



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAFAELA MACAGNAN

ISOLAMENTO DE FUNGOS SEMELHANTES À
***Paracoccidioides* DE AMOSTRAS DE SOLO**

RAFAELA MACAGNAN

ISOLAMENTO DE FUNGOS SEMELHANTES À
***Paracoccidioides* DE AMOSTRAS DE SOLO**

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

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono.

Londrina
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M113i Macagnan, Rafaela.

Isolamento de fungos semelhantes à *Paracoccidioides* de amostras de solo / Rafaela Macagnan. – Londrina, 2014.

46 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, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Paracoccidioidomicose – Teses. 2. Fungos – Isolamento – Teses. 3. Fungos patogênicos – Teses. 4. Solos – Amostragem – 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

RAFAELA MACAGNAN

**ISOLAMENTO DE FUNGOS SEMELHANTES À *Paracoccidioides* DE
AMOSTRAS DE SOLO**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dr^ª. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de maio de 2014.

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunologia Animal do departamento de Ciências Patológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, sob orientação do Professor Dr. Mario Augusto Ono, e contou com o apoio da Capes.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram importantes para que mais essa etapa se realizasse. Sem o auxílio delas, nada teria sido possível.

Assim, fica meu eterno agradecimento a Deus, por ter me oferecido a oportunidade de viver e evoluir, não deixando desistir de meus sonhos, e por permitir que em minha caminhada ocorresse o encontro com as pessoas que citarei a seguir:

Ao Professor Dr. Mario Augusto Ono, pela orientação, disponibilidade, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por toda paciência no decorrer do trabalho, pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação.

Ao Professor Dr. André Vanzela pela amizade, disponibilidade, atenção, ensinamentos, a oportunidade de aperfeiçoamento em seu laboratório, e a essencial colaboração na área de biologia molecular.

Agradeço infinitas vezes a minha melhor amiga e minha mãe, Marí Carmen Piaia Macagnan, por todo amor e dedicação que sempre teve comigo, por ser a pessoa que mais me apoia e acredita em minha capacidade, pelas horas em que ficou ao meu lado enxugando minhas lágrimas, mostrando que havia um longo caminho a ser percorrido, não me deixando desistir em hipótese alguma de meus sonhos, e mostrando que sou capaz de chegar onde desejo. Sem dúvidas, foi quem me deu o maior incentivo e amparo após os tombos e tropeços decorrentes desta minha pequena caminhada, não medindo esforços para as minhas conquistas e objetivos, sem você jamais teria concluído, te amo mãe.

A meu pai Remi Pedro Macagnan, homem que sigo como exemplo de vida e tenho maior orgulho de chamar de pai, meu eterno agradecimento por todo amor e dedicação que sempre teve comigo, principalmente pela frase: “Seja dinâmica”, o que explica muito de mim para meus amigos e colegas, quanto eu a menciono. Você é o grande responsável pela pessoa que me tornei tanto no âmbito profissional e pessoal.

A minha irmã e conselheira Renata Macagnan, pela verdadeira amizade, carinho e atenção que sempre teve comigo, meu imenso agradecimento por estar presente em todos os momentos de minha vida, me orientando, dando força e incentivo, apesar de você usufruir de forma autoritária do meu conhecimento em seus relatórios. Não poderia esquecer do pequeno lembrete: “traga o pen drive para casa ! preciso te passar algumas músicas”, saiba que todas estas melodias me ajudaram a amenizar a saudade que sinto de vocês, você é tudo na minha vida, obrigada Rê.

À Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe pela disponibilidade e ajuda proporcionada durante o trabalho.

Aos colegas de laboratório, especialmente a Aline Omori, Andressa Rorato, Carlos Eduardo de Oliveira, Giovana Carvalho, Igor Suguiura, Isabelle Kazahaya, Mônica Sbeghen, Nicole Fogaça, Tatiane Petroni, Thiago Fernandes, Vanessa Bardella,

pela amizade, companherismos, explicações, sugestões e ajuda nos experimentos sem vocês este trabalho não seria idealizado, meu eterno agradecimento.

A meu amigo, colega e funcionário da UEL Donizeti Rodrigues Belitardo, sempre disposto a ajudar e contribuir com o trabalho, muito obrigada pela disponibilidade, atenção, por toda a ajuda, ensinamentos, pelos conselhos profissionais e pessoais, você me tornou um pouco mais bióloga, muito obrigada.

Aos amigos, agradeço pela verdadeira amizade que construímos, por todos os momentos que passamos, pelos conselhos fornecidos, pela parceria, pelas rodas de chimarrão e tererê, em particular aqueles que estavam sempre ao meu lado (Cassio Nunes, Daniele Pereira, Felipe Andrade, Fernanda Menegon, Hugo Matsuchita, Marcelo Vaz, Tiago Bortolozzi, Vinícius Budny). Saibam que vocês foram essenciais nesta trajetória e que sem vocês ela não seria tão prazerosa e significativa.

À meu fiel amigo Dione, que alegra todos os meus dias, pela disposição para diversos passeios, sem importância de hora e local, ao companheirismo (ouvindo minhas teorias), foi você quem me aguentou diariamente durante este período, revigorando minha vontade de conquista. Obrigado por seu amor incondicional.

A todos os funcionários da Universidade e da RPPN Monte Sinai, por todo o auxílio, acompanhamento, explicação e atenção fornecida ao decorrer desta pesquisa, especialmente a Sr. Isaltino responsável pela sobrevivência dos animais, e ao companheiro das fases de campo Wilian Cunha, principalmente por avisar que uma onça estava perto.

A todos os professores do programa de Patologia Experimental, pela paciência, dedicação e ensinamentos disponibilizados nas aulas, cada um de forma especial contribuiu para a conclusão desse trabalho e conseqüentemente para minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Mestrado.

MACAGNAN, Rafaela. **Isolamento de fungos semelhantes à *Paracoccidioides* de amostras de solo**. 2014. 46f. Dissertação de Mestrado (Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Paracoccidioides é um fungo termodimórfico causador da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica mais prevalente na América Latina, principalmente no Brasil. PCM é uma doença granulomatosa de evolução crônica que afeta os trabalhadores agrícolas, principalmente do sexo masculino. Embora a doença tenha sido descrita há mais de um século, o habitat de *Paracoccidioides* não está definido. A identificação do nicho ecológico do fungo é importante para esclarecer a forma de infecção. Isolados de *P. brasiliensis* foram obtidos a partir do solo, sugerindo que este é o habitat do fungo, como ocorre com outros fungos patogênicos. O objetivo deste estudo foi identificar a presença de *Paracoccidioides* em uma reserva particular do patrimônio natural localizada na Região Norte do Estado do Paraná por meio de técnicas moleculares, micológicas e imunológicas. Amostras de solo (n=103) foram diluídas em salina estéril com cloranfenicol e inoculadas em ratos (isolamento indireto) e semeadas em ágar sabouraud (isolamento direto). A resposta imunológica dos animais inoculados foi avaliada por ELISA indireto com exoantígeno de *P. brasiliensis* por até seis meses após a inoculação. Os ratos soropositivos (n=33) foram eutanasiados e amostras de pulmão, fígado, baço, coração e rim foram analisadas por *Nested* PCR, dos quais, sete apresentaram reação positiva. No isolamento direto foram identificadas duas colônias positivas em *Nested* PCR. Os exoantígenos destes isolados reagiram com soro de animais positivos para PCM no ELISA e apresentaram banda de 43 kDa no *Western blot* com soro de paciente com PCM. As colônias possuem aspecto cerebriforme como o gênero *Paracoccidioides*, porém, a morfologia microscópica não é característica. Novas coletas serão realizadas nos locais em que foram obtidos resultados positivos em *Nested* PCR e novas análises moleculares serão realizadas para a identificação dos mesmos.

Palavras-chave: Amostras ambientais. Isolamento direto. Detecção molecular. Paracoccidioidomicose.

MACAGNAN, Rafaela. **Isolation of similar Paracoccidioides fungi from soil samples.** 2014. 46p. Dissertation (Master in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Paracoccidioides is a thermodimorphic fungus that causes paracoccidioidomycosis (PCM), which is the most prevalent systemic mycosis in Latin America, mainly in Brazil. PCM is a granulomatous disease of chronic evolution that affects mainly male agricultural workers. Although the disease has been described more than a century, the habitat of *Paracoccidioides* is not defined. The identification of the fungus is important to clarify the form of infection. The few isolates of *P. brasiliensis* obtained from soil, suggests that it is the fungus habitat, as occurs with other pathogenic fungi. The objective of this study was to identify areas with presence of *Paracoccidioides* in a Private Nature Reserve located in the Northern Region of Paraná state through molecular, mycological and immunological techniques. Soil samples (n = 103) were diluted in sterile saline containing chloramphenicol, and inoculated into rats (indirect isolation) and was grown in sabouraud agar (direct isolation). The immune response of the inoculated animals was monitored by ELISA with *P. brasiliensis* exoantigen for six months after inoculation. Seropositive rats (n = 33) were euthanized and samples of lung, liver, spleen, heart and kidney were analyzed by Nested PCR, and seven exhibited positive reaction. In direct isolation, two positive colonies were identified by Nested PCR. Exoantigens from these isolates reacted with serum of PCM positive animals in ELISA, and a 43kDa band in Western blot with serum of PCM patients. These colonies have a cerebriform aspect like the *Paracoccidioides* genus, however, is not characteristic of microscopic morphology. New collections will be carried out at the same locations where positives results were obtained in Nested PCR, and new molecular analyzes will be performed for identification.

