



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MELINA BERTOLLA GALVÃO

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA *PARACOCCIDIOIDES*
BRASILIENSIS EM POMBAS SILVESTRES (*ZENAIDA*
AURICULATA)**

Londrina
2011

MELINA BERTOLLA GALVÃO

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA *PARACOCCIDIOIDES*
BRASILIENSIS EM POMBAS SILVESTRES (*ZENAIDA*
AURICULATA)**

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

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G182d Galvão, Melina Bertolla.
Detecção de anticorpos para *Paracoccidioides brasiliensis* em pombas silvestres (*Zenaida auriculata*) / Melina Bertolla Galvão. – Londrina, 2011.
38 f. : il.

Orientador: Mario Augusto Ono.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2011.
Inclui bibliografia.

1. *Paracoccidioides brasiliensis* – Teses. 2. Antígenos de fungos – Teses. 3. *Paracoccidioidomicose* – Teses. 4. Resposta imune – Teses. 5. Patologia experimental – Teses. I. Ono, Mario Augusto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

MELINA BERTOLLA GALVÃO

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA *PARACOCCIDIOIDES*
BRASILIENSIS EM POMBAS SILVESTRES (*ZENAIDA AURICULATA*)**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Roberta Lemos Freire
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 09 de agosto de 2011.

DEDICO

À minha família, em especial, meus pais Sebastião e Luciene, que sempre me apoiaram, meus irmãos Lindsey e Lucas, pela força e companheirismo e meus sobrinhos Júlia e Francisco pela alegria de sempre

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Mario Augusto Ono, pela confiança, paciência e oportunidade de aprendizado.

Ao prof. Dr. João Luis Garcia do departamento de Medicina Veterinária Preventiva e ao pós-graduando Luiz Daniel de Barros por colaborarem com os soros dos animais.

Aos amigos de Laboratório Aline Miyuki Omori, Aline Cavalcanti do Amaral, Atilio Sersun Calefi, Donizeti Rodrigues Belitardo, Gabriela Gonçalves de Oliveira, Isabele Kasahaya Borges, Tatiana Reichert da Silva Assunção, entre outros, pela ajuda, pelo companheirismo e momentos de descontração.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental pelos conhecimentos compartilhados.

À minha família que sempre me apoiou, em especial ao meu tio Silvio Florêncio pela ajuda no momento de aperto.

A todos os meus amigos que sempre estiveram presentes, pela ajuda nos momentos difíceis e pelos momentos de alegria e descontração.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho, o meu agradecimento sincero.

GALVÃO, Melina Bertolla. **Detecção de Anticorpos para *Paracoccidioides brasiliensis* em Pombas Silvestres (*Zenaida auriculata*)**. 2011. 38 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Universidade Estadual de Londrina. 2011.

RESUMO

A Paracoccidioidomicose (PCM), causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, é a principal micose sistêmica endêmica na América Latina. O agente etiológico da PCM apresenta dimorfismo termo-dependente crescendo na forma micelial a 25°C e na forma de levedura à 37°C. Os trabalhadores rurais do sexo masculino são os principais acometidos e a infecção ocorre provavelmente por inalação de propágulos de *P. brasiliensis* provenientes do solo. A pomba silvestre *Zenaida auriculata* é uma espécie campestre de formas delgadas com cerca de 21 cm, nas regiões sul e sudeste do Brasil, ocorre em vários habitats, inclusive em cidades, e aparentemente explora diferentes tipos de recursos alimentares, tais como restos alimentares produzidos pelo homem, e alguns tipos de sementes de interesses econômicos. O grande número de indivíduos em cidades tem causado preocupações às autoridades em função do potencial de transmissão de patógenos, tendo a espécie como reservatórios de patógenos. A participação de outras espécies de animais na eco-epidemiologia da paracoccidioidomicose não está esclarecida. Este trabalho teve como objetivo avaliar a infecção em duas populações da pomba silvestre *Z. auriculata* pelo fungo *P. brasiliensis*, além de avaliar a resposta imune humoral. Duas pombas foram imunizadas com *P. brasiliensis* e produziram anticorpos IgY para gp43. As amostras de soro (n=113) de *Z. auriculata* capturadas em dois locais (Campus Universidade estadual de Londrina-UEL e cooperativa Integrada) no município de Londrina, Norte do Paraná, foram analisadas por ELISA indireto, usando gp43 como antígeno. A positividade observada foi de 83,7% em pombas capturadas no campus da Universidade Estadual de Londrina e 11% em pombas capturada na Cooperativa Integrada, sugerindo que a pomba *Z. auriculata* infecta-se facilmente com *P. brasiliensis* e poderia ser utilizada como animal sentinela.

Palavras-chaves: Paracoccidioidomicose. Sorologia. Epidemiologia.

GALVÃO, Melina Bertolla. **Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in Wild Dove (*Zenaida auriculata*)**. 2011. 38 p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM), the main systemic endemic mycosis in Latin America, is caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. The fungus is thermal dimorphic and grows in mycelial form at 25°C and as yeast at 37°C. The infection occurs by inhalation of *P. brasiliensis* propagules probably from the soil and the disease affects mainly male rural workers. The wild dove *Zenaida auriculata* is frequent in southern and southeastern Brazil and occurs in various habitats, including cities, and apparently explores different types of food resources, such as food debris and some types of seeds of economic interest. The large number of individuals in cities has caused concern due to the potential transmission of pathogens. The objective of this study was to evaluate the infection the *P. brasiliensis* in two populations of *Z. auriculata*. Initially, two doves were immunized with *P. brasiliensis* inactivated yeast cells and produced IgY antibodies for gp43. The samples of the serum (n=113) from *Z. auriculata* captured in two locations (Campus State University of Londrina and Integrated Cooperative) in the municipality of Londrina, Northern Parana, were analyzed by indirect ELISA, using gp43 as antigen. The positivity observed was of 83,7% in doves captured in the campus of State University of Londrina and 11% in doves captured in Integrated Cooperative, suggesting that *Z. auriculata* dove is easily infected with *P. brasiliensis* and could be used as animal sentinels.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*. *Zenaida auriculata*. Epidemiology

