



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FLÁVIA RAQUEL BENDER

**NÍVEL DE INFECÇÃO E RESPOSTA IMUNE HUMORAL  
CONTRA *Arthrographis kalrae* E EFEITO DA INFECÇÃO  
CONCOMITANTE COM *Paracoccidioides brasiliensis* EM  
CAMUNDONGO C57BL/6**

FLÁVIA RAQUEL BENDER

**NÍVEL DE INFECÇÃO E RESPOSTA IMUNE HUMORAL  
CONTRA *Arthrographis kalrae* E EFEITO DA INFECÇÃO  
CONCOMITANTE COM *Paracoccidioides brasiliensis* EM  
CAMUNDONGO C57BL/6**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Eiko Nakagawa Itano

Londrina  
2017

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

Bender, Flávia Raquel.

Nível de infecção e resposta imune humoral contra *Arthrographis kalrae* e efeito da infecção concomitante com *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongo C57BL/6 / Flávia Raquel Bender. - Londrina, 2017.  
31 f. : il.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. Fungo - Tese. 2. Micose - Tese. 3. Resposta imune - Tese. 4. Urina - Tese. I. Itano, Eiko Nakagawa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

FLÁVIA RAQUEL BENDER

**NÍVEL DE INFECÇÃO E RESPOSTA IMUNE HUMORAL  
CONTRA *Arthrographis kalrae* E EFEITO DA INFECÇÃO  
CONCOMITANTE COM *Paracoccidioides brasiliensis* EM  
CAMUNDONGO C57BL/6**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de mestre em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Eiko Nakagawa Itano  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Elisa Yoko Hirooka  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Márcio Augusto Ono  
Universidade Estadual de Campinas - Unicamp

Londrina, 26 de maio de 2017.

*Dedico,*

*A minha mãe que sempre acreditou em mim, nunca mediu esforços para me ajudar.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Em primeiro lugar sou eternamente grata à Deus que me fez capaz de trilhar esse caminho com sabedoria. Agradeço a dedicação da minha orientadora Eiko Nakagawa Itano, que abriu as portas do seu laboratório, acreditou e confiou em mim, destinou seu tempo para me orientar. Sou grata a Dra. Angélica T. Ishikawa por aceitar ser banca de qualificação junto com a Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka que participou também da minha banca de defesa e o Prof. Dr. Márcio Augusto Ono por participar da banca de defesa. Tenho muito a agradecer aos colegas de trabalho Bianca D. de O. Souza, Angélica T. Ishikawa, Adriane L. Vidal, Franciele A. S. Chiyoda, Gabriele I. Oliveira, Janeth E. Arcos e Nilson de Jesus que me ajudaram na realização deste experimento. Sou grata também a todos os colegas do laboratório, grandes pessoas que de alguma forma fizeram parte do meu trabalho, me ajudaram não só no laboratório, mas também na vida. Quero agradecer ao Pedro S. R. Dionizio Filho técnico da Patologia pela grande ajuda e paciência para me ensinar. Agradeço a Universidade Estadual de Londrina (UEL), ao Centro de Ciências Biológicas (CCB), ao departamento de Microbiologia pela oportunidade de ingressar no Mestrado, a coordenação do programa de pós-graduação e a coordenadora Profa. Dra. Sueli F. Y. Ogatta. A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro, ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido a esta pesquisa.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado me amparado, em especial a minha linda mãezinha, a mulher mais virtuosa e batalhadora que eu conheço, fazendo muitas vezes, mais do que estava ao seu alcance, me ensinando com atitudes os verdadeiros valores da vida. Meu pai, minhas irmãs, meu irmão, cunhado, sobrinhas e sobrinhos, a família é grande, unida e abençoada. Sou grata ao meu namorado, sempre compreensivo e paciente, obrigada por fazer parte da minha vida. Sempre esforçado, preocupado e disposto a me ajudar, me fazer sorrir, tornando meus dias mais leves. As minhas amigas, meus sinceros agradecimentos por não deixarem nossa amizade se perder na correria do dia a dia, tenho saudade das amigas que moram longe e das amigas que moram perto, mas a falta de tempo nos impede de passarmos mais horas juntas. Agradeço os incentivos dos meus mestres, Profa. Dra. Edna Tereza de Lima e Prof. Dr. Nelson de Mello Fernandes, meus orientadores da graduação que me caminharam comigo e me ensinaram a caminhar sozinha. Sou grata a vida pelas oportunidades.*

BENDER, Flávia Raquel. **Nível de infecção e resposta imune humoral contra *Arthrographis kalrae* e efeito da infecção concomitante com *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongo C57BL/6**. 2017. 30 f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

*Arthrographis kalrae* é um fungo dimórfico, patógeno humano oportunista. Os modelos experimentais em camundongos Swiss e BALBc infectados pelo fungo *A. kalrae* tem demonstrado lesões em diversos órgãos (rins, fígado, pulmões, baço, cérebro) e efeito neurológico com alteração de comportamento. Neste trabalho foi proposto analisar alteração comportamental, grau de infecção e resposta imune humoral em camundongos C57BL/6, infectados com *A. kalrae*, bem como avaliar o efeito da infecção concomitante de *A. kalrae* com o fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*. Trinta e seis camundongos C57BL/6, machos, foram divididos em seis grupos (n=6). Cada Grupo recebeu 100µL de PBS contendo ou não fungo por via endovenosa: Grupo 1 (controle) PBS estéril, Grupo 2 *P. brasiliensis* ( $1 \times 10^6$ ), Grupo 3 *A. kalrae* ( $1 \times 10^6$ ), Grupo 4 *A. kalrae* ( $1 \times 10^7$ ), Grupo 5 *A. kalrae* ( $1 \times 10^6$ ) e *P. brasiliensis* ( $1 \times 10^6$ ) e Grupo 6 *A. kalrae* ( $1 \times 10^7$ ) e *P. brasiliensis*, ( $1 \times 10^6$ ). Após 21 dias, foi determinado o grau de infecção por Unidade Formadora de Colônia (UFC) em amostras de homogeneizado de órgãos (baço, cérebro, coração, fígado, pulmão, rim) e adicionalmente de algumas amostras de urinas. Parte das amostras de órgãos foram utilizadas para o exame histológico. Para avaliação da resposta humoral foi determinado o nível sérico de IgG anti-*A. kalrae* utilizando Elisa. Os resultados obtidos demonstraram UFC positiva para baço, cérebro, coração, fígado, pulmão e rim, porém sem diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Duas amostras de urina demonstraram positividade em UFC, apresentando características morfológicas de *A. kalrae*. Nenhum camundongo infectado com *A. kalrae* demonstrou alteração comportamental. A histologia comprovou a presença de *A. kalrae* e *A. kalrae* + *P. brasiliensis* nos órgãos de camundongos mono e com infecção associada, respectivamente. Elisa resultou em nível significativamente elevado de IgG anti-*A. kalrae* no grupo infectado com *A. kalrae*  $1 \times 10^7$  em relação ao  $1 \times 10^6$  ( $p < 0,05$ ) porém sem diferença significativa em relação aos grupos concomitantemente infectados ( $p > 0,05$ ). Em conclusão, camundongo da linhagem C57BL/6 é susceptível à infecção sistêmica com *A. kalrae*; porém resistente quanto à alteração comportamental. A resposta imune humoral anti-*A. kalrae* em camundongos C57BL/6 é dependente da concentração de *A. kalrae* inoculado, mas não é influenciado pela infecção concomitante com *P. brasiliensis*. Este trabalho demonstra pela primeira vez a presença de *A. kalrae* em urina de camundongo infectado, evidenciando a possibilidade de ocorrer eliminação do referido fungo via urinária.

**Palavras-chave:** Fungo. Micose. Resposta imune. Urina.



BENDER, Flávia Raquel. **Level of infection and humoral immune response against *Arthrographis kalrae* and the effect of coinfection with *Paracoccidioides brasiliensis* in C57BL/6 mice.** 2017. 30 pages. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – State University of Londrina. Londrina, PR, Brazil..

