

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

**EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DOS MECANISMOS DE
ADESÃO E INVASÃO CELULAR NA PATOGENICIDADE DO
*Paracoccidioides brasiliensis***

Márcia Akemi Uemura

Este exemplar corresponde à redação final
da tese de Mestrado em Microbiologia e Imunologia
de Márcia Akemi Uemura
e aprovada pelo Conselho Deliberador.

10/10/96 *Cláudia Colletto Pini*

Tese apresentada ao Departamento
de Microbiologia e Imunologia do
Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas na área de
Microbiologia

Campinas, 1996

Ue5e

31867/BC

**EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DOS MECANISMOS DE
ADESÃO E INVASÃO CELULAR NA PATOGENICIDADE DO
*Paracoccidioides brasiliensis***

Márcia Akemi Uemura

Tese apresentada ao Departamento
de Microbiologia e Imunologia do
Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas na área de
Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci
Depto. Microbiologia e Imunologia
IB/UNICAMP

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes-Giannini
Depto. Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP/Araraquara



5719029

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	7/Unicamp
	Ue5e
V.	Ex.
TOMBO BC/	31.867
PROD	281/57
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/10/97
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00102075-5

Ue5e Uemura, Márcia Akemi
Evidências da participação dos mecanismos de adesão e invasão celular na patogenicidade do *Paracoccidioides brasiliensis* / Márcia Akemi Uemura. - - Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientadores: Lucila Costallat Ricci, Maria José Soares Mendes-Giannini.

1. Paracoccidioides brasiliensis.* 2. Paracoccidioidomicose.* 3. Parasitismo.* 4. Celulas epiteliais.* 5. Microscopia eletrônica.. I. Ricci, Lucila Costallat. II. Mendes-Giannini, Maria José Soares. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 10 de Outubro de 1996.

BANCA EXAMINADORA:

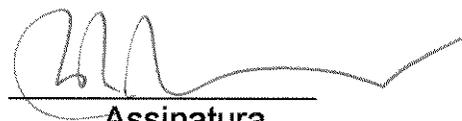
TITULARES:

Profa. Dra. LUCILA COSTALLAT RICCI (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. MÁRIO RUBENS MONTENEGRO



Assinatura

Prof. Dr. VALDEREZ GAMBALE



Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. ANTONIO FERNANDO PESTANA DE CASTRO

Assinatura

Dedico

*aos meus pais, Kenji e Sumaco, pela
garra, dedicação, apoio e infinito
amor. À minha irmã, Hary, pela
amizade e amor ilimitados.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci, cuja alegria e otimismo me ampararam no decorrer desses anos, pela orientação, incentivo e apoio para a minha formação científica, principalmente, por sua amizade e carinho.

À Dra. Maria José Soares Mendes-Giannini, pela co-orientação, incentivo e carinho.

Ao Prof. Dr. Mário Rubens Montenegro, pela participação na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Valderéz Gambale, pela participação na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, pelas sugestões, ensinamentos e participação como membro da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, pela sua valiosa colaboração para a realização deste trabalho, por sua preocupação e dedicação na formação científica e pessoal dos alunos.

À Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, admirável por sua dedicação, senso profissional e humanitário, me ensinou e apoiou durante esses anos.

À Profa. Dra. Clarice Weis Arns e Profa. Dra. Wirla Maria Tamashiro, pela colaboração como membros da banca de qualificação, pelo apoio e amizade.

Aos Prof. Dr. Tomomasa Yano, Dr. Domingos da Silva Leite, Dra. Marlene Braide Serafim, Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela agradável convivência, apoio e carinho.

À Main, por sua amizade e paciência. Amiga de todos os momentos, participou de cada etapa da realização desta tese, me incentivou e amparou, com seu carinho e alegria .

Às amigas Cláudia Eiko e Teresa Cristina, pelas conversas filosóficas a cerca desta extraordinária condição de eterno aprendiz. À Rita e Carlinha pela amizade e apoio.

Às amigas do laboratório, Juliana, Maria Amélia, Viviane, Paula, Ecilda e Fabricia, que sempre se mostraram prestativas e solidárias, agradeço pelo companheirismo, carinho e amizade.

À amiga Jacqueline, companheira nesta jornada de pós-graduação, pela amizade e pelas conversas sempre tão agradáveis e essenciais ao espírito.

Aos amigos, Valéria, Adriana, Fernando, Pan, Helô, Cláudio, Leila e Sandra, pelo carinho, apoio e pelas aaminadas conversas entabuladas pelos corredores, entre um experimento e outro.

À Celli, por suas palavras de incentivo e carinho.

Ao amigo Sérgio, que tantas vezes me ajudou a domar o computador, por sua paciência e amizade.

À Izildinha, Stellinha, Carlos e Alessandra, pela ajuda e pelas palavras de carinho no nosso dia-a-dia e à Marlene, pelas animadas conversas e pelo cafezinho, sempre tão providencial.

Às secretárias do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Lúcia e Lurdes pela cooperação, ajuda e carinho.