Keywords: Environmental samples. Direct isolation. Molecular detection. Paracoccidioidomycosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da Paracoccidiodomicose	13
Figura 2 - Distribuição geográfica das diferentes espécies de isolados clínicos de <i>Paracoccidioides</i>	15
Figura 3 - Mapa do estado do Paraná, com a cidade de Mauá da Serra destacada em azul escuro	19
Figura 4 - Amostras positivas após <i>Nested</i> PCR de animais inoculados com solo	26
Figura 5 - Amostras do isolamento direto, positivas após <i>Nested</i> PCR.....	28
Figura 6 - Aspecto microscópico dos isolados 21 e 22	30
Figura 7 - Aspecto macroscópico dos isolados 21 e 22	30
Figura 8 - <i>Western blot</i> realizado com exoantígeno dos isolados 21 e 22.....	31
Figura 9 - Concentração de anticorpos do soro de ratos inoculados com o isolado 22 para exoantígeno de <i>P. brasiliensis</i> . Após o inóculo foi observado o aumento da concentração de anticorpos nos três animais.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração dos conjugados utilizados no ELISA indireto	21
Tabela 2 - Período após inóculo em que os soro dos animais foram considerados positivos no teste de ELISA indireto	24
Tabela 3 - Locais de coleta das amostras de solo, consideradas positivas em ELISA com soros de animais inoculados	25
Tabela 4 - Amostras positivas após <i>Nested</i> PCR, animais inoculados com solo.....	26
Tabela 5 - Soros de animais positivos para exoantígeno B- 339, analisados por ELISA indireto com exoantígeno dos isolados 21 e 22	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

H ⁺ Al ⁻	Alumínio trocável
cm	Centímetro
DAB	3, 3' – Diamonobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
gp	Glicoproteína
h	Hora
ha	Hectare
ITS	Espaçador Transcrito Interno (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)
Km	Quilômetro
m	Metro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mp	Megapixel
N	Normal
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OBS	Observação
O ₂ H ₂	Água oxigenada
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCM	Paracoccidiodomicose
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
rpm	Rotações por minuto
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
pb	Pares de base
pH	Potencial de hidrogênio
p:v	Peso:volume
s	Segundos

TMBZ	Dihidrocloreto de tetrametil benzidina
v:v	Volume:volume
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
%	Por cento

SUMÁRIO

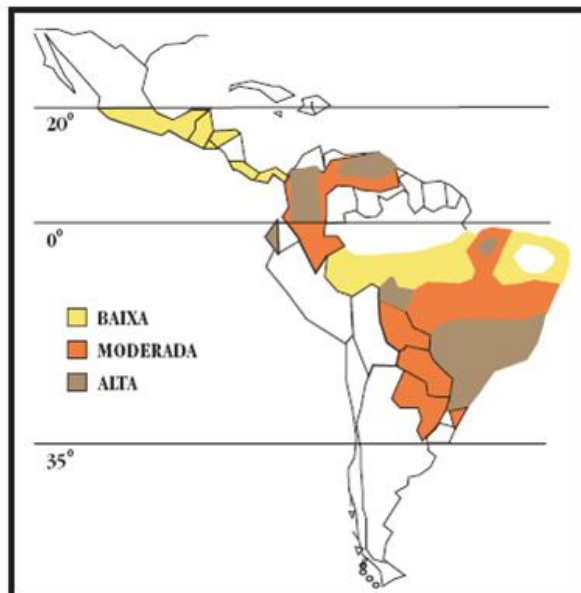
1	INTRODUÇÃO	13
1.1	PARACOCCIDIOIDOMICOSE	13
1.2	<i>PARACOCCIDIOIDES</i>	14
2	MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1	ÁREA DE ESTUDO	19
2.2	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SOLO	20
2.2.1	Isolamento Direto	20
2.2.2	Inoculação em Animais	20
2.2.3	ELISA Indireto	21
2.2.3.1	Exoantígeno	21
2.2.3.2	Imunodifusão radial dupla	21
2.2.3.3	Exame histopatológico	21
2.2.3.4	Isolamento	22
2.2.3.5	Extração de DNA	22
2.2.3.6	<i>Primers</i>	22
2.2.3.7	PCR e <i>Nested</i> PCR	22
2.2.3.8	Sequenciamento pelo método Sanger	23
2.2.3.9	<i>Western blot</i>	23
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1	TENTATIVA DE ISOLAMENTO INDIRETO	24
3.2	ISOLAMENTO DIRETO	27
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
	REFERÊNCIAS	35
	ANEXOS	41
	ANEXO A - Sequência das amostras positivas após <i>Nested</i> PCR.....	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidioidomicose (PCM), causada por fungos do gênero *Paracoccidioides* é a micose com maior prevalência na América Latina. O Brasil apresenta o maior número de casos de PCM, principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Fig. 1) (SHIKANAI-YASUDA, 2006).

Figura 1 – Distribuição geográfica da Paracoccidioidomicose



Fonte: SHIKANAI-YASUDA, 2006

A PCM é uma doença granulomatosa sistêmica de evolução crônica, e constitui a oitava causa de morte relacionada à doença de origem infecciosa. Esta tem elevada importância na saúde pública, pois apresenta grande potencial incapacitante e pode levar o paciente a óbito quando não diagnosticada e tratada corretamente (SHIKANAI-YASUDA, 2006).

A infecção provavelmente ocorre por inalação de propágulos do fungo, que posteriormente no tecido do hospedeiro se transformam em células leveduriformes. A doença é observada em pacientes de todas as faixas etárias a partir dos três anos de vida, com predominância entre 30 e 50 anos de idade. Até a puberdade, a incidência é igual para os gêneros, mas em idade adulta acomete principalmente o sexo masculino (SHIKANAI-YASUDA, 2006).

A forma aguda da doença representa de 3 a 5% dos casos, é mais grave quando comparada com a forma crônica, leva à depressão da resposta imune, afeta pacientes mais jovens, progride rapidamente, e é altamente disseminada, podendo atingir linfonodos, medula óssea, baço e fígado. A forma aguda da PCM pode estar relacionada com outras doenças infecciosas, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e a Tuberculose (BRUMMER et al., 1993; SHIKANAI-YASUDA, 2006).

A forma crônica afeta 90% dos pacientes, com prevalência em indivíduos adultos e do sexo masculino, acomete pulmões e tecidos mucocutâneos. A progressão é lenta podendo ser classificada como leve, moderada ou grave. Independente do órgão atingindo pode ocorrer evolução para fibrose, o que pode interferir de forma permanente no funcionamento do órgão (BRUMMER et al., 1993; SHIKANAI-YASUDA, 2006).

1.2 PARACOCCIDIOIDES

Paracoccidioides é um fungo dimórfico com reprodução assexuada, possui forma filamentosa entre 25 e 30 °C e leveduriforme entre 35 e 37°C. Este gênero pertence ao Reino fungi, Filo Ascomycota, Subdivisão Euascomycetes, Classe Plectomycetes, Ordem Onygenales, Família Ajellomycetaceae (UNTEREINER et al., 2004).

Em fase de levedura, *P. brasiliensis* apresenta dupla membrana (interna rugosa e externa lisa), aspecto seco ou ligeiramente cremoso, com coloração clara (branco a creme), tamanho entre 4 e 30 µm e reprodução assexuada por gemulações (BRUMMER et al., 1993).

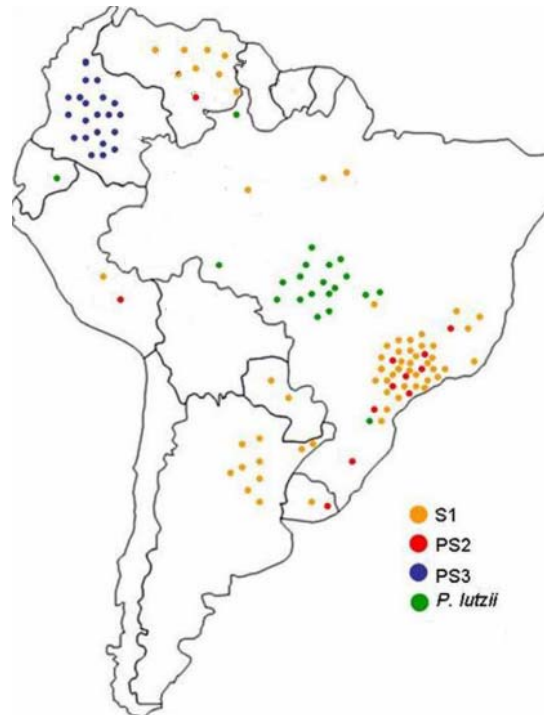
Na fase filamentosa as colônias são irregulares, com variação de cor entre branco e amarelo, podendo apresentar pigmentação marrom difusa, com poucos micélios aéreos e hifas septadas. Em condições desfavoráveis, produzem conídios unicelulares e pedunculados, que em 26 °C crescem na forma saprofítica com filamentos septados (BRUMMER et al., 1993).

Apenas uma espécie de *Paracoccidioides* foi identificada até 2006, porém estudos moleculares demonstraram que a variabilidade genética possibilita a divisão de *P. brasiliensis*, passando a ser um complexo composto por três espécies crípticas, S1, PS2 e PS3, além da nova espécie, *P. lutzii* (THEODORO et al., 2012).

Matute (2006), descreveu o grupo S1 como parafilético e os grupos PS2 e PS3 como monofilético. A ocorrência dos achados de PS2 e S1 fica restrita a Argentina,

Brasil, Peru, Paraguai e Venezuela, enquanto que a PS3 foi observada apenas na Colômbia (Fig 2) (ARANTES et al., 2013).

Figura 2 – Distribuição geográfica das diferentes espécies de isolados clínicos de *Paracoccidioides*



Fonte: modificada de THEODORO et al., 2012.

O habitat de *P. brasiliensis* provavelmente é o solo, como ocorre com outros fungos patogênicos para humanos. Alguns autores isolaram *P. brasiliensis* a partir do solo, porém, as possíveis interações com os fatores abióticos e bióticos do meio ainda não estão elucidadas. O primeiro relato foi de um isolado com características macro e microscópicas de *P. brasiliensis* obtido de uma fazenda de criação de gado no Recife (Shome e Batista, 1963). Outro isolado de *P. brasiliensis* foi obtido por Negróni (1966) de amostras de uma área rural na Argentina. Novos isolados de *P. brasiliensis* foram obtidos de amostras de solo de plantações de café por Albornoz (1971) na Venezuela e por Silva-Vergara e colaboradores (1998) em Minas Gerais.