## ABSTRACT

*Arthrographis kalrae* is a dimorphic fungus and an opportunistic human pathogen. The experimental models of infection with *A. kalrae* of Swiss and BALBc mice have demonstrated lesion in many organs (kidneys, liver, lungs, spleen and brain) and neurologic effect with behavior changes. Current research aimed to analyze behavior changes, level of infection and the humoral immune response of C57BL/6 mice, infected with *A. kalrae*, and also to evaluate the effect of coinfection of *A. kalrae* and the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Thirty-six C57BL/6 male mice were divided in six groups (n=6). Each group received, endovenously, 100 µL of PBS, with or without the fungi: Group 1 (control) sterile PBS; Group 2 *P. brasiliensis* ( $1 \times 10^6$ ), Group 3 *A. kalrae* ( $1 \times 10^6$ ); Group 4 *A. kalrae* ( $1 \times 10^7$ ); Group 5 *A. kalrae* ( $1 \times 10^6$ ); and *P. brasiliensis* ( $1 \times 10^6$ ); Group 6 *A. kalrae* ( $1 \times 10^7$ ) and *P. brasiliensis*, ( $1 \times 10^6$ ). After 21 days, the level of infection was evaluated by Colony Forming Units (CFU) of homogenates of organs (spleen, brain, heart, liver, lung, kidney) and additionally of some urine samples. Samples of the organs were histologically examined. The evaluation of humoral response was by the serum level of IgG anti-*A. kalrae* by ELISA. There were positive UFC in spleen, brain, heart, liver, lung and kidney, though without significant difference between groups ( $p > 0.05$ ). Two urine samples had positive UFC, with morphological characteristics of *A. kalrae*. No mouse infected with *A. kalrae* presented behavior changes. Histology confirmed the presence of *A. kalrae* and *A. kalrae* + *P. brasiliensis* in the organs of mice mono and coinfecting, respectively. ELISA resulted in a significantly higher level of IgG anti-*A. kalrae* in the group infected with *A. kalrae*  $1 \times 10^7$  in comparison to  $1 \times 10^6$  ( $p < 0.05$ ), but without difference to the coinfecting groups ( $p > 0.05$ ). In conclusion, the C57BL/6 mouse is susceptible to the systemic infection with *A. kalrae*; notwithstanding, it is resistant to the behavior changes. The humoral immune response anti-*A. kalrae* in C57BL/6 mice depends on the concentration of the inoculated *A. kalrae*, but it is not affected by the coinfection with *P. brasiliensis*. Current research demonstrates, for the first time, the presence of *A. kalrae* in the urine of infected mice, which indicates the possible elimination of the fungus through the urinary tract.

**Keywords:** Fungus. Mycosis. Immune response. Urine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Contagem de UFC (expresso em  $\text{Log}_{10}$ ) de *A. kalrae* em órgãos de camundongos C57BL/6 infectados com *A. kalrae*  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$ .....20
- Figura 2** – Contagem de UFC (expresso em  $\text{Log}_{10}$ ) de *A. kalrae* em órgãos de camundongos C57BL/6 infectados com *A. kalrae*  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  concomitantemente ou não com *P. brasiliensis*  $1 \times 10^6$  .....21
- Figura 3** – Exame direto da cultura de *A. kalrae* de animal com infecção  $10^7$  ..... 22
- Figura 4** – Níveis de IgG anti CFA de *A. kalrae* dos grupos controle e infectado com *A. kalrae* ( $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$ ) analisados por teste de ELISA.....23
- Figura 5** – IgG anti-*A. kalrae* por teste de ELISA do Grupos Controle e infectado com *A. kalrae* ( $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$ ) concomitante ou não com *P. brasiliensis* ( $1 \times 10^6$ )..... 24
- Figura 6** – Laminas de corte histológico do rim do Grupo 2, 4 e 5, coradas com coloração de Grocott e analisadas em aumento de 1000x.....25

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetro
Ak	<i>Arthrographis kalrae</i>
CEUA-UDEL	Comissão de Ética no Uso de Animais – Universidade Estadual de Londrina
CFA	Antígeno livre de células ( <i>Cell Free Antigen</i> )
D.O.	Densidade ótica
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
ELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
IgG	Imunoglobulina G
OPD	Orto-fenilenediamina ( <i>Ortho-Phenylenediamine</i> )
M	Molar
min	Minuto(s)
mL	Mililitros
mM	Milimolar
PBS	Tampão salino fosfato ( <i>phosphate buffered saline</i> )
nm	Nanômetros
PCM	Paracoccidiodomicose ( <i>Paracoccidiodomycosis</i> )
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil ( <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> ).
UFC	Unidade Formadora de Colônia
U.S.A.	United States of America
UV-Vis	Ultra violeta – Visível
x g	Força gravitacional

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	OBJETIVO GERAL .....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
3.1	MICRO-ORGANISMO .....	14
3.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	14
3.2.1	Processamento de amostras biológicas .....	15
3.3	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS (UFC) .....	15
3.4	ANTÍGENOS LIVRES DE CÉLULAS (CFA) DE <i>A. KALRAE</i> .....	16
3.5	ELISA PARA IGG ANTI-CFA DE <i>A. KALRAE</i> .....	16
3.6	HISTOLOGIA .....	17
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	17
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	19
4.1	SOBREVIVÊNCIA E SÍNDROME NEUROLÓGICA .....	19
4.2	GRAU DE INFECÇÃO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 .....	19
4.2.1	UFC em camundongos infectados com <i>A. kalrae</i> .....	19
4.2.2	UFC em camundongos infectados concomitantemente com <i>A. kalrae</i> e <i>P. brasiliensis</i> .....	20
4.3	UFC DE AMOSTRAS DE URINA .....	22
4.4	NÍVEL DE IGG ANTI- <i>A. KALRAE</i> E EFEITO DA INFECÇÃO CONCOMITANTE DE <i>A.</i> <i>KALRAE</i> E <i>P. BRASILIENSIS</i> .....	22
4.4.1	Níveis séricos de IgG anti-CFA de <i>A. kalrae</i> em camundongos C57BL/6 infectados com <i>A. kalrae</i> . .....	22
4.4.2	Efeito da infecção no nível de IgG anti-CFA de <i>A. kalrae</i> em camundongos infectados concomitantemente com <i>A. kalrae</i> e <i>P.</i> <i>brasiliensis</i> .....	23
4.5	HISTOLOGIA .....	24
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	28
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29

## 1. INTRODUÇÃO

*Arthrographis kalrae* é um fungo dimórfico, patógeno humano oportunista, pertencente ao filo Ascomycota, um ascomiceto do gênero *Arthrographis* composto por cinco espécies: *A. kalrae*, *A. cuboidea*, *A. lignicola*, *A. pinicola* e *A. alba* (PICHON et al., 2008; VOS et al., 2012; SAINAGHI et al., 2015).

*Arthrographis kalrae* era denominado *Oidiiodendron kalrai*, em 1968, Tewari e Macpherson, demonstraram que *Oidiiodendron kalrai* (taxonomia anterior) poderia causar doenças invasivas em múltiplos órgãos, a exemplo de cérebro em animais pós-infecção.

Os relatos de casos distintos de *A. kalrae* em humanos imunocompetentes e imunodeprimidos, variam desde fotofobia grave (PERLMAN; BINNS, 1997), a eumicetoma de mão (DEGAVRE et al., 1997). Chin-Hong et al. (2001) e Xi et al. (2004) descreveram casos de sinusite e Pichon et al., (2008) relataram um paciente com vasculite cerebral.

Vários casos de infecções por *A. kalrae* tem sido descrito na última década, tanto em homens como em mulheres, como: endocardite (CANDELA et al., 2010); úlcera de córnea (THOMAS et al., 2011); infecção pulmonar (VOS et al., 2012); infecção de uma lesão no joelho (BOAN et al., 2012); ceratomicose (RAMLI et al., 2013); onicomicose (SUGIURA; HIRONAGA, 2010); artrite séptica (SAINAGHI et al., 2015); micetoma e artrite micótica (ONG et al., 2015).