Às técnicas e amigas do Centro de Microscopia Eletrônica do IB, Antonia, Adriane e Loló, que além de me ensinarem e ajudarem, torceram pelo êxito de cada experimento realizado.

As amigas de Araraquara, Samira, Maragarete, Rosana e Elaene, que me receberam com tanto carinho, me ajudaram e apoiaram durante o breve período que estive no laboratório. Alguma coisa se perdeu pelo caminho...

À Marina, do IMTSP, pelas palavras de incentivo e carinho; mesmo atribulada em seus afazeres, se preocupou e me auxiliou nas inúmeras preparações para microscopia eletrônica.

Aos Prof. Dr. Paulo, Julinha, Dagmar, Irineu, pela gentileza no tratamento e pelas palavras de incentivo.

Ao Rovilson, sempre prestativo e gentil, ajudou-me no esclarecimento de várias técnicas.

À Cris e Dirce, pelo carinho e amizade compartilhados na sala de cultura de células.

Aos amigos de pós-graduação da Imunologia. Compartilhamos nossas expectativas e esperanças, apoiando-nos uns aos outros, seguindo por estes caminhos ainda inexplorados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP).

*A realização intelectual e pessoal é
intermediada pela presença
dos amigos.*

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3

- A. Histórico da doença e de seu agente 3
- B. Características do agente etiológico 4
- C. Nicho ecológico e epidemiologia 9
- D. Características da doença 12
- E. Diagnóstico da Paracoccidioidomicose (PCM) 13
- F. Relação hospedeiro-parasita 14

OBJETIVOS DO TRABALHO 21

3. MATERIAL E MÉTODOS 22

- 3.1. Cepas estudadas 22
- 3.2. Cultura celular 23
- 3.3. Preparo de antígenos do *P. brasiliensis* 23
 - 3.3.1. Filtrado de cultura 23
 - 3.3.2. Antígeno gp43 24
 - 3.3.3. Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) 24
 - 3.3.3.1. Revelação pela prata 25
- 3.4. Obtenção de soros policlonais 26
 - 3.4.1. Soro anti-gp43 26
 - 3.4.1.1. Precipitação de Imunoglobulinas totais 26

- 3.4.1.2. "immunobloting" 27
- 3.4.2. Soro anti-filtrado de cultura 28
- 3.4.3. Soro anti-célula total do *P. brasiliensis* 28
- 3.4.4. Pool de soros de pacientes com PCM 29
- 3.5. Estudo da infecção do *P. brasiliensis* às células HeLa 29
 - 3.5.1. Padronização das suspensões do *P. brasiliensis* 29
 - 3.5.2. Infecção das células HeLa 30
- 3.6. Revelação das provas de infecção 30
 - 3.6.1. Coloração May-Grünwald/Giemsa 30
 - 3.6.2. Coloração por PAS (Periodic Acid-Shiff) 31
 - 3.6.3. Revelação por imunofluorescência indireta 31
- 3.7. Avaliação da adesão por ensaio imunoenzimático 32
 - 3.7.1. Inóculo do *P. brasiliensis* 32
 - 3.7.2. Preparo da cultura de células em microplacas 33
 - 3.7.3. Infecção das células 33
 - 3.7.4. Revelação da reação imunoenzimática 33
- 3.8. Teste de inibição da adesão 34
- 3.9. Verificação da participação ativa do parasita e do hospedeiro no processo de infecção 35
 - 3.9.1. Inativação do parasita 35
 - 3.9.2. Inativação da célula hospedeira 36
- 3.10. Verificação do parasitismo intracelular do *P. brasiliensis* 36
 - 3.10.1. Determinação do número total de células fúngicas após infecção 36
 - 3.10.2. Determinação do número de unidades formadoras de colônia (*u.f.c.*) 37
- 3.11. Estudo da infecção celular em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) 38

- 3.11.1. Infecção das células 38
- 3.11.2. Fixação das células infectadas 39
- 3.11.3. Emblocamento do material em agarose 39
- 3.11.4. Desidratação 39
- 3.11.5. Inclusão em resina 40
- 3.11.6. Obtenção de cortes semifinos para avaliação do material 40
- 3.11.7. Contrastação dos cortes ultrafinos 41
- 3.12. Preparados para MET revelados por reação imunocitoquímica 41
 - 3.12.1. Processamento do material infectado 41
 - 3.12.2. Desidratação e inclusão em resina 42
 - 3.12.3. Reação de “immunegold” 42
- 3.13. Meios de cultura, soluções e metodologias específicas utilizadas 44
 - 3.13.1. Meios de cultura 44
 - 3.13.1.1. Meio de Fava Netto 44
 - 3.13.1.2. Meio de Negroni (NGTA) 44
 - 3.13.1.3. Meio de Fava Netto enriquecido 44
 - 3.13.2. Preparo do SDS-PAGE 45
 - 3.13.3. Soluções utilizadas nas provas de “immunobloting” 47
 - 3.13.4. Soluções Tampão diversas 48
 - 3.13.5. Soluções Corantes 49
 - 3.13.6. Outras soluções 51