Os poucos isolados de *Paracoccidioides* obtidos a partir do solo não permitem afirmar que este é o habitat do fungo, pois não apresentaram reprodutibilidade. O estudo da ecologia de *Paracoccidioides* é difícil, porque o isolamento do fungo de amostras ambientais compreende uma série de fatores limitantes, como crescimento

lento, longo período de latência, além da inibição por microrganismos saprófitos do solo, tornando extremamente difícil a identificação dos locais onde ocorreu a infecção (RESTREPO, 1985).

Como os isolados de solo foram obtidos em áreas agrícolas, Ono e colaboradores (2002), avaliaram o efeito de fungicidas, herbicidas e inseticidas sobre o crescimento de *P. brasiliensis* "in vitro" e observaram a inibição de forma dose dependente, sugerindo que estes produtos podem interferir no isolamento do fungo.

Outro fator limitante para o crescimento foi descrito por Terçarioli e colaboradores (2007), neste estudo foi observado que *P. brasiliensis* apresenta bom crescimento tanto em solos com textura argilosa e arenosa, porém, não se desenvolve bem em baixa umidade e em solos com elevados teores de alumínio trocável ($H^+ Al^-$).

Os estudos sobre ecologia vêm sendo elucidados principalmente pela identificação de hospedeiros naturais. Em resumo, estudos epidemiológicos sugerem que o fungo habita locais úmidos (próximos a lagos, rios), com maiores altitudes, áreas nativas, clima temperado ou quente com verões chuvosos e inverno seco (FRANCO et al., 2000; RESTREPO et al., 2001).

Vários trabalhos relatam a infecção em tatus em diferentes estados brasileiros e na Colômbia, principalmente da espécie *Dasypus novemcinctus*, mamífero encontrado na mesma área geográfica de ocorrência de *P. brasiliensis*. Estes animais apresentam intenso contato com solo, pois escavam túneis, habitam tocas subterrâneas, destroem colônias de formigas e coletam folhas, apresentam temperatura corporal de 30°C a 35 °C, e imunidade celular relativamente baixa, o que pode facilitar a infecção, e desempenhar algum papel na evolução de *P. brasiliensis* à condições zoofílicas (PURTILO et al., 1975; NAIFF et al., 1996; BAGALI et al., 1998 e 2006; CORREDOR et al., 1999 e 2005; SILVA-VERGARA et al., 2001; PEREIRA et al., 2003; PEREIRA et al., 2008; ARANTES et al., 2013).

A infecção por *P. brasiliensis* foi demonstrada por meio de estudos epidemiológicos em animais domésticos e silvestres, como equinos, bovinos, ovinos, primatas e felinos, apontando mais uma vez o solo como seu possível habitat, pois estes animais estão em constante contato com o solo (CONTI-DIAZ et al., 1972; GUTIERREZ et al., 1974; GARCIA, et al. 1993; COSTA et al., 1995; SILVEIRA et al., 2008; CORTE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012).

Oliveira e colaboradores (2011), realizaram um estudo para avaliar a infecção por *P. brasiliensis* em 183 galinhas, destas, 40 galinhas de vida livre do estado do Mato Grosso do Sul, e 143 do Paraná, onde 100 galinhas eram de vida livre e 43 de gaiola (menor contato com o solo). Os animais de gaiola não apresentaram reação positiva para gp43 (proteína de 43 kDa, antígeno específica de *P. brasiliensis*), diferente das aves de vida livre, que apresentaram 55% e 16% de positividade nos estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, respectivamente.

Na tentativa de reproduzir a PCM, Pereira e Viana (1911), infectaram saguis, cães, ratos, gatos e coelhos com pus de paciente diagnosticado com PCM, isolando *P. brasiliensis* em meio de cultura. A infecção experimental por *P. brasiliensis* também foi realizada em filhotes de cães, por Ono e colaboradores (2003), neste experimento 2 dos 4 animais inoculados morreram na primeira semana, e a PCM foi confirmada por análise histopatológica em pulmões, baço e fígado, com isolamento a partir destes órgãos, entretanto, os animais que sobreviveram à infecção mostraram apenas reação intradérmica para gp43. Eisele e colaboradores (2004), infectaram 6 cães adultos que apresentaram resposta imune humoral contra o antígeno gp43, detectado por ELISA.

A PCM-doença foi descrita em duas fêmeas da raça Doberman, uma na cidade de Mogi Guaçu, São Paulo (RICCI, 2004), e outra que nasceu na Argentina, mas se mudou para o Brasil, viajando pelos estados de Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná, onde ocorreu a manifestação dos sinais clínicos (FARIAS et al., 2011). Estas regiões são consideradas endêmicas para *P. brasiliensis*, e estes animais possuem hábito de escavar e farejar aumentando a exposição ao solo, possível habitat do fungo (RICCI, 2004; FARIAS et al., 2011).

Ono e colaboradores (2001), em estudo soropidemiológico com cães da Região Norte do estado do Paraná, obtiveram positividade de 14,8%, 48,8% e 89,5%, para gp43 com soros de animais provenientes de área urbana, periferia e rural, respectivamente. A infecção por *P. brasiliensis* em cães também foi relatada em animais da área rural de Botucatu (SP) por Fagundes e colaboradores (2002), com positividade de 35%, pelo teste de ELISA com exoantígeno de *P. brasiliensis*.

O estado do Paraná apresenta o maior número de casos de PCM do Sul do país (COUTINHO et al., 2002), e embora a doença tenha sido descrita há mais de cem anos, o nicho ecológico do *Paracoccidioides* não foi elucidado e, conseqüentemente, a forma da infecção não foi esclarecida. Acredita-se que o habitat do

Paracoccidioides seja o solo, contudo, há grande dificuldade em seu isolamento, levando os pesquisadores a procurarem novas estratégias para localização de seu nicho ecológico. Este estudo teve como objetivo identificar a presença de *Paracoccidioides* em amostras de solo de uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) do Norte do Paraná, por meio de técnicas imunológicas, moleculares e micológicas.

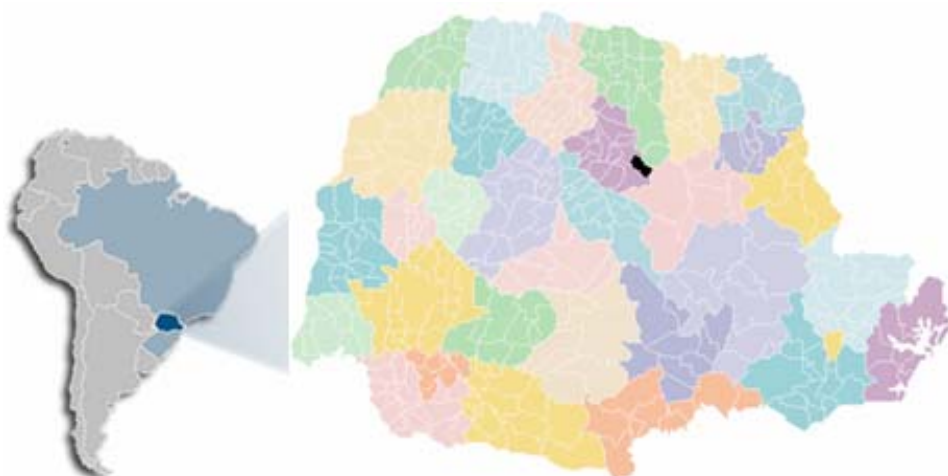
2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

A Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Monte Sinai, reconhecida pelo Instituto Ambiental do Paraná (portaria 162/07) está localizada no município de Mauá da Serra (Fig 3), estado do Paraná, BR-376 km 302, na Serra do Cadeado, divisão da Bacia do rio Ivaí e da Bacia do rio Tibagi, distante aproximadamente 316 Km da Capital Curitiba (IAP, 2013; PREFEITURA, 2013).

A RPPN Monte Sinai está inserida na Floresta Ombrófila Mista e Estacional Semidecidual, sua área é de 593,14 ha, dos quais cerca de 100 ha correspondem à mata nativa. O clima de Mauá da Serra é classificado como Subtropical Úmido Mesotérmico, sem estação de seca definida, com temperatura média de 22°C no verão e com média inferior a 18°C no inverno, tem precipitação média anual de 1400-1600 mm, com altitude entre 800 a 1.125 m acima do mar. (VELOSO et al., 1991; IAPAR, 2002).

Figura 3 – Mapa do estado do Paraná, com a cidade de Mauá da Serra destacada em azul escuro



Fonte: CIDADÃO, 2014

2.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SOLO

Foram coletadas 103 amostras de solo na RPPN Monte Sinai, com até oito cm de profundidade, próximo a lagos e rios, tocas de animais e vegetais em decomposição, no período de setembro a dezembro de 2012. O material coletado foi armazenado em potes plásticos estéreis com tampa.

As amostras de solo foram diluídas 1:10 (p:v) em solução salina 0,9 % com cloranfenicol (50 µg/mL) e agitadas por 5min/100rpm, seguido por 1min de repouso, o sobrenadante foi analisado por isolamento direto e indireto.

2.2.1 Isolamento Direto

No isolamento direto, 100µL do sobrenadante foram semeados em meio de cultura sabouraud dextrose com cloranfenicol (50µg/mL) em duplicata, incubados a 36 °C durante 30 dias. As colônias com morfologia semelhante a *Paracoccidioides* foram submetidas ao teste de *Nested* PCR e inoculadas em animais.

2.2.2 Inoculação em Animais

Para o isolamento indireto das amostras ambientais, ratos Wistar, machos com 4 meses de idade, foram inoculados com 1mL da suspensão de solo por via intraperitoneal. Os isolados com semelhança macro e/ou microscópicas ao *Paracoccidioides* foram inoculados (500µL em PBS pH 7,2) em triplicata, por via intraperitoneal em ratos Wistar ou Camundongos Swiss, todos machos.

Os animais foram acompanhados mensalmente por punção cardíaca para o teste de ELISA indireto, com a finalidade de detectar a produção de anticorpos contra *Paracoccidioides*.