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS

gp43	Glicoproteína de 43 kDa;
PCM	Paracoccidioidomicose;
ELISA	Ensaio Imunoenzimático;
rDNA	DNA Ribossomal;
PCR	Reação em Cadeia Polimerase;
PBS	Tampão Salina Fosfato;
TMBZ	Tetrametilbenzidina;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Foto espécie Pombo Silvestre.....	18
Figura 2 – Mapa do município de Londrina, Norte do Estado do Paraná, Sul do Brasil	21
Figura 3 – Mapa com os locais de captura das Pombas Silvestres. A- Universidade Estadual de Londrina. B- Cooperativa Integrada.....	22
Figura 4 – Resposta Imune Humoral das Pombas Imunizadas com <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM ANIMAIS DE INTERESSE ECONÔMICO	12
1.1.1	Eqüinos	12
1.1.2	Bovinos	13
1.1.3	Galinhas	13
1.2	PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM ANIMAIS DE COMPANHIA	14
1.2.1	Cães	14
1.2.2	Gato	15
1.3	PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM ANIMAIS SILVESTRES	15
1.3.1	Tatus	15
1.3.2	Primatas	16
1.3.3	Preguiça	16
1.3.4	Pinguim	16
1.4	PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM ANIMAIS SINANTRÓPICOS	17
1.4.1	Morcegos	17
1.5	<i>ZENAIDA AURICULATA</i>	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	ÁREA DE ESTUDO	21
3.2	AMOSTRAS	22
3.3	ANTÍGENOS DE <i>P. BRASILIENSIS</i>	22
3.3.1	Antígeno Celular	22
3.3.2	Exoantígeno	23
3.3.3	Gp43	23
3.4	IMUNIZAÇÃO DAS POMBAS SILVESTRES	23
3.5	ELISA INDIRETO	23
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	24

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE POMBAS (<i>ZENAIDA AURICULATA</i>) IMUNIZADAS COM <i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS</i>	25
4.2	ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM POMBAS SILVESTRES <i>ZENAIDA AURICULATA</i>	26
5	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30
	ANEXO	35
	Autorização IBAMA para atividades com finalidade científica	36

1 INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Adolpho Lutz, em 1908, descreveu os primeiros casos de PCM em dois pacientes com lesões nasofaríngeas. Os casos da PCM estão restritos à América Latina, estendendo-se do México à Argentina (ALBORNOZ, 1971; SAN-BLAS & NINO-VEGA, 2001). No Brasil é considerada a oitava causa de morte entre doenças infecciosas e parasitárias (COUTINHO et al., 2002).

O fungo *P. brasiliensis* apresenta dimorfismo termo-dependente, cresce a 25°C na forma de micélio e a 37°C e nos tecidos do hospedeiro encontra-se na forma de levedura (LACAZ, 1994).

Indivíduos que desenvolvem PCM-doença são geralmente trabalhadores rurais. As lesões granulomatosas são frequentemente observada em pulmões, linfonodos, baço, fígado, pele e mucosa. A infecção ocorre provavelmente por inalação de propágulos do fungo (RESTREPO, A. 1985).

Números de casos maior em homens do que em mulheres, pois o fungo, quando em contato com o hormônio feminino 17-B-estradiol, torna-se incapaz de transformar-se em levedura, essencial para induzir a doença (Ministério da Saúde, 2005).

Apesar de existirem vários estudos sobre o diagnóstico e patogenia da PCM, pouco se conhece sobre a ecologia do agente etiológico *P. brasiliensis*. Embora poucos isolados do fungo tenham sido obtidos a partir do solo, acredita-se que este seja o hábitat o fungo. Negroni (1966), Albornoz (1971) e Silva-Vergara (1998) obtiveram isolados de amostras do solo da Argentina, Venezuela e Brasil respectivamente. Contudo outras tentativas de isolamento a partir do solo não obtiveram sucesso.

Segundo Conti-Diaz (1989) o fungo *P. brasiliensis* vive provavelmente na natureza protegido por outros seres, vertebrados e invertebrados aquáticos heterotérmicos infectados provavelmente com a fase leveduriforme. Esses hospedeiros “protetores” não seriam apenas capazes de perpetuar a espécie como também transportariam o fungo a substratos apropriados para sua vida seguramente transitória na fase miceliana capaz de infectar acidentalmente humanos e outras espécies de animais.

A PCM pode ser classificada em PCM infecção, PCM doença de forma aguda ou subaguda (forma juvenil), forma crônica (tipo adulta) ou forma residual (sequelas). A PCM crônica pode ser subdividida em PCM unifocal ou multifocal conforme o número de locais de lesões (FRANCO, 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 antígenos de *P. brasiliensis*, porém não desenvolvem a doença. A PCM doença afeta principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino, com idade média de 40 anos. A forma crônica ocorre em mais de 90% dos pacientes com PCM, e é mais frequente em indivíduos adultos do sexo masculino. A doença progride lentamente e o período de incubação pode durar meses ou anos. A forma aguda ou juvenil é caracterizada por um período curto de incubação (semanas a meses) e por envolvimento do sistema reticuloendotelial (LONDERO; MELO, 1983).

Dentre os diversos antígenos produzidos pelo fungo, a glicoproteína gp43 é reconhecida pela maioria dos pacientes com PCM, sendo considerada o principal antígeno utilizado na sorologia da PCM (SOUZA et al 1997).

Devido a dificuldade de isolamento do *P. brasiliensis* a partir de amostras do solo Ono e colaboradores (2002) mostraram que diferentes agrotóxicos como inseticidas, fungicidas e herbicidas, podem inibir o crescimento do fungo "in vitro". O que poderia explicar a dificuldade de isolamento desse fungo a partir de amostras de solo.

O uso de animais sentinelas é uma das abordagens possíveis para auxiliar na busca do habitat do *P. brasiliensis* (NEVES et al 2006).

1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM ANIMAIS DE INTERESSE ECONÔMICO.