O fungo *A. kalrae* tem sido encontrado no solo, podendo penetrar no corpo humano através do trato respiratório ou contato direto com ferimento, espalhando-se sistemicamente de uma maneira agressiva (BISER et al., 2004; PICHON et al., 2008; SUGIURA e HIRONAGA, 2010; SAINAGHI et al., 2015). Devido ao escasso estudo, o diagnóstico e tratamento de infecções por *A. kalrae* são frequentemente atrasados ou até errôneos (NAGASHIMA et al., 2014).

Morfologicamente, *A. kalrae* é reconhecido por uma taxa de crescimento lenta (PICHON et al., 2008). Estudo em ágar Sabouraud dextrose revelou que, o crescimento do fungo pode ocorrer em temperatura entre 25 e 42 °C, após 5 dias de incubação a 37 °C a colônia de cor creme torna-se aveludada pela formação de hifa, desenvolvendo uma coloração amarela pálida, com hifa septada. (CHIN-HONG et al., 2001; SUGIURA e HIRONAGA, 2010; RAMLI et al., 2013; SAINAGHI et al., 2015).

Outro fungo termo-dimórfico pertencente ao filo Ascomycota, também presente no solo é o *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica de elevada ocorrência na América Latina, como Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina (MACHADO et al., 2013; TRISTÃO et al., 2013b).

Estudos apontam que, propágulos infecciosos (micélios e/ou conídios) presente no ambiente podem ser inalados pelo hospedeiro, se instalando nos alvéolos pulmonares onde são convertidos para a forma de levedura (MACHADO et al., 2013).

Ambos os fungos ocorrem na natureza, sendo *P. brasiliensis* detectado na América Latina, enquanto que *A. kalrae* apresenta distribuição mundial, encontrado em países como Austrália, China, Espanha, Estados Unidos, França, Itália e Japão. Um dos países onde este fungo já foi descrito é o México (DENIS et al., 2016), onde encontra-se o agente da PCM.

Os modelos experimentais de micose sistêmica causada por *A. kalrae* têm sido estudados em camundongos Swiss e BALBc. Como inexistem estudos de *A. kalrae* em camundongo C57/BL/6, neste trabalho é proposto analisar o grau de infecção e resposta imune humoral em camundongo C57BL/6, infectado com *A. kalrae*, bem como avaliar o efeito da infecção concomitante de *A. kalrae* com *P. brasiliensis*. Considerando a inexistência de dados sobre casos de infecções concomitantes entre *P. brasiliensis* e *A. kalrae*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de infecção e resposta imune humoral em camundongos C57BL/6 infectados com *A. kalrae* bem como avaliar o efeito da infecção concomitante com *A. kalrae* e *P. brasiliensis*.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar a alteração comportamental em camundongos C57BL/6 infectados com *A. kalrae*.

Avaliar o grau de infecção em camundongos C57BL/6 infectados com *A. kalrae*

Determinar os níveis de IgG anti-CFA de *A. kalrae* em camundongos C57BL/6 infectados com *A. kalrae*.

Avaliar o grau de infecção em camundongos C57BL/6 infectados concomitantemente com *A. kalrae* e *P. brasiliensis*.

Determinar os níveis de IgG anti-CFA de *A. kalrae* em camundongos C57BL/6 infectado concomitantemente com *A. kalrae* e *P. brasiliensis*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Micro-organismo

*A. kalrae* (IFM55165) foi gentilmente cedido pelo Research Center of Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Chiba, Japão, *P. brasiliensis* Pb18 foi doado pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo da UNIFESP.

Para a infecção ambos foram cultivados em ágar Sabouraud 4% de glucose (7150A Acumedia, Lansing, MI, EUA) a 35 °C durante 5 dias, foram removidos por raspagem suave e transferidos em tubo com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,15 M, pH 7,2, em seguida as soluções foram homogeneizadas em vórtex durante 5 minutos, seguida de repouso (1,5 h a 4 °C). Foram novamente homogeneizadas durante 5 minutos, centrifugadas a 1005 x g a 4 °C durante 10 min (Centrífuga Eppendorf, 5804R Hamburgo, Alemanha). O pellet foi ressuspenso em 1,5 mL de PBS e uma pequena alíquota destas, foram diluídas para contagem de célula em câmara de Neubauer, a concentração ajustada (descrita no protocolo experimental) conforme necessário para a infecção.

#### 3.2 Protocolo experimental

Camundongos C57BL/6, machos, foram utilizados para o estudo. Trinta e seis animais foram divididos em seis grupos (Grupos 1 a 6), com seis animais em cada grupo (Tabela 1). Cada animal recebeu 100µL de suspensão com inoculação via endovenosa (plexo ocular).

**Tabela 1** – Concentração da suspensão inoculada em cada animal.

Grupo	Inoculo
1	PBS
2	10 <sup>6</sup> células Pb
3	10 <sup>6</sup> células Ak
4	10 <sup>7</sup> células Ak
5	10 <sup>6</sup> células Ak 10 <sup>6</sup> células Pb
6	10 <sup>7</sup> células Ak 10 <sup>6</sup> células Pb



Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Patológicas, no Centro de Ciências Biológicas, UEL. Com temperatura controlada e monitorados diariamente para observar alterações comportamentais. Após 21 dias todos os sobreviventes foram eutanasiados utilizando anestésico inalatório. Todos os procedimentos aplicados aos animais no estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA-UEL) (nº174/2016).

### *3.2.1 Processamento de amostras biológicas*

Amostra de sangue de cada animal foi coletada via plexo ocular e centrifugada para obtenção do soro. Os órgãos (baço, cérebro, coração, fígado, pulmão e rim), foram coletadas de forma estéril sendo os mesmos divididos em duas partes. Uma parte foi colocada em formalina tamponada (0,05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , água destilada e 10 % de formol 37 %) por 24 horas, seguida de troca por álcool 70% onde estes órgãos ficaram submersos até o dia da inclusão para corte histológico. A outra parte de cada órgão foi colocada em microtubo e processada conforma a descrição no item 3.3.

### **3.3 Unidade Formadora de Colônias (UFC)**

A contagem de UFC, foi conduzida em baço, cérebro, coração fígado, pulmão, rim e de cinco animais foi possível coletar uma pequena amostra de urina (três animais do Grupo 2 e dois do Grupo 4), todos assepticamente. Estes órgãos foram introduzidos em microtubos devidamente esterilizado e pesado, A partir do cálculo (0,2 g de tecido/mL) os órgãos foram então homogeneizados com quantidades específicas de PBS, uma alíquota (50  $\mu\text{L}$ ) destas soluções e uma alíquota da urina foram semeadas em placas de Petri com ágar Sabouraud 4% de glucose (7150A Acumedia, Lansing, MI, EUA) com cloranfenicol, mantidos a 35 °C, e as colônias contadas no quinto dia de incubação.

### 3.4 Antígenos livres de células (CFA) de *A. kalrae*

Para obter os antígenos livres de célula (CFA) que posteriormente foi utilizado para o teste de ELISA, *A. kalrae*, foi cultivado em ágar Sabouraud 4% de glucose (7150A Accumedia, Lansing, MI, EUA) a 35 °C durante 5 dias, em seguida recolhido por raspagem suave da superfície do ágar e transferido para um tubo contendo 0,15 M de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2, em seguida foi adicionado 0,02 % de timerosal e 2,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo inibidor de protease (PMSF) (Sigma P7626, St. Louis, MO, EUA). Esta solução foi homogeneizada em vórtex durante 5 minutos e posterior repouso durante 1,5 h a 4°C. Novamente homogeneizada (5 min) e centrifugada a 1005 x g a 4 °C durante 15 min (Centrífuga Eppendorf, 5804R, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi novamente centrifugado a 12.870x g a 4 °C durante 20 min, o CFA é o sobrenadante obtido desta última centrifugação. Determinou-se a concentração de proteínas do CFA com auxílio do NanoDrop, (Espectrofotômetro UV-Vis Nanodrop Lite, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, U.S.A) aliqüotadas e armazenadas à -80 °C (NAGASHIMA et al., 2014).