Animais inoculados com os isolados foram eutanasiados três meses após a inoculação, enquanto que os animais inoculados com as amostras de solo foram acompanhados até seis meses após a inoculação. As amostras de soro dos animais positivos no ELISA indireto foram analisadas por imunodifusão radial dupla e os órgãos (baço, coração, fígado, pulmão e rins), foram coletados, para o exame histopatológico, tentativa de isolamento e *Nested* PCR.

2.2.3 ELISA Indireto

Para o teste de ELISA indireto, foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 poços com fundo chato, sensibilizadas com exoantígeno de *P. brasiliensis* (B-339) ou dos isolados das amostras de solo com morfologia semelhante a *Paracoccidioides* (21 e 22). Os soros foram diluídos 1:100 (v:v) em PBS leite 1%, e o conjugado foi utilizado em diferentes concentrações (Tabela 1). A solução de substrato cromógeno utilizada foi composta de H₂O₂/TMBZ, a interrupção da reação foi feita com Ácido Sulfúrico 4N, e a leitura da absorbância realizada a 450 nm em Leitora de ELISA (iMark™ Microplate Reader, BioRad). O soro dos animais foi considerado positivo quando apresentaram absorbância maior ou igual duas vezes ao controle negativo (*pool* de soros de animais jovens não imunizados).

Tabela 1- Concentração dos conjugados utilizados no ELISA indireto

Conjugado	Concentração (v:v)
Anti-IgY peroxidase Galinha (Sigma)	1:2000
Anti-IgG peroxidase Rato (Sigma)	1:4000
Anti-IgG peroxidase Cabra (Sigma)	1:15000
Anti-IgG peroxidase Humano (Sigma)	1:60000
Proteína A - peroxidase (Biorad), soro felino	1:2000

2.2.3.1 Exoantígeno

Os isolados 21, 22 e *P. brasiliensis* foram cultivados a 36°C em ágar sabourad dextrose e os exoantígenos produzidos de acordo com Camargo e colaboradores (1988), e quantificados pelo método de Bradford (1976).

2.2.3.2 Imunodifusão radial dupla

O teste de Imunodifusão Radial Dupla foi realizado conforme Camargo e colaboradores (1988), com exoatígeno do isolado B-339 de *P. brasiliensis* e dos isolados 21 e 22.

2.2.3.2 Exame histopatológico

Os fragmentos dos órgãos coletados foram fixados em formalina tamponada 10% durante 24h, desidratados, incluídos em parafina e corados pelo método de Grocott.

2.2.3.4 Isolamento

Os órgãos coletados dos animais inoculados com amostras de solo (positivos em ELISA) e com o isolado 22, foram semeados em ágar sabouraud dextrose, incubados em estufa a 36°C durante 30 dias, para observação dos aspectos morfológicos das colônias.

2.2.3.5 Extração de DNA

A extração de DNA de *Paracoccidioides* dos tecidos dos animais inoculados foi realizada conforme a metodologia descrita por Van Burik e colaboradores (1998), com algumas alterações, utilizando fenol, pérolas de vidro e RNase.

2.2.3.6 Primers

Foram utilizados na PCR os *primers* ITS-4 e ITS-5 (*Internal Transcribed Spacer*) desenhados por White (1990). Estes *primers* foram desenhados para produzir um fragmento de 634pb. Os *primers* específicos para *P. brasiliensis* Pb-ITS-E e Pb-ITS-R (Theodoro, 2005), foram utilizados na *Nested* PCR. Esta dupla de *primers* foram desenhados para produzir um fragmento de 387pb. Ambos os *primers* estão dispostos entre as regiões gênicas 18S e 28S, sendo PB-ITS-E e R internos ao ITS 4 e 5.

2.2.3.7 PCR e *Nested* PCR

As reações de PCR foram preparadas no Laboratório de Citogenética e Diversidade Vegetal, do departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina. As condições de reação foram de 94°C durante 2min, seguido de 35 ciclos a 94°C/30s, 60°C/30s, 72°C/40s, e o último passo a 72°C/10s. A segunda reação foi realizada com ciclos semelhantes, alterando apenas a temperatura de anelamento para 62°C/30s.

Para a reação de PCR foi utilizado 12,5µL de GoTaq® (Promega), 8µL de água ultrapura filtrada e autoclavada, 2,5µL de DNA, 1µL do *primer* reverso e 1µL do *primer* direto na concentração de 10ng/µL, totalizando um volume de 25µL. Para a *Nested* PCR, foram utilizados os mesmos volumes e reagentes. Para o controle positivo foi utilizado o isolado B-339, e como controle negativo água ultrapura filtrada e autoclavada. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%, utilizando

marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen), e o gel corado por imersão em solução de Brometo de Etídio por 5min.

A imagem foi analisada em exposição do gel em transiluminador ultravioleta, com captura de imagem pela câmera digital Olympus Camedia 5.1mp.

2.3.3.8 Sequenciamento pelo método Sanger

A reação do sequenciamento foi preparada no Laboratório de Citogenética e Diversidade Vegetal, do departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina. O produto da *Nested* PCR foi purificado com acetato de amônio. Para a reação de sequenciamento foi utilizado 2µL de *Big Dye* diluído 4 vezes em tampão *Big Dye*, 1µL de tampão *Big Dye*, 5,5µL de água ultrapura filtrada e autoclavada, 1µL *primer* M13 10pmol e, 1µL da amostra na concentração de 10ng/µL. As condições de reação foram de 95°C por 4min, seguido de 32 ciclos que oscilam entre 95°C por 45s, 50°C por 30s, 60°C por 2min.

Após a reação o material foi precipitado com EDTA / Etanol, ressuspenso em formamida Hi-di 10µL por poço, desnaturado a 95°C por 3min e, armazenado a 4°C. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático 3500xL (Applied Biosystem). A qualidade do sequenciamento foi testada pelo *software* Phred / Phrap / Consed, a análise foi realizada utilizando o programa BioEdit, (HALL, 1999), e sequência dos nucleotídeos obtidos foram comparadas com as já depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando como ferramenta de busca o BLAST.

2.2.3.9 Western blot

Inicialmente os exoantígenos das colônias e a gp43 purificada, foram separadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (gel de empilhamento 5% e gel de separação 10%). As bandas proteicas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com soro de humano positivo para *P. brasiliensis* e, posteriormente incubada com conjugado anti-IgG humano peroxidase (Sigma). A revelação das bandas na membrana foi realizada com solução de H₂O₂/DAB, e o desenvolvimento da cor foi interrompido com água destilada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TENTATIVA DE ISOLAMENTO INDIRETO

Os animais inoculados com as amostras de solo apresentaram positividade de 32% no ELISA indireto com exoantígeno de *P. brasiliensis*, em diferentes tempos após a inoculação (Tabela 2). A maioria das amostras positivas foi coletada em locais próximos a riachos e tocas de animais (Tabela 3), portanto, está de acordo com estudos epidemiológicos que sugerem que o nicho de *Paracoccidioides*, está relacionado com locais úmidos, próximos de lagos e rios, com verões chuvosos temperados ou quentes, invernos secos e áreas nativas (RESTREPO et al., 2001).

Bagagli e colaboradores (2003), compararam lugares onde tatus positivos e negativos foram identificados, sendo que os animais positivos foram encontrados com maior frequência em locais com presença de mata ciliar e reflorestamento de Eucalipto e Pinus, perto de fontes de água. A RPPN é cercada por reflorestamento de Eucalipto e Pinus, algumas amostras positivas foram coletadas nestes locais.

Tabela 2 - Período após inóculo em que o soro dos animais foi considerado positivo no teste de ELISA indireto

Mês	Total de animais	Percentual (%)
1	3	2,9
2	2	1,9
3	6	5,8
4	13	12,6
5	3	2,9
6	6	5,8
Total	33	32
Animais inoculados	103	100

Tabela 3 - Locais de coleta das amostras de solo, consideradas positivas em ELISA com soros de animais inoculados

Local	Número de amostras	Percentual (%)
Próximo ao riacho	13	39,4
Raiz de árvore	5	15,1
Tocas de animais	12	36,4
Tronco em decomposição	3	9,1
Total	33	100

O diagnóstico frequentemente utilizado para *P. brasiliensis* é baseado em testes sorológicos, entre eles, o teste de ELISA tem sido bastante utilizado, devido à alta sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez na execução. Este método vem sendo empregado em estudos epidemiológicos com humanos, cães, bovinos, aves, equinos, ovinos e felinos (CONTE-DIAZ et al., 1972; COSTA et al., 1995; ONO et al., 2001; BOTTEON et al., 2002; SILVEIRA et al., 2006 e 2008; CORTE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011 e 2012).

Neste estudo, o teste de ELISA foi realizado como método de triagem para identificar os animais possivelmente infectados com *P. brasiliensis*. Amostras dos 33 animais soropositivos, obtidas do baço, coração, fígado, pulmão e rins, foram coletadas, e analisadas por meio de exame histopatológico, imunodifusão, cultura e *Nested* PCR. Todas as amostras foram negativas no exame histopatológico, cultura e no teste de imunodifusão, porém, seis animais apresentaram positividade em diferentes órgãos quando analisados por *Nested* PCR, sendo que um animal apresentou positividade em dois órgãos (rim e pulmão), totalizando 7 amostras (Tabela 4; Fig 4).

As amostras positivas em *Nested* PCR apresentaram 99% de identidade no sequenciamento com *P. brasiliensis* T16B1, isolado por Arantes e colaboradores (2013), de baço de tatu *Dasypus novemcintus* (Anexo 1). As regiões distintas entre as amostras e o isolado T16B1 estão descritas na tabela 6, anexo 1.

A imunodifusão radial dupla é utilizada no diagnóstico da PCM em humanos, porém, apresenta uma sensibilidade menor que ELISA indireto. A falta de reatividade dos animais na imunodifusão, possivelmente se deve aos baixos níveis de anticorpos para o exoantígeno de *P. brasiliensis* (CORTE et al., 2012).