1.1.1 Equinos

Em estudo epidemiológico de PCM com 195 cavalos, por meio de reação intradérmica com paracoccidiodina, realizado no Uruguai demonstrou uma positividade de 23% (CONTI-DIAZ et al. 1972), enquanto que em um estudo epidemiológico de PCM em 100 cavalos de propriedades rurais, por meio do teste

de ELISA com gp43, na região Norte do Estado do Paraná, foi observado uma positividade de 30% (CORTE et al. 2005).

1.1.2 Bovinos

Gutierrez e colaboradores (1974) em um estudo utilizando reação intradérmica com paracoccidioidina, avaliaram 293 bovinos na Colômbia e observaram uma positividade de apenas 2%.

Costa e colaboradores (1978) realizaram um estudo de infecção experimental com *P. brasiliensis* em três bovinos por via intratesticular. Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram observadas por exame histopatológico dos testículos, porém em outros órgãos como fígado, pulmão, baço e rins não foram observadas lesões. O fungo não foi isolado.

Silveira e colaboradores (2008) realizaram estudo sorológico pelo teste de ELISA com gp43 como antígeno, em 400 bovinos de quatro municípios do Estado do Mato Grosso do Sul: que foram Dourados, Corumbá, Nova Andradina e São Gabriel d'Oeste. Os animais de Corumbá e Nova Andradina apresentaram maior positividade, 30% e 28% respectivamente; enquanto que os municípios de Dourados e São Gabriel d'Oeste apresentaram uma positividade de 8% e 4% respectivamente.

1.1.3 Galinhas

Oliveira e colaboradores (2010) realizaram estudo soroepidemiológico em galinhas de vida livre de municípios dos estados de Mato Grosso do Sul (n=40) e Paraná (n=100) e de galinhas de granja da região norte do estado do Paraná (n=43). Os animais de vida livre apresentaram uma positividade de 55% do Mato Grosso do Sul e 16% do Paraná, enquanto que as galinhas de granja não apresentaram positividade.

1.2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM ANIMAIS DE COMPANHIA.

1.2.1 Cães

Pereira e Viana (1911) realizaram o primeiro estudo de infecção experimental em cão. Um animal foi inoculado com pus de paciente com PCM e morreu 22 dias após a infecção, apresentando com sinais clínicos de PCM.

Mós e Fava-Neto (1974) em estudo utilizando fixação de complemento, avaliaram 113 cães da cidade de São Paulo e 45 da cidade de Botucatu, e observaram uma soropositividade de 74,33% e 78,2% respectivamente. Os autores não conseguiram detectar a presença de *P. brasiliensis* por exame microscópico ou em culturas realizadas com fragmentos de órgãos dos animais eutanasiados.

Estudo soroepidemiológico realizado com 305 cães da região Norte do Paraná demonstrou uma soropositividade de 89,5% em cães em área rural e 48,8% de cães da periferia das cidades. As amostras de soro dos animais foram testadas por ELISA usando gp43 como antígeno. Amostras do fígado, baço e pulmão de seis animais foram semeadas em meio de cultivo, porém não foi possível isolar *P. brasiliensis* (ONO et al. 2001).

Ono e colaboradores (2003) isolaram o fungo *P. brasiliensis* de amostras de fígado, pulmão e baço de dois cães filhotes que desenvolveram PCM-doença em um estudo de infecção experimental com *P. brasiliensis*. Os autores encontraram granulomas com formas da levedura do fungo no fígado, pulmões e baço. Em um outro estudo de infecção experimental em cães adultos, com *P. brasiliensis*, não foi possível o isolamento do fungo, e os animais também não desenvolveram sinais clínicos de PCM (EISELE et al. 2004).

Embora, o primeiro caso de PCM doença natural em cão, foi confirmado por exame histopatológico, imunohistoquímico e biologia molecular (PCR), de um cão que apresentou aumento dos linfonodos cervicais, não foi possível o isolamento do fungo (RICCI et al. 2004).

Farias e colaboradores (2005) relataram o segundo caso de PCM doença em cão, pelos exames histopatológico, imunohistoquímico. O animal apresentava hipertrofia dos linfonodos e do baço e emagrecimento, e, foi possível o isolamento do fungo *P. brasiliensis*.

1.2.2 Gato

Gonzalez e colaboradores (2010) relataram o primeiro caso de PCM em gatos, em um animal no Chile. O fungo foi detectado em fluido cerebrospinal (CSF) que revelou células de levedura compatível com *P. brasiliensis*. Exame de urina também revelou a presença do fungo. O diagnóstico do animal foi de infecção do sistema nervoso e urinário pelo fungo *P. brasiliensis*.

1.3 PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM ANIMAIS SILVESTRES.

1.3.1 Tatus

Naiff e colaboradores (1986) capturaram 20 tatus galinhas (*Dasyus novemcinctus*) no Estado do Pará. Os autores isolaram o fungo *P. brasiliensis* de quatro tatus, através de isolamento indireto em hamster. Sendo este o primeiro relato de isolamento do fungo em tatus.

O segundo estudo com isolamento de *P. brasiliensis* em tatus (*D. novemcinctus*) foi realizado por Bagagli e colaboradores (1998) em Botucatu, estado de São Paulo. Foram usados fragmentos de pulmão, baço, fígado e linfonodos mesentéricos de quatro tatus para a cultura. Os autores conseguiram isolar o fungo de três desses animais.

Em outro estudo, três espécies de tatus foram capturadas (*D. novemcinctus*, *D. septemcinctus* e *Euphractus sexcinctus*) em Goiás, porém foram obtidos isolados de *P. brasiliensis* apenas da espécie *D. novemcinctus* (MACEDO, 1999).

Corredor e colaboradores (1999; 2005) Isolaram *P. brasiliensis* de tatus das espécies *D. novemcinctus* e *Cabassous centralis* em áreas endêmicas na Colômbia.

16 tatus da espécie *Dasyus novemcinctus* capturados em Ibiá, Minas Gerais, onde em outro estudo isolaram o *P. brasiliensis* do solo de uma plantação de café, foram avaliados quanto à presença de *P. brasiliensis* e o fungo foi isolado de 3 desses animais (SILVA-VERGARA et al. 2000).

1.3.2 Primatas

Em 1977 Johnson e Lang relataram o único caso de PCM-doença em macaco *Saimiri sciureus* proveniente da Bolívia. O animal apresentava lesões no fígado e trato gastrointestinal, porém não foi possível o isolamento do fungo.