### 3.5 ELISA para IgG anti-CFA de *A. kalrae*

As amostras de soro foram analisadas em duplicata, por teste de ELISA indireto para detecção de anticorpos, utilizando antígenos obtidos a partir de *A. kalrae* (IFM55165). Placas de poliestireno de alta afinidade com 96 cavidades (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) foram revestidas (100 µL/poço) com CFA de *A. kalrae* (25 µg/mL) ficaram incubadas durante 1 h a 35 °C e overnight a 4 °C. No dia seguinte as placas foram lavadas (com tampão lavagem), os locais não ligados foram bloqueados durante 1 h à temperatura ambiente com PBS-Tween e leite desnatado a 5 %, as placas foram lavadas e em seguida incubadas com as amostras de soro diluídas 1:50 em PBS com leite desnatado a 0,5 %, incubadas durante 2 h a 35 °C. Após outra lavagem foi adicionado Anti-IgG de camundongo peroxidase (anticorpo marcado) (Sigma A8924 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) diluído 1:4.000, incubado durante 1,5 h a 35 °C, as placas foram lavadas mais uma vez, seguido pela adição de O-fenilenodiamina solução de substrato (OPD). A reação foi interrompida utilizando 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a absorbância foi lida a 492 nm em

leitor Multiskan EX (Labsystems, Helsínquia, Finlândia). Os níveis de IgG foram expressos em unidades de densidade óptica (D.O.) a 492 nm.

### 3.6 Histologia

O exame histológico foi realizado conforme descrito por TEWARI & MACPHERSON, (1968) com modificações, porções do baço, cérebro, coração fígado, pulmão e rim de animais autopsiados e submersos no álcool 70% foram submetidos à desidratação em álcool 95% por 1,5h (três banhos de 30min) e álcool 100% por 2,5h (três banhos de 30min e um de 1h). Em seguida passaram por 3 banhos de xilol à temperatura ambiente (30min cada) e um banho de xilol a 60°C, também por 30min. A partir daí, foram feitos quatro banhos de parafina (Paraplast Plus®) por 2h (30min cada banho), em estufa (60°C) para então ser feito a inclusão dos órgãos na parafina, formando blocos. Estes blocos de parafina contendo os órgãos foram então fixados a um taco de madeira para serem cortados no Micrótomo em secções de 5µm que foram aderidas em lâminas contendo L-polilisina. Para coloração, as lâminas foram desparafinadas em xilol por 20min (dois banhos de 10min), hidratadas pelo álcool até a água (álcool absoluto, 95%, 70% e água em banhos de 5min cada).

Para coloração de Grocott as secções foram imersas em banhos de solução de Ácido Crômico a 5%, Bissulfito de Sódio a 1%, Solução de Trabalho (contendo Nitrato de Prata, Hexametilenotetramina, Borax e água destilada), Tiosulfato de Sódio a 2% e para finalizar as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina Harris por 5 segundos. E por fim analisados em microscopia óptica (Microscópio Nikon eclipse e200), no aumento de 1000x.

### 3.7 Análise estatística

Para todas as análises estatísticas do experimento foram realizados testes estatísticos utilizando o programa R (R Core Team (2016)). Foi considerado como significativo  $p < 0,05$ .

Para avaliar a homogeneidade de variância foi realizado o var.test e Bartlett e para a análise da normalidade nos erros, foi utilizado o teste de Shapiro-wilk (Montgomery, D. C., 2012).

Para comparação entre grupos na UFC, foi utilizado o teste paramétrico t.test (quando a normalidade dos erros apresentou  $p > 0,05$ ) ou o teste não paramétrico Wilcox (quando a normalidade dos erros apresentou  $p < 0,05$ ) (MONTGOMERY, 2012). Através da contagem de UFC, analisou-se: (1) o grau de infecção quando inoculadas concentrações distintas de *A. kalrae*; (2) se há diferença no grau de infecção quando inoculado concomitantemente *A. kalrae* e *P. brasiliensis*.

Para avaliar (1) a diferença no nível sérico de IgG anti-*A. kalrae* quando inoculado *A. kalrae* em concentrações distintas e (2) o impacto da infecção concomitante de *A. kalrae* e *P. brasiliensis* no nível sérico de IgG anti-*A. kalrae*, foi realizado o teste de Tukey utilizado Delineamento Inteiramente Casualizado (MONTGOMERY, 2012).

A estatística do corte histológico foi realizada utilizando o baço de todos os animais, a infecção observada na lâmina, foi determinada levando em consideração o nível de presença de *A. kalrae* em cada órgão, determinados de 1 a 4 e analisados pelo teste de Kruskal Wallis (MONTGOMERY, 2012).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Sobrevivência e Síndrome neurológica

Todos os animais infectados apenas com *A. kalrae* sobreviveram ao período total do experimento, de 21 dias. Enquanto que nos grupos co-infectados, dois animais pereceram, um do Grupo 5 em menos de 24 horas após a infecção e um do Grupo 6 em 11 dias de infecção.

Nenhum camundongo infectado apenas com *A. kalrae* demonstrou alteração comportamental no decorrer do período de 21 dias. Todavia, durante o experimento um dos animais do Grupo 6, com infecção associada, desenvolveu a síndrome neurológica, com atitudes anormais, como, girar se levantado pela cauda, perda do senso de direção e irregularidade na coordenação muscular (ataxia).

### 4.2 Grau de infecção em camundongos C57BL/6

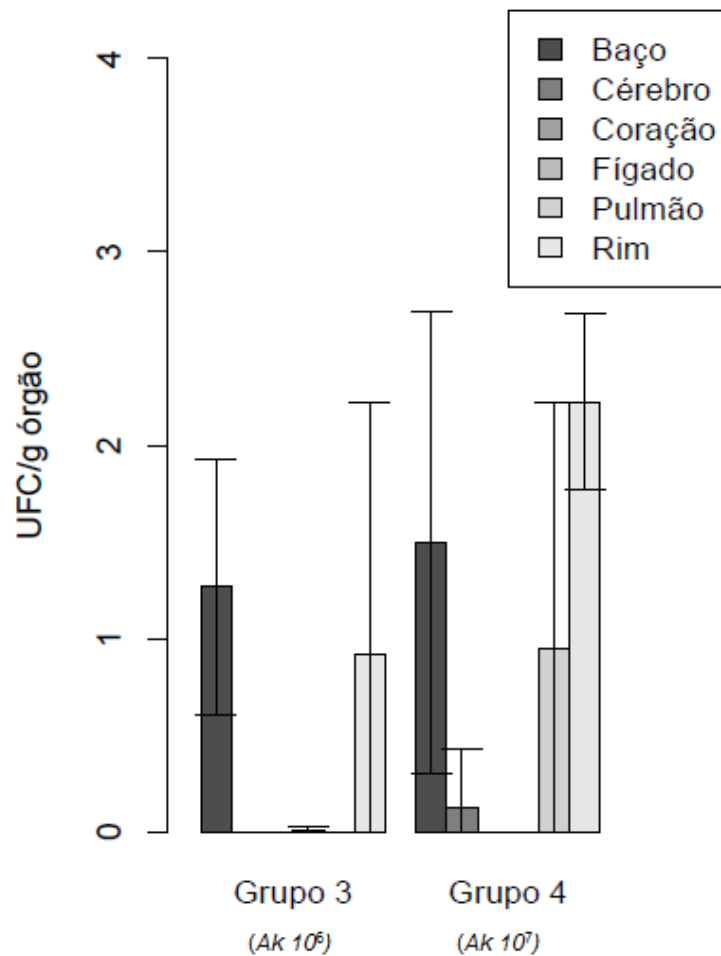
#### 4.2.1 UFC em camundongos infectados com *A. kalrae*

Comparando o Grupo 3 (*A. kalrae*  $1 \times 10^6$ ) e o Grupo 4 (*A. kalrae*  $1 \times 10^7$ ) foi observado que o primeiro grupo apresentou os órgãos baço, fígado e rim infectados, em relação ao outro grupo que apresentou infecção em quatro órgãos (baço, cérebro, pulmão e rim). A variabilidade de dados obtidos, permitiram a análise estatística dos resultados da unidade formadora de colônia do baço e do rim dos grupos.