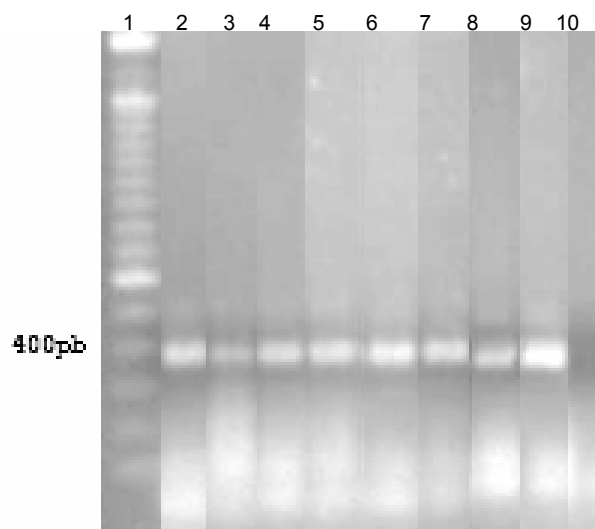
Os resultados negativos no exame histopatológico e no isolamento indireto sugerem que o fungo *P. brasiliensis* encontra-se em baixa concentração nas

amostras analisadas. A positividade na sorologia por ELISA sugere que esse método pode ser utilizado na triagem dos animais que apresentam a infecção por *P. brasiliensis* e, portanto, pode tornar menos exaustiva as futuras tentativas de isolamento do fungo por esse método.

Tabela 4 – Amostras positivas após *Nested* PCR, animais inoculados com amostras de solo

Órgãos	Número de Animais
Coração	3
Fígado	1
Pulmão	1
Rim	2
Total	7

Figura 4 – Amostras positivas após *Nested* PCR de animais inoculados com solo
 1) Marcador de peso molecular (100pb). 2) Fígado do animal 73. 3) Coração do animal 10. 4) Pulmão do animal 69. 5) Rim do animal 69. 6) Rim do animal 8. 7) Coração do animal 102. 8) Coração do animal 22. 9) Amostra positiva (B-339). 10) Amostra negativa (água). O fragmento amplificado com os *primers* Pb-ITS-E e R apresenta 387pb, nota-se que as bandas das amostras estão próximas ao peso molecular de 400pb, as amostras foram utilizadas na concentração de 35ng/ μ L e o controle positivo a 10ng/ μ L.



Para maior esclarecimento da doença, aspectos ecológicos e clínicos, estudos com infecção experimental vem sendo realizados, permitindo avaliar a interação parasita-hospedeiro, morfologia do fungo nos tecidos, resposta imune, progressão da doença e disseminação. Isolados de *P. brasiliensis* já foram obtidos de diferentes

órgãos. Em nosso estudo foi possível detectar por meio de PCR a infecção por *P. brasiliensis* em diferentes órgãos de animais inoculados (Tabela 4).

Mendes e colaboradores (1994), descreveram que a forma aguda da PCM acomete predominantemente o baço, fígado, nódulos linfáticos e medula óssea, já a forma crônica, em geral, apresenta manifestações pulmonares, com predominância de lesões de pele e mucosa, mas outros sistemas e órgãos podem ser acometidos, como o Sistema Nervoso Central e glândulas adrenais.

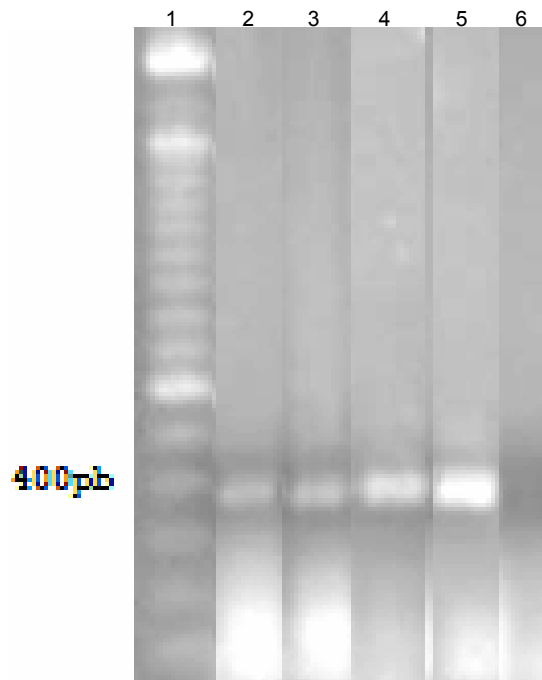
A infecção em pulmões, fígado, baço, linfonodos, cavidade peritoneal e coração foram descritas por Lacaz e colaboradores (1949), pela inoculação intravenosa e intraperitoneal de *P. brasiliensis* em camundongos. Negroni (1966) na Argentina, inoculou seis amostras de solo em cobaias e obteve um isolado de *P. brasiliensis*. Albornoz (1971) também obteve isolados de *P. brasiliensis* a partir da inoculação de camundongos com amostras de solo de uma plantação de café na Venezuela. Silva-Vergara e colaboradores (1998) analisaram setecentas e sessenta amostras de solo de plantação de café em Minas Gerais e obtiveram um único isolado de *P. brasiliensis*, também por isolamento indireto.

3.2 ISOLAMENTO DIRETO

Após a coleta, as amostras de solo foram diluídas e cultivadas em ágar sabouraud dextrose. Das cento e três amostras analisadas, quinze apresentaram colônias morfológicamente similares a *P. brasiliensis*. Destas apenas duas colônias (21 e 22) isoladas de amostras de solo provenientes de toca de tatu, foram positivas após *Nested* PCR (Fig. 5), sugerindo que estas duas colônias sejam novos isolados de *P. brasiliensis*.

Restrepo e colaboradores (2001), descreveram que o solo de tocas de tatu não é submetido a grandes variações de umidade, temperatura e outros fatores abióticos como ocorre na superfície, proporcionando assim um ambiente mais equilibrado para o crescimento de *P. brasiliensis*. Isto poderia explicar os vários isolados destes animais, e a identidade de 99% em PCR dos isolados 21 e 22 com o isolado T16B1 de Arantes e colaboradores (2013), obtido de baço de tatu (ANEXO 1). As regiões distintas entre as amostras e o isolado T16B1 estão descritas na tabela 6, anexo 1.

Figura 5 – Amostras do isolamento direto, positivas após *Nested* PCR. 1) Marcador de peso molecular (100pb). 2) Isolado 21. 3) Isolado 22. 4) Coração do animal 2, inoculado com o Isolado 22. 5) Controle positivo (B-339). 6) Controle negativo (água). O fragmento amplificado pelos *primers* Pb-ITS-E e R apresenta 387pb, nota-se que as bandas das amostras estão próximas ao peso molecular de 400pb, as amostras foram utilizadas na concentração de 35ng/μL e o controle positivo a 10ng/μL



Os isolados 21 e 22 foram obtidos de amostras de solo em locais próximos, sugerindo que *P. brasiliensis* pode estar amplamente distribuído nesta área de estudo. Poucos isolados foram obtidos com o método de cultivo direto, se comparados com os seis animais inoculados com solo, positivos em *Nested* PCR, dificuldade que pode ser explicada pelas interferências enfrentadas no isolamento direto.

A cultura é um ótimo método para obtenção de isolados clínicos, mas quando aplicada para amostras ambientais apresenta uma série de dificuldades. O fungo *P. brasiliensis* tem crescimento lento e grande demanda nutricional, sofre interferências de outros microrganismos, alterações climáticas também podem influenciar (menor esporulação), e a profundidade da coleta de amostras de solo também pode interferir no isolamento (ARANTES et al., 2013).

A dificuldade em obter isolados de *Paracoccidioides* de amostras de solo pode ser observada nos trabalhos de Mendelovici e colaboradores (1974), que analisaram quarenta e cinco amostras na Venezuela, e Montenegro e colaboradores (1996), que analisaram oitocentas e oitenta e sete amostras de solo Botucatu (SP) e não obtiveram sucesso no isolamento direto. Tal dificuldade também foi mencionada no trabalho de Silva-Vergara e colaboradores (1998), que analisaram setecentas e sessenta amostras de solo em Minas Gerais, e obtiveram um único isolado de *P. brasiliensis* por meio de isolamento indireto.

A técnica de *Nested* PCR vem ganhando espaço na detecção de *Paracoccidioides* em amostras de solo. Devido à sensibilidade e especificidade, esta é empregada como estratégia confiável para detectar e identificar os microrganismos incultiváveis. Sua principal vantagem é a possibilidade de correlacionar os dados obtidos com isolados de animais e de pacientes já descritos, além da identificação da espécie de *Paracoccidioides* (THEODORO et al., 2005; BAGAGLI et al., 2010 e 2011).

Arantes e colaboradores (2013), trabalharam com seis amostras de aerossóis coletadas em toca de tatu, quando estas amostras foram analisadas por *Nested* PCR, cinco foram consideradas positivas, porém, nenhuma amostra apresentou positividade no isolamento direto e técnica de extinção, provavelmente devido ao crescimento e competição de microrganismos saprófitos.

Theodoro e colaboradores (2005), semearam isolados de *P. brasiliensis* em amostras de solo estéreis e não estéreis (cultura fase micelial), e trabalharam com mais quatro amostras ambientais coletadas em tocas de tatu na cidade de Botucatu (SP). Três amostras ambientais e todas as semeadas foram positivas após *Nested* PCR, enquanto o crescimento do fungo somente foi observado em solo estéril, concluindo que a competição entre microrganismos inibe o isolamento.

Microscopicamente, os isolados 21 e 22 não apresentam características semelhantes ao *P. brasiliensis*. O isolado 21 apresenta forma filamentosa a 35°C e, as células do isolado 22 não apresentam múltiplos brotamentos e têm tamanho menor quando comparadas com células de *P. brasiliensis* B-339. Entretanto, as células do isolado 22 apresentam birrefringência e, são arredondadas (característica de *P. brasiliensis*) (Fig. 6) (CAMPOS, 2011). Brummer e colaboradores (1993), descrevem que *P. brasiliensis* na forma de levedura apresenta aspecto seco ou ligeiramente cremoso, com coloração clara (branco a creme), e metabolismo ativo.