Macacos das espécies *Cebus apella* e *Callethrix jacchus* mantidos em cativeiro foram avaliados quanto à infecção por *P. brasiliensis*. Os autores obtiveram uma positividade de 22,4% dos 49 animais estudados (COSTA et al. 1995).

Corte e colaboradores (2007) realizaram estudo soroepidemiológico em 93 macacos das espécies *Cebus sp* e *Alouatta caraya*, capturados na Bacia do Rio Paraná, Paraná. Pelo teste de ELISA usando gp43 como antígeno os autores obtiveram uma positividade de 44,1% para a espécie *Cebus sp* e 60% para a *A. caraya*. A espécie *Cebus sp* apresentou uma positividade de 2,9% também para o teste de Imunodifusão em Gel.

1.3.3 Preguiça

Trejo-Chávez e colaboradores (2011) relataram o primeiro caso de PCM doença em uma Preguiça de Dois Dedos do Sul (*Choloepus didactylus*), no México. Células de leveduras de *P. brasiliensis* foram observadas por microscopia eletrônica em lesões granulomatosas disseminadas nos pulmões, fígado, baço e rim do animal.

1.3.4 Pinguim

Garcia e colaboradores (1993) apresentaram os resultados obtidos com a amostra de *Paracoccidioides* em um pinguim (*Pygoscelis adeliae*) da Antártida, isolada por Gezuele e colaboradores em 1989. Esse isolado foi caracterizado por meio de métodos micológicos e imunológicos. Os autores inocularam cobaias com a amostra pinguim por via intratesticular e observaram a formação de abscessos com reação granulomatosa nesses animais. O isolado também produziu gp43, que é o principal antígeno de *P. brasiliensis*, que foi

demonstrada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, imunodifusão e imunoeletroforese.

1.4 PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM ANIMAIS SINANTRÓPICOS.

1.4.1 Morcegos

Grose e Tamsitt (1965) capturaram 243 morcegos (*Artibeus lituratus*) na Colômbia, os autores semearam amostras de material fecal para análise e apenas 3 apresentaram infecção por *P. brasiliensis*.

Morcegos (*A. lituratus*) (n=24) foram inoculados via oral com preparado de isolado de *P. brasiliensis* de paciente com PCM mucocutânea. Os autores demonstraram a rápida passagem de material ingerido pelo trato digestório dos animais, que foram sacrificados 5-10 minutos após alimentação. Os autores observaram que, células leveduriformes nunca apareciam em grande número, e o fungo morria rapidamente (até 8 horas) no material fecal. Não foi possível o isolamento do fungo (GREER E BOLAÑOS, 1977).

1.4.2 Gambás

Gambás (*Didelphis albiventris*) capturados na região do triângulo mineiro, estado de Minas Gerais, foram eutanasiados e amostra de fígado, pulmão e baço foram semeados para tentativa de isolamento do fungo *P. brasiliensis*. Porém, não foi observado nenhum crescimento de colônia sugestiva de *P. brasiliensis*. (SILVA-VERGARA et al. 2001).

1.5 *Zenaida auriculata*

Figura 1 – Foto espécie pombo silvestre



A pomba silvestre *Z. auriculata* é uma espécie campestre de formas delgadas com cerca de 21 cm. Habitam o campo, cerrado, caatinga, campos de cultura e de pastoreio. Ocorre das Antilhas à Terra do Fogo, descontinuamente por todo o Brasil, inclusive a ilha Fernando de Noronha, onde é abundante (SICK, H. 1997).

A raça local *auriculata Noronha*, a “arribaça”, é a única a participar de migrações, esta cobre apenas o nordeste (Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia e Fernando de Noronha). Ocorrem outras raças no estuário do Amazonas (Marajó, Mexiana), no Oeste (Campos de Santarém, etc.) e no Brasil Meridional (da Bahia para o Sul) (SICK, H. 1997).

Alimenta-se geralmente de sementes de espécies silvestres e cultivadas e frutos, e é considerada importante dispersora de sementes, podendo dispersar plantas exóticas invasoras e prejudiciais aos seres humanos (RANVAUD, R. et al. 2001).

Nas regiões sul e sudeste do Brasil, *Z. auriculata* ocorre em vários habitats, inclusive em cidades, e aparentemente exploram diferentes tipos de recursos alimentares, tais como restos alimentares produzidos pelo homem, e alguns tipos de sementes de interesse econômico (ex. trigo, soja e milho) embora sua preferência seja por sementes de plantas silvestres (RANVAUD et al. 2001).

Em algumas cidades do Brasil, inclusive Londrina, o grande número de indivíduos tem causado preocupações às autoridades em função do potencial de transmissão de patógenos, tendo a espécie como vetor, além da possibilidade de

prejuízos para a lavoura e dos incômodos causados pelo acúmulo de dejetos destas aves nos locais de pouso (RANVAUD et al. 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a infecção da Pomba Silvestre *Zenaida auriculata* pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de anticorpos para gp43 de *P. brasiliensis* em pombas silvestres imunizadas com *P. brasiliensis*;

- Avaliar a presença de anticorpos para gp43 de *P. brasiliensis* em pombas silvestres *Z. auriculata* capturadas em duas regiões do município de Londrina;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O município de Londrina (Fig-2) está localizado na Região Norte do Estado do Paraná, Sul do Brasil e ocupa uma área de 1.659,629 km². Situado a 23°23'30" de latitude Sul e 51°11'30" a Oeste de Greenwich. O clima é classificado como subtropical úmido mesotérmico, verões quentes com tendência de concentração das chuvas, invernos com geadas pouco freqüentes, sem estação seca definida (Prefeitura de Londrina 2011).

A cooperativa Integrada (Fig-3B) localizada em Londrina produz sementes de soja, trigo e aveia, além de rações e concentrados para bovinos, aves, suínos, ovinos, eqüinos, peixes, coelhos e cães. Armazenam grãos em suas dependências (Integrada Cooperativa Agroindustrial).