Comparando o resultado do baço destes grupos, as análises demonstraram que há homogeneidade de variância ( $p > 0,05$ ) e não há normalidade dos dados ( $p < 0,05$ ) para baço do Grupo 3, ao contrário do baço do Grupo 4 ( $p > 0,05$ ). Com isso foi realizado o teste de Wilcoxon que evidenciou  $p > 0,05$ , ou seja, não há diferença significativa na infecção deste órgão quando comparado entre esses Grupos.

A infecção no rim, dos Grupos 3 e 4 também foi comparada, ( $p < 0,05$ ) não há homogeneidade das variâncias, e não há normalidade dos dados para o rim do Grupo 3 ( $p < 0,05$ ), enquanto, o rim do Grupo 4 ( $p > 0,05$ ). Foi realizado o teste de Wilcoxon que demonstrou  $p > 0,05$ , ou seja, não há diferença significativa na infecção deste órgão quando comparado entre esses Grupos (Figura 1).

**Figura 1** – Contagem de UFC (expresso em  $\text{Log}_{10}$ ) de *A. kalrae* em órgãos de camundongos C57BL/6 infectados com *A. kalrae*  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$ .



#### 4.2.2 UFC em camundongos infectados concomitantemente com *A. kalrae* e *P. brasiliensis*

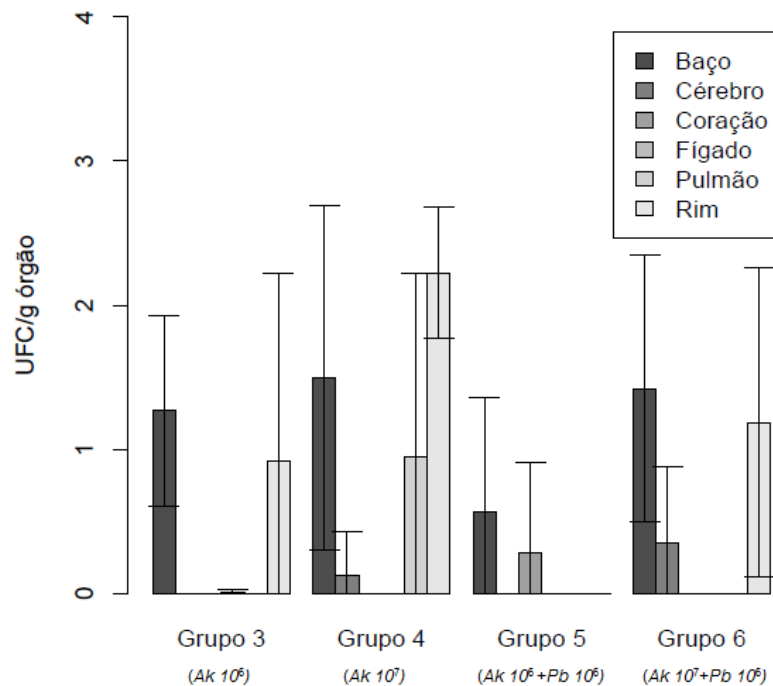
Comparando o Grupo 3 (*A. kalrae*  $1 \times 10^6$ ) com o Grupo 5 (*A. kalrae*  $1 \times 10^6$  e *P. brasiliensis*  $1 \times 10^6$ ) salienta-se que o Grupo 3 apresentou infecção pelo fungo em três órgãos (baço, fígado e rim), enquanto no Grupo 5 dois órgãos (baço e coração) apresentavam a infecção. Comparando o Grupo 4 (*A. kalrae*  $1 \times 10^7$ ) e o Grupo 6 (*A. kalrae*  $1 \times 10^7$  e *P. brasiliensis*  $1 \times 10^6$ ) foi observado que o Grupo 6 apresentou infecção em apenas três órgãos (baço, cérebro e rim) e o Grupo 4 em quatro órgãos (baço, cérebro, pulmão e rim). Apesar do número de órgão que apresentaram crescimento na UFC, o estudo obteve baixa variabilidade de dados, por isso, foi possível realizar a análise estatística dos resultados da unidade formadora de colônia comparando baço

do Grupo 3 e 5 (chamada de Primeira análise), baço do Grupo 4 e 6 (Segunda análise) e o rim do Grupo 4 e 6 (Terceira análise).

Para a Primeira análise, ( $p > 0,05$ ) os dados apresentam homogeneidade de variância, enquanto o teste de normalidade para ambos os baços ( $p < 0,05$ ). Em virtude disso a média dos grupos foi comparada utilizando Wilcoxon, onde o  $p > 0,05$  constata que não há evidências para concluir que *P. brasiliensis* influencia em *A. kalrae*. Na Segunda análise os resultados apresentaram homogeneidade de variância e normalidade dos dados ( $p > 0,05$ ), para ambos. O teste de comparação das medias (t. test) ( $p > 0,05$ ) mostrou que não há evidências para concluir que *P. brasiliensis* interfere no *A. kalrae*.

A Terceira análise apresentou  $p > 0,05$  para as análises de homogeneidade das variâncias e normalidade dos dados, sendo possível então realizar o teste das medias que resultou em um  $p > 0,05$  ou seja, não há evidencias para concluir que *P. brasiliensis* interfere em *A. kalrae* (Figura 2).

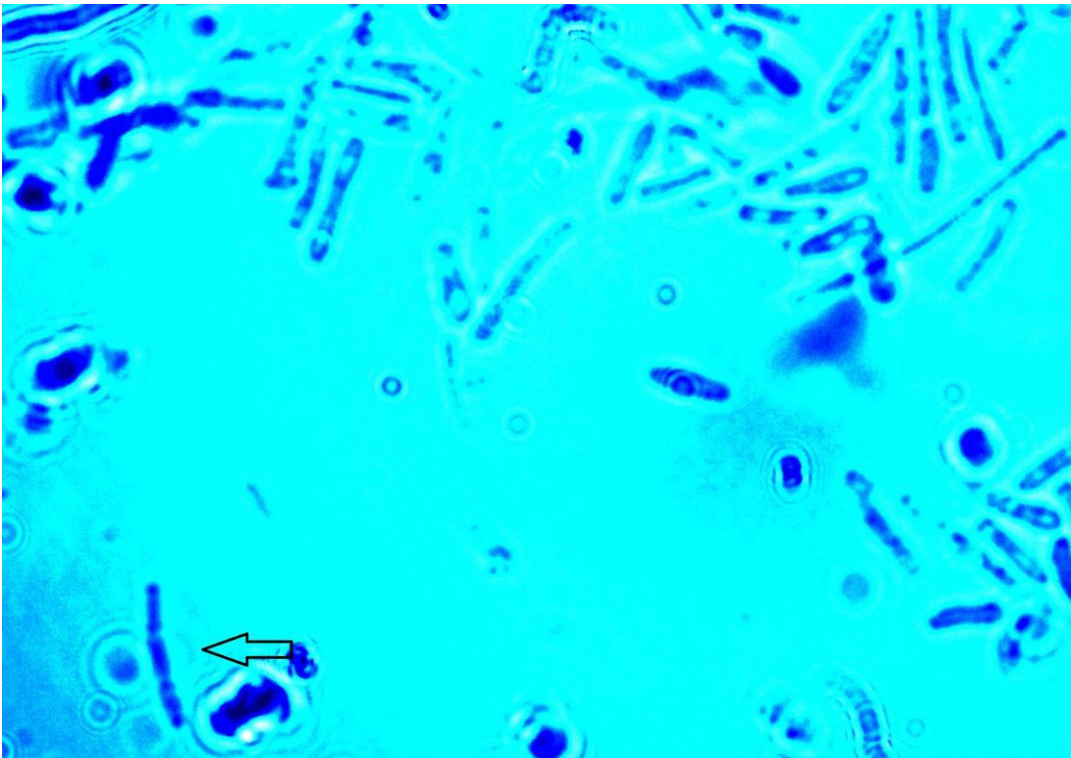
**Figura 2** – Contagem de UFC (expresso em  $\text{Log}_{10}$ ) de *A. kalrae* em órgãos de camundongos C57BL/6 infectados com *A. kalrae*  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  concomitantemente ou não com *P. brasiliensis*  $1 \times 10^6$ .