Os isolados 21 e 22 apresentam coloração creme, aspecto ligeiramente cremoso e, forma cerebriforme (Fig. 7).

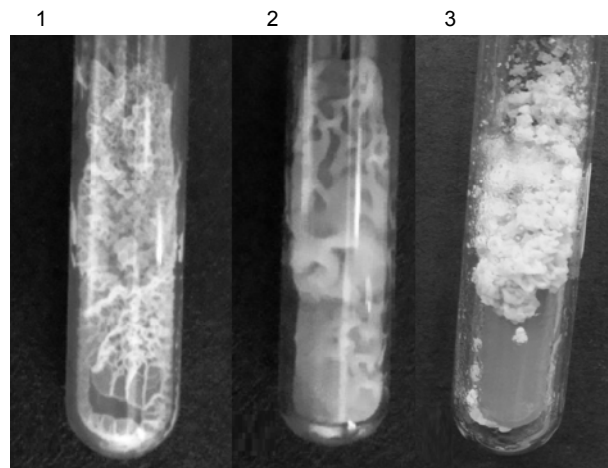
Figura 6 – Aspecto microscópico dos isolados 21 e 22.

1) Isolado 22. 2) Isolado 21. 3) *P. brasiliensis* (B-339). Aumento de 1000x. As células do isolado 22 são arredondadas, mas são menores quando comparadas com células do isolado B-339 e, não apresentam múltiplos brotamentos. O isolado 21 não apresenta característica de *P. brasiliensis*, pois apresenta forma filamentosa a 35°C. As células de cada isolado estão indicadas por setas



Figura 7 – Aspecto macroscópico dos isolados 21 e 22.

1) Isolado 22. 2) Isolado 21. 3) *Paracoccidioides brasiliensis* (B-339). Observa-se que os Isolados 21 e 22 apresentam forma cerebriforme

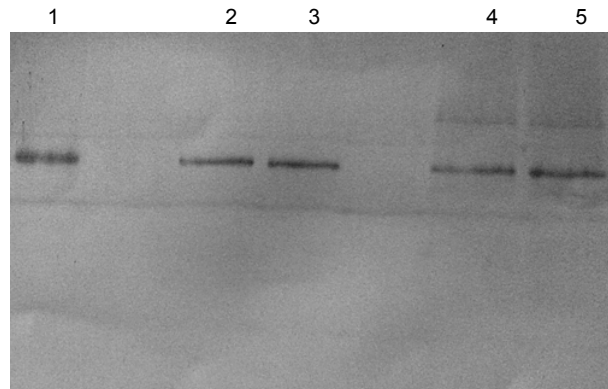


Para avaliar se os isolados 21 e 22 expressam o antígeno gp43, exoantígenos desses isolados foram analisados por *Western blot*, utilizando como controle a gp43 de *P. brasiliensis* purificada. Os dois isolados 21 e 22, apresentaram a banda de 43kDa (Fig 8).

A glicoproteína de 43kDa é um antígeno exocelular de *P. brasiliensis* tanto na forma filamentosa e leviduriforme, é secretada durante a fase de infecção, expressa em todas as formas clínicas da PCM, reconhecida em vários testes

sorológicos e, por isso é considerada o principal antígeno em circulação (MARQUES et al., 2003; PALMEIRO et al., 2005).

Figura 8 – *Western blot* realizado com exoantígeno dos isolados 21 e 22.
1) Gp 43 de *P. brasiliensis* (B-339). 2,3) Exoantígeno do isolado 21. 4,5) Exoantígeno do isolado 22. Ambos os isolados apresentaram a banda de 43kDa em reação com soro humano positivo para PCM



A fim de identificar se animais positivos para PCM apresentam anticorpos para o exoantígenos dos isolados 21 e 22, foi realizado o teste de ELISA indireto. O exoantígeno do isolado 22 apresentou positividade com diversos soros, enquanto o exoantígeno do isolado 21 apresentou positividade para o soro humano e de rato (Tabela 5).

Tabela 5 – Soro de animais positivos para exoantígeno B- 339, analisados por ELISA indireto com exoantígeno dos isolados 21 e 22

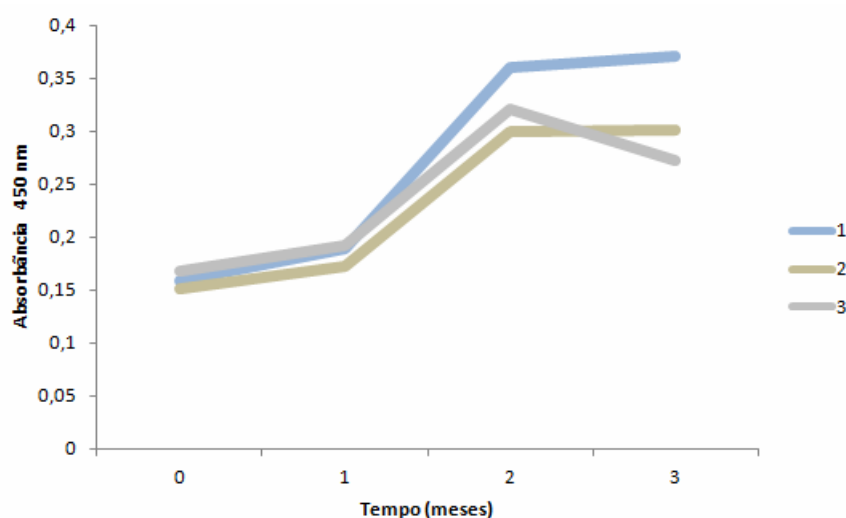
Soros	B 339	22	21
Ovino	+	+	x
Humano	+	+	+
Bovino	+	+	x
Rato	+	+	+
Felino	+	+	-
Galinha	+	+	-

OBS: (x) teste não realizado.

Com o intuito de avaliar se os isolados 21 e 22 são patogênicos, foram inoculadas suspensões em triplicata em camundongos ou ratos e, a resposta humoral foi analisada por ELISA indireto durante três meses. Os soros dos três ratos

inoculados com o isolado 22 apresentaram positividade para exoantígeno de *P. brasiliensis* (Fig. 9), porém, os camundongos inoculados com o isolado 21 não apresentaram reatividade.

Figura 9 – Concentração de anticorpos do soro de ratos inoculados com o isolado 22 para exoantígeno de *P. brasiliensis*. Após o inóculo foi observado o aumento da concentração de anticorpos nos três animais



Todos os animais inoculados com os isolados 21 e 22 foram negativos no exame histopatológico, embora o coração de um dos animais inoculados com o isolado 22 tenha apresentado positividade após *Nested* PCR (Fig. 5), sugerindo que o animal apresentava PCM-doença em estágio inicial. O sequenciamento da amostra (coração) apresentou 99% de identidade com o isolado de *P. brasiliensis* T16B1 (Anexo 1). As regiões distintas entre a amostra e o isolado T16B1 estão descritas na tabela 6, anexo 1.

A cultura de fragmentos dos órgãos dos animais inoculados com isolados 21 e 22 não apresentou crescimento de colônias semelhantes ao *Paracoccidioides*. A técnica de isolamento indireto de *P. brasiliensis*, ou seja, por meio da inoculação de animais como rato, aparentemente não é uma técnica sensível. No estudo de Silva-Vergara e colaboradores (1998), um único isolado de *P. brasiliensis* foi obtido por meio dessa técnica, embora os autores tenham analisado setecentos e sessenta amostras de solo. É bastante provável que mais amostras de solo fossem positivas,

porém, é possível que o sistema imunológico dos animais tenha eliminado as células de *P. brasiliensis* presentes no inóculo e apenas a amostra que continha concentração mais elevada de células fúngicas foi detectada.

Em nosso estudo, o fato de não ter sido possível cultivar os isolados 21 e 22 a partir dos órgãos dos animais inoculados com os mesmos, reforça que o método de isolamento indireto não é sensível para a detecção de *P. brasiliensis* em amostras ambientais. Outra possibilidade é que os isolados 21 e 22 apresentem baixa virulência para ratos e camundongos.

Apesar desses isolados serem reconhecidos em testes imunológicos para PCM e apresentarem característica morfológica, proteína de 43kDa em reação com soro de paciente positivo, positividade em PCR, e semelhança de 99% com o isolado T16B1, eles não apresentam características microscópicas de *P. brasiliensis*, impossibilitando a confirmação como novos isolados, sugerindo a possibilidade de isolados microscopicamente distintos ou uma espécie filogeneticamente próxima. Considerando esta última hipótese, os *primers* utilizados não seriam específicos para *P. brasiliensis*.

Theodoro e colaboradores (2005) e Arantes e colaboradores (2013), relataram boa eficiência na utilização dos *primers* Pb-ITS-E e R em seus experimentos. Esta dupla de *primers* favorece a detecção da sequências alvos, pois a região amplificada apresenta mais de cem cópias por genoma (THEODORO et al., 2005).

Os *primers* Pb-ITS-E e R utilizados foram desenhados por Theodoro e colaboradores (2005), a partir da região ribossômica. Estes *primers* apresentaram polimorfismo para *Histoplasma capsulatum*, mas semelhança para *Blastomyces dermatitidis* e *Emmonsia* spp.. Esta semelhança pode ser explicada pelo *primer* incluir a região 5.8S bem conservada na família Onygenaceae (atualmente Ajellomycetaceae), entretanto, *B. dermatitidis* ocorre exclusivamente na América do Norte (THEODORO et al., 2005). O resultado do sequenciamento dos isolados 21 e 22 apresentou 88% de similaridade com o isolado 351 (*P. lutzzi*) e *Emmonsia* (acesso EF592156, Blast no banco NCBI).