O campus da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (Fig-3A), está localizada na região sudoeste de Londrina. A área total é de 2.226.013 m². A UEL possui uma grande variedade de espécies vegetais nativas e introduzidas que proporcionam alimento e abrigo para várias espécies de animais (SHIBATTA et al. 2009).

Figura. 2 – Mapa indicando a localização do município de Londrina, norte do estado do Paraná, região sul do Brasil.



3.2 AMOSTRAS

Foram capturados 113 pombos silvestres da espécie *Z. auriculata* em dois pontos distintos do município de Londrina entre 2010 e 2011 (Figura 3 – A e B). A distância entre os pontos era de 5Km.

Foram utilizadas armadilhas tipo arapuca com milho como isca para captura das aves. Autorizada a captura dos animais pelo IBAMA (16428-2). (Anexo 1)

Figura 3 – Mapa com os locais de captura das Pombas Silvestres. A- Universidade Estadual de Londrina. B- Cooperativa Integrada.



As aves foram capturadas e após foi realizada a coleta de sangue para obtenção do soro através da punção da veia braquial.

3.3 ANTÍGENOS DE *P. BRASILIENSIS*

3.3.1 Antígeno Celular

O isolado de *P. brasiliensis* B-339 foi cultivado em Ágar Sabouraud por 7 dias à 37°C e inativado com thimerozal 0,02% por 24h a 4°C. A contagem de

células foi realizada em câmara de Neubauer, e a concentração foi ajustada para 1×10^6 células/mL

3.3.2 Exoantígeno

O exoantígeno foi obtido do isolado de *P. brasiliensis* B-339. A cultura foi inoculada em um frasco erlenmeyer de meio BHI caldo. E incubado sob agitação a 50 rpm à 35°C por três dias. Esse pré-inóculo foi distribuído em três erlenmeyer de 500 ml com 100 ml de meio BHI-caldo cada, e novamente incubado sob agitação a 50 rpm à 35°C por 7 dias. Após adicionou-se Thimerozal 0,02% por 24h a 4°C para inativação do fungo, filtrou-se em papel filtro para posterior liofilização. Depois de liofilizada a amostra foi dialisada por 24 h a 4°C contra PBS (CAMARGO et al. 1988).

3.3.3 Gp43

O antígeno gp43 foi obtido a partir do exoantígeno, utilizando uma coluna cromatografia de afinidade, ligada com anticorpo monoclonal anti-gp43 (PUCCIA e TRAVASSOS, 1991). A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford, utilizando BSA como marcador (BRADFORD, 1976).

3.4 IMUNIZAÇÃO DOS POMBOS SILVESTRES

Foram imunizados dois pombos silvestres (*Z. auriculata*), com 1×10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis* 339 (três doses com intervalos de 7 dias, adjuvante incompleto de Freund). Os pombos receberam as inoculações no músculo peitoral em dois pontos. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 7, 14 e 21. As aves foram mantidas no Biotério do Hospital Universitário de Londrina-PR em gaiolas individuais com água e ração comercial *ad libitum*.

3.5 ELISA indireto:

As placas de poliestireno de 96 orifícios (Costar) foram sensibilizadas com 250 ng/poço de gp43 por 18h à 4°C. Após lavagem com PBS

tween 0,05% foi realizado o bloqueio com PBS-leite 5% por 1h. Toda a reação de ELISA foi desenvolvida à 25°C. Após o bloqueio, as placas foram lavadas e incubadas com as amostras de soro diluídas (1: 100) por 1h. Outra lavagem foi realizada antes da adição de conjugado anti-IgY peroxidase (1: 1000) por 1h e posteriormente à incubação. O substrato utilizado foi TMBZ/ H₂O₂, o qual foi mantido por 15 minutos antes do bloqueio da reação com H₂SO₄ 1N. As absorvâncias foram determinadas a 450 nm em leitora de microplacas.

Para o controle negativo não foi usado nenhum soro, apenas o conjugado e substrato.

As amostras que apresentaram absorvância superior a duas vezes a do controle (pombas imunizadas) foram consideradas positivas.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

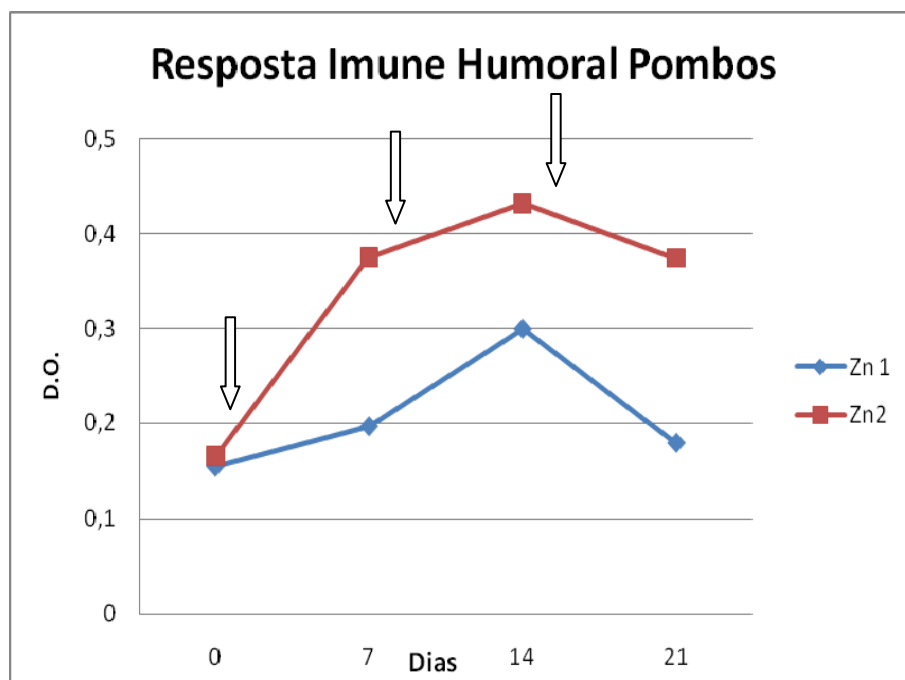
Para verificar a significância estatística das porcentagens obtidas ao teste de ELISA quanto as duas populações de pombos estudadas, utilizou-se o teste de qui-quadrado corrigido de Yates e o pacote estatístico EPI6 (CDC-Atlanta), com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE POMBAS (*Z. AURICULATA*) IMUNIZADAS COM *P. BRASILIENSIS*.