### 4.3 UFC de amostras de urina

Entre amostras de urina coletadas, duas delas, sendo, uma do animal 2 e uma do animal 5 do Grupo 4 (*A. kalrae*  $1 \times 10^7$ ), apresentaram colônias com coloração amarela e aspecto aveludado, foram analisadas em microscopia e observando-se fragmentos de hifas septadas (Figura 3).

**Figura 3** – Exame direto da cultura de *A. kalrae* de animal com infecção Ak  $10^7$



A seta indica fragmento de hifa de *A. kalrae* corados com Azul de algodão, observados em aumento de 1000x.

### 4.4 Nível de IgG anti-*A. kalrae* e efeito da infecção concomitante de *A. kalrae* e *P. brasiliensis*

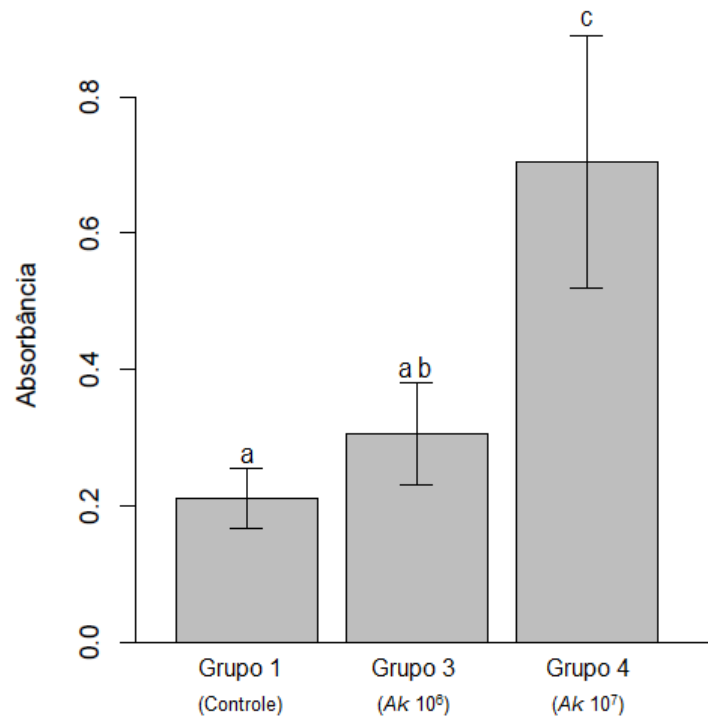
#### 4.4.1 Níveis séricos de IgG anti-CFA de *A. kalrae* em camundongos C57BL/6 infectados com *A. kalrae*.

A análise estatística concluiu que os erros têm uma distribuição normal ( $p > 0,05$ ) e as variáveis são homogêneas ( $p > 0,05$ ). O resultado de ELISA analisados por Delineamento inteiramente Casualizado demonstrou  $p < 0,05$ , o nível sérico de IgG



anti-*A.kalrae* é significativamente maior entre os Grupos que apresentam concentrações distintas de *A. kalrae* (Figura 4).

**Figura 4** – Níveis de IgG anti CFA de *A. kalrae* dos grupos controle e infectado com *A. kalrae* ( $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$ ) analisados por teste de ELISA.

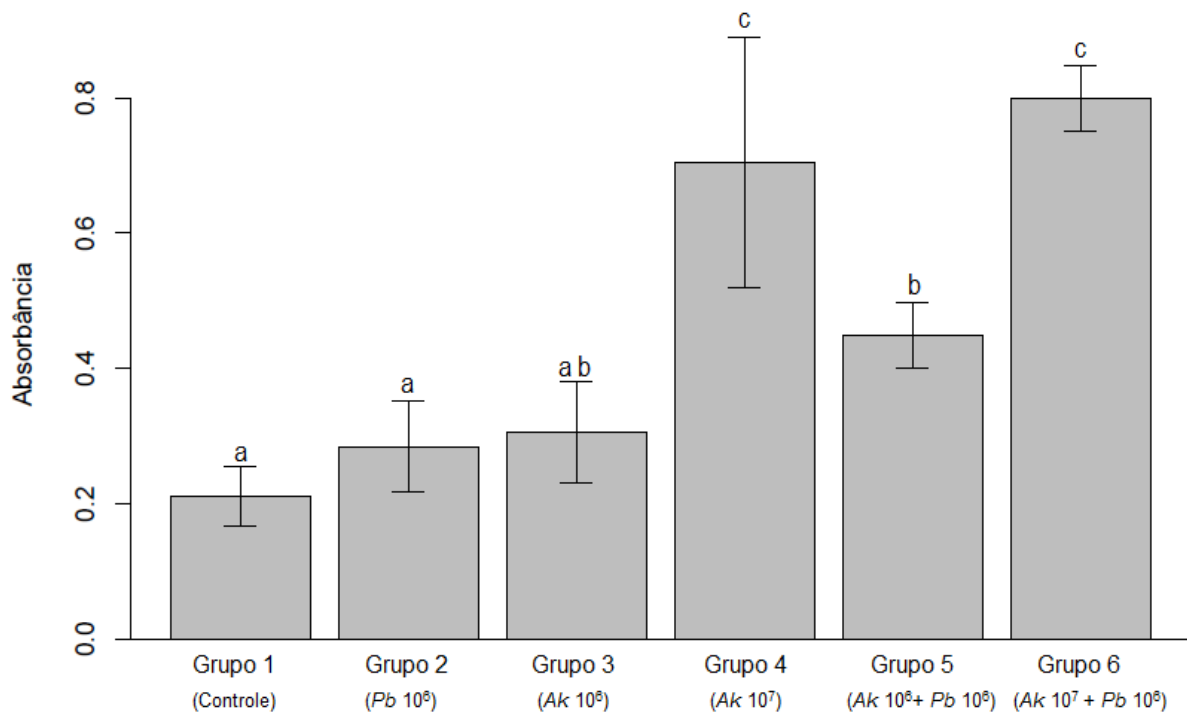


Letras iguais indicam que os grupos não diferem entre si, letras diferentes indicam que os grupos diferem entre si.

#### 4.4.2 Efeito da infecção no nível de IgG anti-CFA de *A. kalrae* em camundongos infectados concomitantemente com *A. kalrae* e *P. brasiliensis*

A análise demonstrou que os erros seguem uma distribuição normal ( $p > 0,05$ ). E as variáveis são homogêneas ( $p > 0,05$ ). A análise do efeito da infecção concomitante no nível sérico de IgG de camundongo infectado com *A. kalrae* e *P. brasiliensis* foi realizada com o Delineamento Inteiramente Casualizado onde apresentou baixa variabilidade com o coeficiente de variação (CV) de 10,86% e através das análises das médias não há evidências para concluir que haja diferença significativa na infecção de *A. kalrae* quando inoculado concomitantemente com *P. brasiliensis*. (Figura 5).

**Figura 5** – IgG anti-*A. kalrae* por teste de ELISA do Grupos Controle e infectado com *A. kalrae* ( $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$ ) concomitante ou não com *P. brasiliensis* ( $1 \times 10^6$ ).

