53, p. 199-206, 1986.

QUEIROZ-TELLES, F. et. al. Paracoccidioidomicose. *Prog. De Ed. Med.-Paracoccidioidomicose. Soc. Bras. de Inf.*; Janssen-Cilag, 1998.

RICCI, G.; MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R. C.; BORRA, R. C.; FRANCO, M. Canine Paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology*, 42, 379-383, 2004.

SAN-BLAS, G. The cell wall of fungal human patogens: Its possible role in host parasite relationship. *Mycopathologia*, 79: 159-184, 1982.

SANTOS, W. A.; SILVA, B. M.; PASSOS, E. D.; ZANDONADE, E.; FALQUETO, A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo. *Caderno de Saúde Pública*, 19(1):245-253, 2003.

SCULLY, C.; ALMEIDA, P. Orofacial manifestations of the systemic mycoses. *J. Oral Pathol. Med.*, 21 (7-10), 289-294, 1992.

SILVA, S. H. M.; GROSSO, D. M.; LOPES, J. D.; COLOMBO, A. L.; BLOTTA, M. H. S. L.; QUEIROZ-TELLES, F.; CAMARGO, Z. P. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp 70 Circulating Antigen and Follow-Up of Patients Undergoing Antimycotic Therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 4480-4486, 2004.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CHADU, M.A. et al. - Isolamento de nova amostra do *Paracoccidioides brasiliensis* em plantação de café. In: Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis, 6., Montevideo, p. 80, 1996.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z.P.; MALTA, M.H.; MAFFEI, C.M., CHADU, J.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med Mycol.*; v. 38: 193-9, 2000.

SINGER-VERMES, L. M.; CIAVAGLIA, M. C.; KASHINO, S. S.; BURGER, E.; and CAILCH, V. L. G. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *P. brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.*, v.30, p.261-264, 1992.

SOUZA, M. C.; GESZTESI, J. L.; SOUZA, A. R.; MORAES, J. Z.; LOPES, J. D.; CAMARGO, Z. P. Differences in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp 43 isoforms. *J. Med. Vet. Mycol.*, 35:13-18, 1997.

TABORDA, C. P. and CAMARGO, Z. P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 554-6. 1994.

TANAKA, S.; KITAMURA, F.; SUZUKI, T.; Studies on the hemolytic activity of the classical and alternative pathway of complement in various animal species. *Complement*, 4: 33 - 41, 1987.

TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R.; CISALPINO, P.; TABORDA, C.; RODRIGUES, E. G.; RODRIGUES, M.; SILVEIRA, J. F.; ALMEIDA, I. C. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med. Res.*, 26: 297-304, 1995.

VERLI, F. D.; MARINHO, S. A.; de SOUZA, S. C.; FIGUEIREDO, M. A. Z.; YURGEL., L. S. Clinical-epidemiologic profile of paracoccidioidomycosis at the Stomatology Department of São Lucas Hospital, Pontificia Universidade Católica of Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(3):234-237, 2005.

WOLFE, J.H.;HALLIWELL, R.E.W. Total hemolytic complement values in normal and diased dog populations. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol.1, p.287-298, 1980.