Os dois animais imunizados com *P. brasiliensis* produziram anticorpos IgY para gp43 (Figura 3). Esse resultado indica que a pomba silvestre *Zenaida auriculata* produz anticorpos para gp43 após contato com *P. brasiliensis*.

Figura 4 – Resposta imune humoral em duas pombas imunizadas com *Paracoccidioides brasiliensis*. As setas representam cada dose de imunização (dias 0, 7 e 14), as coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 7, 14 e 21.



A resposta imune humoral apresentou-se baixa quando comparadas com outros estudos realizados em outras espécies de animais. Bovinos imunizados com *P. brasiliensis* produziram IgG para gp43 e mantiveram altos níveis de anticorpos até 88 dias após terceira dose do antígeno (SILVEIRA et al. 2008). Estudos com galinhas imunizadas com *P. brasiliensis* também produziram anticorpos para gp43 e apresentaram resposta alta após a terceira dose do antígeno (OLIVEIRA et al. 2010).

A baixa resposta apresentada pelas pombas *Z. auriculata* imunizadas pode ser explicada pelo estresse causado pela captura e cativeiro, por serem animais de vida livre. A Manipulação, as variações de temperatura, as mudanças na hierarquia social, o medo e o barulho podem induzir estresse nos animais (CARRASCO et al. 2004). Se o estresse envolve traumatismo tecidual ou invasão por microrganismos, níveis de cortisol altos eventualmente agem para refrear as respostas iniciais inflamatórias e imunológicas de forma que essas respostas não se transformem em danos irreparáveis (BERNE e LEVY, 2006).

Apesar dos benefícios da secreção de corticosterona aguda em situações de emergência, os níveis cronicamente elevados podem ter consequências negativas. O estresse causa o aumento de corticosterona que causa comprometimento do sistema imunológico (WINGFIELD, 1994).

4.2 ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM POMBAS SILVESTRES (*Z. AURICULATA*).

Esse é o primeiro estudo soroepidemiológico de PCM realizado com pombas silvestres (*Z. auriculata*).

Estudos sobre a infecção em diferentes espécies de animais domésticos e silvestres por *P. brasiliensis* tem sido realizados para se conhecer mais sobre a eco-epidemiologia da PCM. Devido à alta temperatura corporal de aproximadamente 40°C, as aves provavelmente não desenvolvem a PCM doença, e atuam apenas como dispersoras ativas do fungo (CONTI-DIAZ, 1989).

Foram estudadas duas populações de pombas silvestres *Z. auriculata*, uma capturada no campus da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e a outra capturada na Cooperativa Integrada, distante 5Km do primeiro local, ambas no município de Londrina-PR.

A análise das 113 (100%) amostras de soros de pombas por teste de ELISA usando gp43 como antígeno mostrou uma diferença significativa ($p=0,0001$) na positividade em pombas capturadas no campus da UEL (83,7%) e em pombas capturas na Cooperativa Integrada (11%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise de 113 amostras de soro de pombas silvestres *Z. auriculata* por ELISA indireto usando gp43 como antígeno. Londrina, 2010/2011.

	Positivos n (%)	Negativos n (%)	Total n (%)
Campus UEL	36 (83,7)	7 (16,3)	43 (100)
Cooperativa Integrada	8 (11,4)	62 (88,6)	70 (100)
Total	44 (38,9)	69 (61,1)	113 (100)

valor de $p=0,0001$

A diferença dos resultados entre as duas populações pode ocorrer devido o hábito dessas pombas de permanecerem no mesmo local, não migrando para outros pontos da cidade. Segundo Sick (1997) a raça local *Zenaida auriculata noronha*, presente apenas no nordeste são as únicas a participar em migrações.

A diferença da alimentação entre as populações pode ser outro fator, já que, as pombas capturadas na cooperativa possuem uma facilidade maior para se alimentar pela abundância de grãos caídos ao chão, e as do campus da UEL precisam ciscar a procura de alimento. No conteúdo estomacal das pombas capturadas na cooperativa integrada foram encontrados muitos grãos, enquanto que nas pombas capturadas no campus da UEL foram encontrados pequenos insetos, grãos e folhas. Oliveira e colaboradores (2010) mostraram a diferença entre galinhas de granja e de vida livre do estado do Paraná, e observou que as galinhas de granja que não entram em contato com o solo não apresentaram positividade para o *P. brasiliensis*, enquanto que as galinhas de vida livre que ciscavam em busca de alimento apresentaram positividade de 16%.

O ELISA com gp43 é usado para estudos soropidemiológico porque é mais sensível que o teste de imunodifusão (SILVEIRA, L.H. 2008). O uso de gp43, antígeno purificado de *P. brasiliensis*, é vantajoso devido à menor probabilidade de reação cruzada.

Outros estudos soropidemiológicos com animais testados com ELISA e usando gp43 como antígeno apresentaram alta positividade. Em estudo realizado por Ono e colaboradores (2001) amostras de soros de cães da Região Norte do Paraná foram testado pelo método de ELISA com gp43 como antígeno, e observaram uma positividade de 89,5% em cães de áreas rurais. Foram testados 836 soros de cães do Mato Grosso do Sul em ensaio de ELISA com gp43 e

observaram uma alta positividade de 79,9% em animais soropositivos para leishmaniose (SILVEIRA et al. 2006). Em bovinos do Mato Grosso do Sul, o mesmo autor (2008) obteve uma positividade baixa, 17,5%, utilizando-se o mesmo teste de ELISA.

Acredita-se que os cães por possuírem o hábito de farejar e escavar o solo estejam mais expostos a infecção pelo fungo *P. brasiliensis*, as pombas *Z. auriculata* por possuírem o hábito de se alimentarem de sementes caídas ao solo também estariam expostas a infecção.

Oliveira e colaboradores (2010) obtiveram uma alta positividade em um estudo com galinhas do estado de Mato Grosso do Sul (55%), usando o método de ELISA com gp43, quando comparadas com galinhas do estado do Paraná (16%).