Novos testes serão realizados para a confirmação dos isolados 21 e 22 como *Paracoccidioides*, e novas tentativas de isolamento serão realizadas nos mesmos locais da RPPN que apresentaram positividade em *Nested* PCR, pois até o presente os isolamentos de *P. brasiliensis* de amostras de solo não tem apresentado reprodutibilidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, há poucos estudos bem sucedidos de isolamento de *P. brasiliensis* a partir de amostras de solo, o provável habitat do fungo. A dificuldade possivelmente se deve a vários fatores, como a presença do fungo em baixas concentrações no ambiente, o antagonismo de microrganismos do solo, a presença de substâncias inibitórias do crescimento fúngico, como defensivos agrícolas e à baixa sensibilidade do isolamento indireto, que é o método mais utilizado nas tentativas de isolamento.

Foram identificados sete pontos positivos em PCR para *P. brasiliensis* na RPPN Monte Sinai, seis a partir dos órgãos dos animais inoculados com solo, além dos dois isolados obtidos de amostras de solo provenientes de tocas de tatu, destacando que o isolado 22, foi obtido do mesmo ponto do inóculo de um animal positivo. Os isolados 21 e 22 não foram confirmados como novos isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, devido à diferença microscópica.

A maior parte das amostras positivas foi coletada em locais próximos a riachos ou em tocas de animais, reforçando os achados anteriores de estudos sobre a eco-epidemiologia da PCM.

REFERÊNCIAS

ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouradia*, v. 9, p. 248-253, 1971.

ARANTES, T. D.; et al.. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. *Medical Mycology*, v. 51, p. 83-92. 2013.

BAGAGLI, E.; et al.. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 58, n. 4, p.:505-512, 1998.

BAGAGLI, E.; et al.. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasyus novemcinctus*): an ecological study. *Medical Mycology*, v.4, n. 3, p. 217-223, 2003.

BAGAGLI, E.; et al.. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infection Genetics and Evolution*, v.6, n. 5, p. 44-51. 2006.

BAGAGLI, E.; MARQUES, S. A. *Micologia médica molecular: Impacto na epidemiologia e ecologia dos fungos*. *Compêndio de Micologia Médica*. 2 ed. Guanabara Koogan, v.2. p.123-137. 2010.

BAGAGLI, E.; et al.. *Paracoccidioides* (chapter 40) In: *Molecular detection of human fungal pathogens* ed.Sydney. CRC Press. v.1. p.311-322. 2011

BOTTEON, F. A.; et al.. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors. *Medical Mycology*, v. 40, n. 4, p. 387-391, 2002.

BRADFORD, M. A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, n.72, p. 248-254. 1976.

BRUMMER, E.; CASTENEDA, E.; RESTERPO, A. *Paracoccidioidomycosis: an update*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.

CAMARGO, Z. P.; et al.. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion test. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 26, n. 10, p. 2147-2151, 1988

CAMPOS, M. V. S. Estudo de pacientes com paracoccidioidomicose e a co-infecção paracoccidioidomicose HIV/AIDS, assistidos no Hospital Universitário de Brasília

entre 1984 e 2005. f.136. 2011 Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Faculdade de Medicina, Núcleo de Medicina Tropical – Universidade de Brasília. Brasília. .

CIDADÃO Parana. Invista no Paraná. Disponível em:
<http://www.cidadao.pr.gov.br/modules/catasg/catalogo.php?servico=384&id=e>.
 Acessoem: 09 fev. 2014.

CONTI-DIAS, I. A.; et al.. Intra-dermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.14, p. 372-376, 1972.

CORREDOR, G. G.; et al.. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. Revista Iberoamericana de Micologia, n. 16, p. 216-220, 1999.

CORREDOR, G. G.; et al.. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. Medical Mycology, v.43, n. 3, p. 275-80, 2005.

CORTE, E. N.; et al.. Detecção de anticorpos para *Paracoccidioides brasiliensis* em cavalos da região norte do Estado do Paraná. Ciências Agrárias, v.30, n. 2, p.431-436, 2009.

CORTE, A. C.; et al.. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Western Brazilian Amazon. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.32, n.7, p. 649-652. 2012.

COSTA, E. O.; et al.. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. Journal of Medical and Veterinary Mycology. v. 33, p. 39-42, 1995.

COUTINHO, Z.T.; et al.. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). Cadernos de Saúde Pública, v. 18, n 5, p. 1441-1453, 2002.

EISELE, R.C.; et al.. Immune response in dogs experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. Medical Mycology, v.42, n.6, p. 549-553, 2004.

FAGUNDES, R. Q. Pesquisa da paracoccidioidomicose em cães (*canis familiaris*) na região endêmica de Botucatu, São Paulo. f. 75. 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. Unesp, Universidade Estadual Paulista. Botucatu (SP).

FARIAS, M. R.; et al.. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. Micopathologia, v. 172, n 2, p. 147-152, 2011.

FRANCO, M.; et al.. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Medical Mycology*, v.38, p.185-91. 2000.

GARCIA, N. M.; et al.. *Paracoccidioides brasiliensis*: a new strain isolated from a fecal matter of penguin. *Medicina Tropical do Instituto de São Paulo*, v. 35, p.227-235, 1993.

GUTIERREZ, A. H.; et al.. Encuesta sobre tuberculosos, histoplamosis y paracoccidioidomicosis em ganado lechero Del Valle Del Aburra. *Antiquina Medica*, v. 24, p. 339-358, 1974.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, v.41, p.95-98, 1999.

IAP- Instituto Ambiental do Paraná. Reservas Particulares do Patrimônio Estadual.. Disponível em:
<http://www.iap.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1260>. Acesso em: 28 abr. 2013.

IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná. Cartas climáticas básicas do Estado do Paraná. Curitiba, 2002.

LACAZ, C. S. et al.. Blastomicose experimental. *O Hospital*, v.35, n3, p. 341-349. 1949.

MATUTE, D. R.; et al.. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular Biology and Evolution*, v.23. n. 1. p.65-73. 2006.

MARQUES da Silva, S.H; et al.. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 8, p. 3675-3680, 2003.

MENDELOVICI, K.. SALFELDER, E.; ROMAN, A. R. Intento de aislamiento del *Paracoccidioides brasiliensis* del suelo. *Mycopathologia at Mycologia Applicata*, v.52. p. 45-. 53, 1974.

MENDES, R. P. The gamut of clinical manifestations. In: Franco, M.; et al.. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press. p. 233-58. 1994.

MONTENEGRO, M. R.; et al.. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, SP, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v. 11. p. 665–670. 1996.

NAIFF, R. D.; et al.. Paracoccidioidomicose enzootica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. Revista do Instituto Médico Tropical, São Paulo. v. 28, p.19–27, 1986.

NCBI. BLAST. Disponível em:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. Acesso: 15 jan. 2014.

NEGRONI, P. E. I. *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente em El suelo Argentino. Prensa Medica Argentina, v. 53, p. 2831-2832, 1966.

OLIVEIRA, G. G.; et al.. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. Mycopathologia, v. 171, n. 3, p 197-202, set. 2011.

OLIVEIRA, G. G. et al.. Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. Mycopathologia, v.173, p. 63-69, 2012.

ONO, M. A.; et al.. Canine paracoccidioidomycosis: A seroepidemiologic study. Medical Mycology, v. 39, n. 3, p. 277-282, 2001.

ONO, M. A.; et al.. Inhibition of *Paracoccidioides* by pesticides: Is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? Medical Mycology, v.40, n. 5, p. 493-499, 2002.

ONO, M. A.; et al.. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. Medical Mycology, v. 41, n. 3, p. 265-268, 2003.

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; TURGEL, L. S.. Paracoccidioidomicose – revisão da literatura. Scientia Medic, v. 15, n. 4, p. 274-278, 2005.

PEREIRA, B. V. R.; et al.. Detecção de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasypus novemcinctus*) provenientes de uma reserva de Cerrado do Instituto Lauro de Souza (Bauru, SP). Boletim Epidemiológico Paulista, n. 56, v. 5, 2008.

PEREIRA, H. R. J.; JORGE, W.; BAGAGLI, E.; Por que tatu ?. Ciência Hoje, n. 71, 2003.

PEREIRA, M.; VIANNA G. O. A propósito de um caso de blastomycose (Piohemia blastomycótica). Arquivos Brasileiros de Medicina, v. 1, p. 63-83, 1911.

PREFEITURA Municipal de Mauá da Serra. Dados Gerais. Disponível em:

http://www.mauadaserra.pr.gov.br/index.php?id=dados_gerais. Acesso em: 28 abr. 2013.

PURTILO, D. T.; et al.. The immune system of the nine-banded armadillo (*Dasyus novemcinctus* Linn). The Anatomical Record, v.181, n. 4, p. 725-734. 1975.

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

RESTERPO, A.; McEWEN J. G.; CASTANÄ EDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? Medical Mycology. Colômbia. v. 39, n. 3, p. 233-241, 2001.

RICCI, G. Canine paracoccidioidomycosis. Medical Mycologi.Oxford, v.42, n. 4, p. 379-383, 2004.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Consenso em paracoccidioidomicose. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SHOME, S. K.; BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* In the soil of Recife (Brazil). Revista da Faculdade de Medicina da Universidade do Ceará. v. 3, p. 90 – 94, 1963

SILVA-VERGARA, M. L.; et al.. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais . Medical Mycology, v. 36, p. 37-42, 1998.

SILVA-VERGARA, M. L. et al.. The marsupial *Didelphis albiventris* is an improbable host of *Paracoccidioides brasiliensis* in endemic area of paracoccidioidomycosis in Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 96, p. 771-772, 2001.

SILVEIRA, L. H.; et al.. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. Mycopathologia, v. 162, n. 5, p. 325-329, jul. 2006.

SILVEIRA, L. H.; et al.. Ocurrência de anticorpos to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. Mycopathologia, v. 165, p.367-371, 2008.

TERÇARIOLI, G. R.; et al.. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. BMC Microbiology, v. 7, n. 92, p. 1-8, 2007.

THEODORO, R.C. et al.. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. Mediacal Mycology, v. 43, p 725 – 729, 2005.

THEODORO, R. C.; et al.. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographical Aspects. Plos One, v. 7, n. 5, p. 1-15, 2012.

UNTEREINER, W. A.; et al.. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. Mycologia, v. 94, n. 4, p. 812-821, 2004.

VAN BURIK J. A. H.; et al.. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. Medical Mycology, v. 36, n. 5, p. 299- 303, 1998.