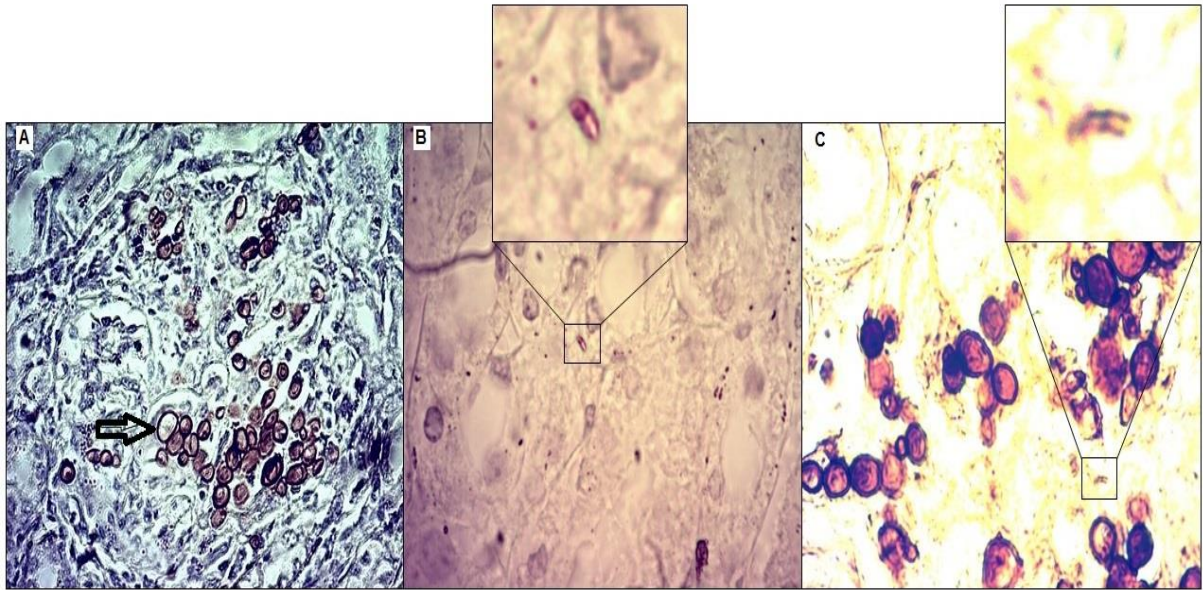


Letras iguais indicam que os grupos não diferem entre si, letras diferentes indicam que os grupos diferem entre si.

#### 4.5 Histologia

A coloração de Grocott no corte histológico, permitiu identificar *P. brasiliensis* e *A. kalrae* em baço, cérebro, coração, fígado, pulmão e rim, sendo detectado os fungos presentes simultaneamente, ou não, em um mesmo órgão. A Figura 6 mostra a presença de fungos em órgãos de diferentes animais.

**Figura 6** – Laminas de corte histológico do rim do Grupo 2, 4 e 5, coradas com coloração de Grocott e analisadas em aumento de 1000x.



(A) flecha indica células de leveduras do fungo *P. brasiliensis* no rim de um animal do Grupo 2. (B) fragmento de hifa de *A. kalrae* no rim de um animal do Grupo 4. (C) fragmento de hifa de *A. kalrae* e *P. brasiliensis* no rim de um animal do Grupo 5 que recebeu infecção concomitante.

Pelo teste de Kruskal Wallis foi possível verificar que o Grupo 3 (*A. kalrae*  $1 \times 10^6$ ) não difere significativamente do Grupo 5 (*A. kalrae*  $1 \times 10^6$  e *P. brasiliensis*  $1 \times 10^6$ ) e o Grupo 4 (*A. kalrae*  $1 \times 10^7$ ) não difere significativamente do Grupo 6 (*A. kalrae*  $1 \times 10^7$  e *P. brasiliensis*  $1 \times 10^6$ ), com isso é possível dizer que não há evidências para concluir que *P. brasiliensis* interfere em *A. kalrae*.

A mesma análise foi realizada para comparar o nível de infecção em corte histológico do baço dos Grupos 3 e 4. Utilizando o teste de Kruskal Wallis foi identificado diferença significativa na infecção do baço desses Grupos.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo utilizou o modelo animal de infecção por *A. kalrae*, com camundongo da linhagem C57BL/6. A literatura relata modelo de infecção por *A. kalrae* em camundongo da linhagem Swiss (TEWARI; MACPHERSON, 1968) e BALBc (NAGASHIMA et al., 2016). Tewari e Macpherson (1968) observaram o desenvolvimento da síndrome neurológica após 4 a 5 dias de infecção, com pico máximo entre o 7º e 10º dia, com manifestação de hiperirritabilidade, salto, andar em círculos e ataxia. Nagashima et al. (2016) também observaram que 69% dos camundongos BALBc infectados com  $5 \times 10^6$  células de *A. kalrae* apresentaram comportamento anormal do 3º ao 11º dia após a infecção, como girar quando levantado pela calda, inclinação da cabeça, andar em círculos e perda ou irregularidade da coordenação muscular (ataxia). Em contraste, neste trabalho utilizando camundongo da linhagem C57BL/6 não foi detectada a síndrome neurológica após a infecção apenas com *A. kalrae*, mesmo com  $1 \times 10^7$  células. Apenas um dos animais do Grupo 6 (2,7%), co-infectado com o fungo *P. brasiliensis* apresentou síndrome neurológica após 11 dias de infecção. Possivelmente a linhagem C57BL/6 seja mais resistente em apresentar a síndrome neurológica.

A inoculação endovenosa de *A. kalrae*, resultou em disseminação para baço, cérebro, coração, fígado, pulmão e rim, sendo os mesmos confirmados em cultivo *in vitro*. O resultado de disseminação está de acordo com os dados de Tewari e Macpherson (1968) e Nagashima et al. (2016). Ainda de acordo com Nagashima et al. (2016), os órgãos mais frequentemente infectados foram baço e rim. Embora seja considerado um fungo neurotrópico, neste trabalho foi detectado *A. kalrae* com baixa frequência no cérebro. Isto possivelmente se deve ao período analisado, já que Nagashima et al. (2016) detectou alta contagem de UFC no cérebro com 7 dias, mas negativo em 28 dias pós-infecção.

Dentre os 6 órgãos analisados (baço, cérebro, coração, fígado, pulmão e rim), 4 órgãos em 6 animais infectados com  $10^7$  e 3 órgãos em 6 animais infectados com  $10^6$  foram positivos, respectivamente. No entanto não houve diferença significativa na carga fúngica nos órgãos, quando comparados UFC de *A. kalrae* em órgãos de camundongos infectados com estes dois diferentes inóculos. Este resultado também pode ser devido ao período tardio de análise e, portanto, com a possibilidade de ter ocorrido algum controle pela resposta imune induzida.

A proteção induzida por anticorpos tem sido demonstrada em infecções sistêmicas por *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* (KAGAYA; SHINODA; FUKAZAWA, 1981; MUKHERJEE; LEE; CASADEVALL, 1995), e na infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* (TRISTÃO et al., 2013a).

A resposta imune induzida pela infecção foi avaliada pela dosagem de IgG anti-CFA de *A. kalrae* no soro e demonstrou nível significativamente maior ( $p < 0,05$ ) no grupo de camundongos infectados apenas com *A. kalrae* na concentração de  $10^7$  em relação a de  $10^6$ . E, portanto, a similaridade no grau de infecção (UFC) pode ser devido a ação dos anticorpos em nível elevado no período.

Investigado se o grau de infecção por *A. kalrae* nos camundongos teria influência de co-infecção com *P. brasiliensis*, notou-se diminuição na frequência de positividade de órgãos infectados com *A. kalrae* em grupos de camundongos co-infectados com *P. brasiliensis* (4 para 3 em  $10^7$  Ak e Pb e 3 para 2 em  $10^6$  Ak e Pb) e, embora os valores de UFC sejam menores em co-infectados, não houve diferença significativa. O fato sugere que a co-infecção não alterou o grau de infecção de *A. kalrae*. Possivelmente a morte precoce de camundongo observada no grupo co-infectado decorreu da gravidade de paracoccidioidomicose induzida pelo *P. brasiliensis*. No presente trabalho não foi investigada a carga fúngica de *P. brasiliensis*, mas pela coloração por Grocott foi detectada a forma leveduriforme de *P. brasiliensis* com múltiplos brotamentos ao lado de *A. kalrae*. O que sugere que o *A. kalrae* não inibe o crescimento de *P. brasiliensis* e, se ocorre facilitação no crescimento de *P. brasiliensis* pelo *A. kalrae*, requer estudos adicionais.