Estudos epidemiológicos de diferentes espécies animais com diferentes habitats e hábitos são importantes para revelar as prováveis fontes de infecção e vias de transmissão do *P. brasiliensis*, contribuindo para elucidar os elos da cadeia de transmissão deste agente etiológico.

5 CONCLUSÃO

A positividade para infecção de pombas silvestres *Z. Auriculata* por *P. brasiliensis* observada neste estudo sugere que esses animais infectam-se facilmente com fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e, portanto poderiam ser utilizados como animais sentinela da paracoccidioidomicose.

REFERÊNCIAS

- ALBORNOZ, M.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela, Sabouraudia, Oxfordshire, Inglaterra, 9: 248-253, 1971.
- BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K.I.; et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus Novemcinctus*) captured in na área of paracoccidioidomycosis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 58: 505-512, 1998.
- BERNE E LEVY. Fundamentos de Fisiologia. Matthew N. Levy; Bruce a. Station; Bruce, m. Koeppen [editores]. Rio de Janeiro. ed. Elsevier, 4 edição, 2006.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254, 1976.
- CAMARGO, Z.P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S.P.; TRAVASSO, L.R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion test. J. Clin. Microbiol. 26: 2147-51, 1988.
- CARRASCO, A.O.T.; CAPUA, M.L.B.; NAKAGE, A.P.M.; SEKI, M.C.; SANTANA, A.E.; PINTO, A.A. Influência do estresse no leucograma de Pombos (*Columba livia*) de vida livre. Anais do VIII congresso e XIII encontro da ABRAVAS, Jaboticabal, 2004.
- CONTI-DIAZ, I.A.; AVAREX, B.J.; GEZUELE, E. Et al. Encuesta mediante intradermoreacciones com paracoccidioidina y histoplasmina em caballos. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 14: 372-376. 1972.
- CONTI-DIAZ, I.A.; RILLA, F.D. Hipótesis sobre El nicho ecológico de *Paracoccidioides brasiliensis*. Ver. Med. Uruguay. 5:97-103. 1989.
- CORREDOR, G.G.; CASTAÑO, J.H.; PERALTA, L..A. Et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillos *Dasypus novemcinctus* in an dendemic area for Paracoccidioidomycosis in Colombia. Rev. Iberoam Micol, 16: 216-220, 1999.
- CORREDOR, G.G.; PERALTA, L.A.; CASTANO, J.H.; ZULUAGA, J.S.; HENAO, B.; ARANGO, M.; TABARES, A.M.; MATUTE, D.R.; McEWEN, J.G.; RESTREPO, A. The naked tailed armadillo *cabassous centralis* (Miller 1899): A new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. Medical Mycology, Oxford. 43: 275-280, 2005.
- CORTE, A.C.; ITANO, E.N.; ONO, M.A.; CAMARGO, Z.P. Paracoccidioidomycosis-infection in horses in the North Paraná State, Brazil. IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis. Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 47(14), 2005.
- CORTE, A.C.; SVOBODA, W.K.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; MALANSKI, L.S.; SHIOZAWA, M.M.; LUDWING, G.; AGUIAR, L.M.; PASSOS, F.C.; MARON, ^a CAMARGO, Z.P.; ITANO, E.N.; ONO, M.A. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. Mycopathologia, 64: 225-8, 2007.

COSTA, E.O.; NETTO, C.F.; RODRIGUES, A.; BRITO, T. Bovine experimental paracoccidioidomycosis intradermic test standardization. *Sabouraudia*, 16: 103-113, 1978.

COSTA, E.O.; DINIZ, L.S.; FAVA-NETTO, C.; ARRUDA, C.; DAGLI, M.L. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. *J. Med. Vet. Mycol.*, 33: 39-42, 1995.

COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública*, 18:1441-1454, 2002.

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

FARIAS, M.R.; WERNER, J.; MURO, M. et al. Canine paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. *Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 47(14), 2005.

FRANCO, M. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification on its clinical forms. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, 20: 129-133, 1987.

GARCIA, N.M.; DEL NEGRO, G.M.B.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T.; ASSIS, C.M.; LACAZ, C.S. *Paracoccidioides brasiliensis*: a new strain isolated from a fecal matter of a penguin, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v.35, p.227-35, 1993.

GEZUELE, E. Aislamento de *Paracoccidioides brasiliensis* de heces de pinguino de la Antártida: IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis, Caracas. Venezuela: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), 1989.

GONZALES, J.F.; MONTIEL, N.A.; MAASS, R.L. First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2010.

GREER, D.L.; BOLAÑOS, B. Role of Bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. *Sabouraudia*, Oxfordshire. 15: 273-283, 1977.

GROSE, E.; TAMSITT, J.R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovers from intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, As. *Sabouraudia*, 4: 124-125, 1965.

GUTIERREZ, A.H.; CEBALLOS, G.; FERRER, H.I.; RANGEL, O. Encuesta sobre tuberculosis, histoplasmosis y paracoccidioidomycosis em ganado lechero Del Valle Del aburra. *Antioquia Medica*, 24: 339-358, 1974.

INTEGRADA COOPERATIVA AGROINDUSTRIAL. <<http://www.integrada.coop.br/>> acesso em 18/06/2011.

JOHNSON, W.D.; LANG, C.M. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*). Vet. Pathol., 14: 368-371, 1977.

LACAZ, C. *Paracoccidioides brasiliensis*: Morphology, Evolutionary Cycle; Maintenance during Saprophytic Life; Biology Virulence Taxonomy In: Franco, M; Lacaz, C.; Restrepo, A.; Del Negro, G. (Eds), Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Ratón, 1-11, 1994.

LONDERO, A. T.; MELO, I. S. Paracoccidioidomycosis in childhood. Acretical review. Mycopathologia, 82: 49-55, 1983.

LUTZ, A. Uma micose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hypho-blastomycoses americanas. Bras.Med., 22:141-44, 1908.