VELOSO, H.P.; RANGEL-FILHO, A. L. R. R; LIMA, J. C. A. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/IBGE, 1991.

WHITE T. J.; et al.. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, p. 315 – 322, 1990.

ANEXOS

ANEXO A

Sequência das amostras positivas após *Nested* PCR

Todas as amostras positivas após *Nested* PCR apresentaram semelhança de 99% para o isolado T16B1 de *Paracoccidioides brasiliensis*, descrito por Arantes (2013). As regiões sublinhadas em cinza correspondem aos *primers*. As sequências foram comparadas no banco de dados do NCBI, utilizando como ferramenta de busca o BLAST.

```
>Paracoccidioides brasiliensis B-339
1.....|.....|.....|.....|.....50
TAGGGTGTTCGATCGAGAGAGGACACCTTTTTCCCCCGCCGGGGTTCGAT
GAGTGGGGCCGGAGTCGGCCGGGCCTCTGAGAGCGTGTGACGAAGCCCCA
TACGCTCGGGCACCGAACGCGACGCCGCCGCTGCATTTTCGGGCACGTCC
ACGGGGGGACCGGGCCCAACACGCAAGCCGCGCTTGAGGGTTGAAATGA
CGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTC
AAAGATTTCGATGATTACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATT
TCGCTGCGTTCTTCATCGATGTCGGAACCAAGAGATCCCGTTGTTGAAA
GTTTTTACTGATTATGATAGGTCTCAGACGTCAAAGCTC
.....|.....|.....|.....389
```

```
>Isolado 21
1.....|.....|.....|.....|.....50
TAGGGTGTTCGATCGAGAGAGGACACCTTTTTCCCCCGCCGGGGATCGA
TGAGTGGGGCCGGAGTCGGCCGGGCCTCTGAGAGCGTGTGACGAAGCCCC
ATACGCTCGGGCACCGAACGCGACGCCGCCGCTGCATTTTCGGGCACGTTC
CACGGGGGGACCGGGCCCAACACGCAAGCCGCGCTTGAGGGTTGAAATG
ACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTC
CAAAGATTTCGATGATTACGGAATTCTGCAATNCACATTACTTATCGCAT
TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGTCGGAACCAAGAGATCCCGTTGTTGAAAG
TTTTTACTGATTATGATAGGTCTCAGACGTCAAAGCTC
.....|.....|.....|.....388
```

Tabela 1 - Descrição dos alinhamentos significativos

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
704	704	99%	0.0	99%	JQ675762.1
704	704	99%	0.0	99%	JF289270.1
704	704	99%	0.0	99%	AB304414.1
704	704	99%	0.0	99%	AB304415.1
704	704	99%	0.0	99%	AB304416.1

>Rim do animal 69

```

1.....|.....|.....|.....|.....50
TAGGGTGTTCGATCGAGAGAGGACACCTTTTTCCCCCGCCGGGGTTCGAT
GAGTGGGGCCGGAGTCGGCCGGGCCTCTGAGAGCGTGTGACGAAGCCCCA
TACGCTCGGGCACCGGAACGCGACGCCGCCGCTGCATTTTCGGGCACGTCC
ACGGGGGGACCGGGCCCAACACGCAAGCCGCGCTTGAGGGTTGAAATGA
CGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTC
AAAGATTTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATT
TCGCTGCGTTCTTCATCGATGTCGGAACCAAGAGATACCGTTGTTGAAAG
TTTTTACTGATTATGATAGGTCTCAACNTCAAAGCTC
.....|.....|.....|.....387

```

Tabela 2 - Descrição dos alinhamentos significativos

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
699	699	99%	0.0	99%	JQ675762.1
699	699	99%	0.0	99%	JF289270.1
699	699	99%	0.0	99%	AB304414.1
699	699	99%	0.0	99%	AB304415.1
699	699	99%	0.0	99%	AB304416.1

>Isolado 22

```

1.....|.....|.....|.....|.....50
TAGGGTGTTCGATCGAGAGAGGACACCTTTTTCCCCCGCCGGGGAACGA
TGAGTGGGGCCGGAGTCGGCCGGGCCTCTGAGAGCGTGTGACGAAGCCCC
ATACGCTCGGGCACCGGAACGCGACGCCGCCGCTGCATTTTCGGGCACGTTC
CACGGGGGGACCGGGCCCAACACGCAAGCCGCGCTTGAGGGTTGAAATG
ACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTC
CAAAGATTTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAT
TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGTCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG
TTTTTACTGATTATGATAGGTCTCAGACGTCAAAGCTC
.....|.....|.....|.....388

```

>Coração do animal 22

```

1.....|.....|.....|.....|.....50
TAGGGTGTTCGATCGAGAGAGGACACCTTTTTCCCCCGCCGGGGTTCGAT
GAGTGGGGCCGGAGTCGGCCGGGCCTCTGAGAGCGTGTGACGAAGCCCCA
TACGCTCGGGCACCGGAACGCGACGCCGCCGCTGCATTTTCGGGCACGTCC
ACGGGGGGACCGGGCCCAACACGCAAGCCGCGCTTGAGGGTTGAAATGA
CGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTC
AAAGATTTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATT
TCGCTGCGTTCTTCATCGATGTCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAT
TTTATACTGATTATGATAAGTCTCAGACGTCAAAGCTC
.....|.....|.....|.....388

```

Tabela 3 - Descrição dos alinhamentos significativos

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
702	708	99%	0.0	99%	JQ675762.1
702	708	99%	0.0	99%	JF289270.1
702	708	99%	0.0	99%	AB304414.1
702	708	99%	0.0	99%	AB304415.1
702	708	99%	0.0	99%	AB304416.1

>Coração do animal 2, inoculado com o isolado 22

1.....|.....|.....|.....|.....50
 TAGGGTGTGATCGAGAGAGGACACCTTTTTCCCCCCCCGCCGGGGTTCGAT
 GAGTGGGGCCGGAGTCGGCCGGGCCTCTGAGAGCGTGTGACGAAGCCCC
 ATACGCTCGGGCACCAGAACCGCGACGCCGCCGCTGCATTTCCGGGCACGTC
 CACGGGGGGACGCGGGCCCAACACGCAAGCCGCGCTTGAGGGTTGAAATG
 ACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTT
 CAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACATTACTTTATCGCAT
 TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGTCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG
 TTTTACTGATTATGATAGGTCTCAGACGTCAAAGCTC
|.....|.....|.....388

>Coração do animal 10

1.....|.....|.....|.....|.....50
 TAGGGTGTGATCGAGAGAGGACACCTTTTTCCCCCCCCGCCGGGGTTCGAT
 GAGTGGGGCCGGAGTCGGCCGGGCCTCTGAGAGCGTGTGACGAAGCCCCA
 TACGCTCGGGCACCAGAACCGCGACGCCGCCGCTGCATTTCCGGGCACGTCC
 ACGGGGGGACGCGGGCCCAACACGCAAGCCGCGCTTGAGGGTTGAAATGA
 CGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTC
 AAAGATACGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACATTACTTTATCGCATT
 TCGCTGCGTTCTTCATCGATGTCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGT
 TTTTACTGATTATGATAGGTCTCAGACGTCAAAGCTC
|.....|.....|.....387

>Coração do animal 102

1.....|.....|.....|.....|.....50
 TAGGGTGTGATCGAGAGAGGACACCTTTTTCCCCCCCCGCCGGGGTTCGAT
 GAGTGGGGCCGGAGTCGGCCGGGCCTCTGAGAGCGTGTGACGAAGCCCCA
 TACGCTCGGGCACCAGAACCGCGACGCCGCCGCTGCATTTCCGGGCACGTCC
 ACGGGGGGACGCGGGCCCAACACGCAAGCCGCGCTTGAGGGTTGAAATGA
 CGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTC
 AAAGATTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACATTACTTTATCGCATT
 TCGCTGCGTTCTTCATCGATGTCGGAACGCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG
 TTTTACTGATTATGATAGGTCTCAGACGTCAAAGCTC
|.....|.....|.....388

>Pulmão do animal 69

1.....|.....|.....|.....|.....50
 TAGGGTGTGATCGAGAGAGGACACCTTTTTCCCCCCCCGCCGGGGTTCGAT
 GAGTGGGGCCGGAGTCGGCCGGGCCTCTGAGAGCGTGTGACGAAGCCCCA
 TACGCTCGGGCACCAGAACCGCGACGCCGCCGCTGCATTTCCGGGCACGTCC
 ACGGGGGGACGCGGGCCCAACACGCAAGCCGCGCTTGAGGGTTGAAATGA
 CGCTCGGACAGGCATGCCACCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTC
 CAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACATTACTTTATCGCAT
 TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGTCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG
 TTTTACTGATTATGATAGGTCTCAGACNTCAAANCTC
|.....|.....|.....388

>Rim do animal 8

1.....|.....|.....|.....|.....50
 TAGGGTGTGATCGAGAGAGGACACCTTTTTCCCCCCCCGCCGGGGTTCGAT
 GAGTGGGGCCGGAGTCGGCCGGGCCTCTGAGAGCGTGTGACGAAGCCCC
 ATACGCTCGGGCACCAGAACCGCGACGCCGCCGCTGCATTTCCGGGCACGTC
 CACGGGGGGACGCGGGCCCAACACGCAAGCCGCGCTTGAGGGTTGAAATG
 ACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTC
 CAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACATTACTTTATCGCAT
 TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGTCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG
 TTTTACTGATTATGATAGGTCTCAGACGTCAAAGCTC
|.....|.....|.....388

Tabela 4 - Descrição dos alinhamentos significativos

Pares de base	Amostras
163	Rim do animal 69
184-185	Coração do animal 22
201-202	Rim do animal 69
189-190	Coração do animal 22
203-204	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (B-339)
206-207	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (B-339)
281	Coração do animal 10
319-320	Pulmão do animal 69
471-472	Rim do animal 8
483-484	Coração do animal 2 inoculado com isolado 22
490-491	Isolado 21
491-492	Isolado 22