Da mesma forma que não houve diferença significativa no grau de infecção por *A. kalrae*, não houve também diferença significativa nos níveis de IgG anti-*A. kalrae* nos grupos co-infectados. Todavia, o nível de IgG anti-CFA de *A. kalrae* no grupo co-infectado com *A. kalrae*  $10^6$  e *P. brasiliensis*  $10^6$ , foi maior que o controle não infectado, o mesmo não ocorrendo com o mono infectado apenas com *A. kalrae*  $10^6$ , sugerindo alguma tendência de aumento na indução de resposta imune. Este resultado sugere a necessidade de se avaliar uma amostragem maior de animais ou em diferentes períodos de infecção.

De forma interessante, no presente trabalho foi possível detectar *A. kalrae* em amostra de urina em camundongo co-infectado. Esta é a primeira evidência na literatura de que *A. kalrae* pode ser eliminado pela urina.

## 6. CONCLUSÃO

- ✓ Camundongo da linhagem C57BL/6 é susceptível à infecção sistêmica com *A. kalrae*;
- ✓ A indução da resposta imune humoral anti-*A. kalrae* em camundongos C57BL/6 é dependente da concentração de *A. kalrae* inoculado;
- ✓ O grau de infecção por *A. kalrae* não é influenciado pela infecção concomitante com *P. brasiliensis*;
- ✓ A infecção concomitante de camundongos C57BL/6 com *A. kalrae* e *P. brasiliensis* não interfere na resposta imune humoral anti-*A. kalrae*;
- ✓ Pela primeira vez foi evidenciada a eliminação de *A. kalrae* em urina de camundongo infectado experimentalmente.

## REFERÊNCIAS

- BISER, S. A.; PERRY, H. D.; DONNENFELD, E. D.; DOSHI, S. J.; CHATURVEDI, V. *Arthrographis keratitis* mimicking *Acanthamoeba keratitis*. **Cornea**, v. 23, n. 3, p. 314-317, 2004.
- BOAN, P.; ARTHUR, I.; GOLLEDGE, C.; ELLIS, D. Refractory *Arthrographis kalrae* native knee joint infection. **Med Mycol Case Reports**, v. 1, n. 1, p. 112-114, 2012.
- CANDELA, J.D.; FORTEZA, A.; GARCÍA, D.; PRIETO, G.; BELLOT, R.; VILLAR, S.; CORTINA, J.M. Endocarditis caused by *Arthrographis kalrae*. **Ann Thorac Surg**, v. 90, n. 1, p. e4-5, 2010.
- CHIN-HONG, P. V.; SUTTON, D. A.; ROEMER, M.; JACOBSON, M. A.; ABERG, J. A. Invasive fungal sinusitis and meningitis due to *Arthrographis kalrae* in a patient with AIDS. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 2, p. 804-807, 2001.
- DEGAVRE, B.; JOUJOUX, J. M.; DANDURAND, M.; GUILLOT B. First report of mycetoma caused by *Arthrographis kalrae*: successful treatment with itraconazole. **J Am Acad Dermatol**, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 318-320, 1997.
- DENIS, J.; SABOU, M.; DEGOT, T.; CANDOLFI, E.; LETSCHER-BRU, V. First case of *Arthrographis kalrae* fungemia in a patient with cystic fibrosis. **Med Mycol Case Reports**, v. 4, p. 8-11, eCollection 2016.
- KAGAYA, K.; SHINODA, T.; FUKAZAWA, Y. Murine defense mechanism against *Candida albicans* infection. I. Collaboration of cell-mediated and humoral immunities in protection against systemic *C. albicans* infection, **Microbiol Immunol**, v. 25, n. 7, p. 647-654, 1981.
- MACHADO, G. C.; MORIS, D. V.; ARANTES, T. D.; SILVA, L. R. F.; THEODORO, R. C.; MENDES, R. P.; VICENTINI, A. P.; BAGAGLI, E. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 637-643, 2013.
- MONTGOMERY, D.C. **Design and Analysis of Experiments**. 8<sup>th</sup> ed. New York, NY: Wiley, 2012. 752 p.
- MUKHERJEE, S.; LEE, S.C.; CASADEVALL, A. Antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan enhance antifungal activity of murine macrophages. **Infect Immun**, v. 63, n. 2, p. 573-579, 1995.
- NAGASHIMA, L. A.; AKAGI, C. Y.; SANO, A.; SILVA, P. L. A.; MURATA, Y.; ITANO, E. N. *Arthrographis kalrae* soluble antigens present hemolytic and cytotoxic activities. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 37, n. 5-6, p. 305-311, 2014.
- NAGASHIMA, L. A.; SANO, A.; ARAÚJO, E.J.A.; SILVA, P.L.A.; ASSOLINI, J.P.; ITANO, E.N. Immunomodulation over the course of experimental *Arthrographis kalrae* infection in mice. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 48, p. 79-86, 2016.
- ONG, D.C.; KHAN, R.; GOLLEDGE, C.; SMITH, R.C. Case report: Eumycetoma and mycotic arthritis of the knee caused by *Arthrographis kalrae*. **J Orthop**, v. 12, supl. 1, p. s140-144, 2015.

PERLMAN, E.M.; BINNS, L. Intense photophobia caused by *Arthrographis kalrae* in a contact lens-wearing patient. **Am J Ophthalmol**, v. 123, n. 4, p. 547-549, 1997.

PICHON, N.; AJZENBERG, D.; DESNOS-OLLIVIER, M.; CLAVEL, M.; GANTIER, J.C.; LABROUSSE, F. Fatal-stroke syndrome revealing fungal cerebral vasculitis due to *Arthrographis kalrae* in an immunocompetent patient. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 9, p. 3152-3155, 2008.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2016. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

RAMLI, S.R.; FRANCIS, A.L.; YUSOF, Y.; KHAITHIR, T.M.N. A Severe Case of *Arthrographis kalrae* Keratomycosis. **Case Rep Infect Dis**, v. 2013, id. 851875, 3 páginas, 2013.

SAINAGHI, P.P.; ROSSATI, A.; BUCCHERI, C.; BARGIACCHI, O.; GARAVELLI, P.L.; ANDREONI, S. *Arthrographis kalrae* arthritis: a new case report. **Infez Med**, v. 23, n. 2, p. 192-194, 2015.

SUGIURA, Y.; HIRONAGA, M. *Arthrographis kalrae*, a rare causal agent of onychomycosis, and its occurrence in natural and commercially available soils. **Med Mycol**, v. 48, n. 2, p. 384-389, 2010.

TEWARI, R.P.; MACPHERSON, C.R. Pathogenicity and neurological effects of *Oidiodendron Kalrai* for mice. **J Bacteriol**, v. 95, n. 3, p. 1130-1139, 1968.

THOMAS, B.C.; ZIMMERMANN, S.; VOLCKER, H.E.; AUFFARTH, G.U.; DITHMAR, S. Severe *Arthrographis kalrae* Keratomycosis in an Immunocompetent Patient. **Cornea**, v. 30, n. 3, p. 364-366, 2011.

TRISTÃO, F.S.; PANAGIO, L.A.; ROCHA, F.A.; CAVASSANI, K.A.; MOREIRA, A.P.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. B cell-deficient mice display enhanced susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 1-10, 2013a.

TRISTÃO, F.S.; ROCHA, F.A., DIAS, F.C.; ROSSI, M. A.; SILVA, J.S. The left lung is preferentially targeted during experimental paracoccidioidomycosis in C57BL/6 mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 46, n. 10, p. 839-843, 2013b.

VOS, C.G.; MURK, J.L.A.N.; HARTEMINK, K.J.; DANIELS, J.M.A.; PAUL, M.; DEBETS-OSSENKOPP, Y.J. A rare pulmonary infection caused by *Arthrographis kalrae*. **J Med Microbiol**, v. 61, n. Pt10, p. 593-595, 2012.

XI, L.; FUKUSHIMA, K.; LU, C.; TAKIZAWA, K.; LIAO, R.; NISHIMURA, K. First case of *Arthrographis kalrae* ethmoid sinusitis and ophthalmitis in the People's Republic of China. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 10, p. 4828-4831, 2004.