MACEDO, R.C.L. Infecção natural de tatus por *Paracoccidioides brasiliensis* em Serra da Mesa, Goiás: Estudo preliminar. II Congresso Brasileiro de Micologia. Rio de Janeiro, Brasil, p. 192, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Vigilância em Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso** - 5ª edição amp,- Brasília: Ministério da Saúde, p.233-235, 2005.

MÓS, E. N.; FAVA-NETTO, C. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. Possível papel epidemiológico dos cães. Estudo sorológico e anátomo-patológico. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 16: 154-159, 1974.

NAIFF, R.D.; FERREIRA, L.C.L.; BARRET, T.V.; NAIF, M.F.; ARIAS, J.R. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasylops novemcinctus*) no estado do Pará. Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 28: 19-27, 1986.

NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente em El suelo argentino. Prensa Med. Argent., 53: 2831-2832, 1966.

NEVES, S.L.; PETRONI, T.F.; FEDATTO, P.F.; ONO, M.A. Paracoccidioidomicose em animais silvestres e domésticos. Semina: Ciências Agrárias. Londrina. 27(3): 481-488, 2006.

OLIVEIRA, G.G.; SILVEIRA, L.H.; ITANO, E.N. Et al. Serological Evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná an Mato Grosso do Sul States, Brazil. Mycopathologia, 2010.

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.F.R.L.; CAMARGO, Z.P. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. *Med. Mycol.*, 41: 265-268, 2003.
- PEREIRA, M.; VIANNA, G. A propósito de um caso de blastomicose (*Pyohemia blastomycotica*), *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, 1: 65-83, 1911.
- PORTAL PREFEITURA DE LONDRINA. <[Http://www1.londrina.pr.gov.br](http://www1.londrina.pr.gov.br)>. Acesso em 01/06/2011.
- PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R. The 43 Kda glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: Excretion and susceptibility to proteolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 289: 298-302, 1991.
- RANVAUD, R.; FREITAS, K.C.; BUCHER, E.H.; DIAS, H.S.; AVANZO, V.C.; ALBERTS, C.C. Diet of eared doves (*Zenaida auriculata*, AVES, columbidae) in a sugar-cane colony in south-eastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology.* 61(4): 651-660, 2001.
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* : a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*, 23:323-334, 1985.
- RICCI, G.; MOTA, F.T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R.C.; BORRA, R.C.; FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.*, 42: 379-383, 2004.
- SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis* : virulence and host response. In R.L. Ahlar and R.A. Calderone (Eds), *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*, Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y. 205-266, 2001.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Ed Nova Fronteira. Rio de Janeiro. p. 346-7, 1997.
- SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; LEITE MAFFEI, C.M. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. *Med. Mycol.*, 36: 37-42, 1998.
- SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z.P.; MALTA, M.H.B. 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.*, 38: 193-199, 2000.
- SILVA-VERGARA, M.L. MARTINEZ, R.; MALTA, M.E.B.; RAMIREZ, L.E.; FRANCO, L.A. The marsupial *Didelphis albiventris* is an improbable host of *Paracoccidioides brasiliensis* in na endemic area of paracoccidioidomycosis in Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 96: 771-772, 2001.
- SILVEIRA, L.H.; DOMINGOS, I.H.; KOUCH, K. Et al. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmanioses. *Mycopathologia*, 162: 325-329, 2006.

SILVEIRA, L.H.; PAES, R.C.S.; MEDEIROS, E.V.; ITANO, E.N.; CAMARGO, Z.P.; ONO, M.A. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mycopathologia*, 165: 367-371, 2008.

SHIBATTA, O.A.; GALVES, W.; CARMO, W.P.D.; LIMA, I.P.; LOPES, E.V.; MACHADO, R.A. A fauna de vertebrados do campus da Universidade estadual de Londrina, região norte do estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 30 (1): 3-26, 2009.

SOUZA, M. C.; GESZETESI, J.L.; SOUZA, A.R.; MORAES, J.Z.; LOPES, J. D.; CAMARGO, Z. P. Differences in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp43 isoforms. *J. Med.Vet. Mycol.*, 35: 13-18, 1997.

TREJO-CHÁVEZ, A.; ROMERO, R.R.; RODRÍGUEZ, J.A.; GARZA, A.M.N.; TOVAR, L.E.R. Disseminated Paracoccidioidomycosis in a Southern Two-Toed Sloth (*Choloepus didactylus*). *Journal of Comparative Pathology*. v.114(23) : 231-234, 2011.

WINGFIELD, J.C.; DEVICHE, P.; SHARBAUGH, S.; ASTHEIMER, L.B.; HOLBERTON, R. SUYDAM, R.; HUNT, K. Seasonal changes of the adrenocortical responses to stress in redpolls, *Acanthis flammea*, in Alaska. *Journal of Experimental Zoology*. v.270(4): 372-380, 1994.

ANEXO



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16428-2	Data da Emissão: 19/02/2010 09:10
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: João Luis garcia	CPF: 605.644.319-15
Título do Projeto: Caracterização genética de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de Pombas (<i>Zenaida auriculata</i>) do município de Londrina, Paraná.	
Nome da Instituição : Universidade Estadual de Londrina	CNPJ: 78.640.489/0001-53

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Colheita de amostras	01/2010	06/2011
2	Sorologia MAT (Pombas)	01/2010	06/2011
3	Bioensaio em camundongos	01/2010	08/2011
4	Caracterização Biológica e Molecular das amostras isoladas	04/2010	11/2011
5	Tabulação dos dados	12/2011	12/2011

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	LONDRINA	PR	Universidade Estadual de Londrina	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Zenaida auriculata
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Zenaida auriculata
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Zenaida auriculata (*Qtde: 384)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Fezes, Ectoparasita, Sangue, Fragmento de tecido/órgão
2	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta (Arapucas-Armadas Isca)

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 89624525





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16428-2	Data da Emissão: 19/02/2010 09:10
------------------------	--

Dados do titular

Nome: João Luis garcia	CPF: 605.644.319-15
Título do Projeto: Caracterização genética de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de Pombas (<i>Zenaida auriculata</i>) do município de Londrina, Paraná.	
Nome da Instituição : Universidade Estadual de Londrina	CNPJ: 78.640.489/0001-53

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Estadual de Londrina	Pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 89624525