4. RESULTADOS 52

- 4.1. Estudo da infecção do *P. brasiliensis* às células HeLa 52
 - 4.1.1. Revelação dos testes de infecção por diferentes técnicas de coloração e imunoensaios 52

4.1.2. Avaliação da infecção celular por diferentes cepas do *P. brasiliensis* 53

4.2. Avaliação do parasitismo intracelular do *P. brasiliensis* 55

4.3. Observações em Microscópio Eletrônico de Transmissão 55

4.3.1. Reação de "immunegold" 56

5. DISCUSSÃO 69

CONCLUSÕES 82

RESUMO 85

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

1. INTRODUÇÃO

O *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) é um fungo dimórfico causador da Paracoccidioidomicose (PCM), doença invasiva no homem, de alta incidência na América Latina, em especial no Brasil. Apesar disto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos na PCM, desde o primeiro contato com o agente até os estágios subsequentes da doença. Acredita-se que o *P. brasiliensis*, `a semelhança de outros fungos causadores de micoses sistêmicas, deve utilizar diferentes mecanismos de patogenicidade para se estabelecer no hospedeiro e causar doença.

Até o momento, uma maior elucidação sobre a formação das lesões e sobre a cadeia epidemiológica deste agente tem sido limitada, em grande parte, devido `a inadequação dos modelos de estudo. Porém, utilizando-se experimentos em animais, os dados obtidos já permitiram concluir-se que a composição da parede do fungo é um fator de virulência do fungo (San-Blas, 1982).

Por outro lado, muitos trabalhos têm abordado o estudo da glicoproteína de 43kDa (gp43), que apresenta função de proteinase e é encontrada no soro e na urina de pacientes (Mendes-Giannini *et al.*, 1989). Porém, apesar da concentração sangüínea da gp43 ser um parâmetro para a avaliação desta doença, o exato papel desta proteína na PCM ainda não está esclarecido.

Com relação aos modelos de estudo envolvendo técnicas de culturas de células de mamíferos, muito utilizados em bacteriologia, raramente têm sido estes empregados dentro da micologia. Contudo, no estudo da virulência do *P. brasiliensis*, Mendes-Giannini *et al.* (1994), utilizando provas de

infecção de culturas de células da linhagem Vero (rim de macaco verde da África), demonstraram que este agente deve apresentar mecanismos de patogenicidade envolvendo adesão e invasão.

No presente trabalho não só a infecção por este fungo em culturas de células HeLa (adenocarcinoma cervical humano) foi avaliada, como também o estudo deste processo com relação a cinco cepas do *P. brasiliensis*, diferentes quanto à procedência e grau de patogenicidade.

Desta forma, na abordagem realizada, verificou-se a infecção por estas cepas, a cinética do processo, possibilidade de inibição por diferentes soros e aspectos morfológicos das formas celulares fúngicas envolvidas. Além disto, os mecanismos de adesão e invasão foram verificados, não apenas através de observações em Microscopia Ótica, como também em Microscopia Eletrônica de Transmissão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A. Histórico da doença e de seu agente

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, que pode se manifestar em diferentes formas clínicas ou ainda permanecer assintomática no indivíduo infectado por períodos prolongados. Esta é uma doença endêmica na América Latina, cujo agente etiológico é o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*).

A PCM foi descrita pela primeira vez no Brasil, em 1908, por Adolfo Lutz, à partir de observações em lesões bucais de pacientes. Através da análise histopatológica destas lesões e da obtenção do isolamento e cultivo do agente etiológico, este importante representante da Medicina brasileira tornou-se um dos precursores na identificação desta nova doença, diferenciando-a de outra micose sistêmica, a Coccidioidomicose, anteriormente descrita na Argentina.

Inicialmente, esta doença era conhecida como Blastomicose Brasileira ou Blastomicose Sul-Americana. Desde então, várias sinonímias foram divulgadas à partir de descrições patológicas. Somente em 1971, em um encontro de micologistas realizado em Medellín, Colômbia, é que o termo Paracoccidioidomicose foi oficialmente designado para denominar esta patologia.

Paralelamente, como na determinação do termo oficial para a denominação da doença, onde diversas sinonímias foram registradas, semelhante situação ocorreu com o agente etiológico da PCM. Assim sendo, inicialmente o fungo recebeu a denominação de *Zymonema brasiliensis*, pelo

bacteriologista italiano Alfonso Splendore em 1912. Em 1930, Floriano Paulo de Almeida criou um novo gênero no reino Fungi, o *Paracoccidioides* e revalidou o nome da espécie criada por Splendore em 1912. À partir de então, o agente etiológico da PCM passou a ser oficialmente denominado de *Paracoccidioides brasiliensis*.

B. Características do agente etiológico

O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico, termo-dependente, apresentando-se na forma leveduriforme (L), quando cultivado em meio de cultura a 36,5°C ou na forma micelial (M), quando cultivado em temperaturas inferiores a 25°C. O *P. brasiliensis*, na fase parasitária, encontra-se nos pacientes na forma L, enquanto que na sua fase saprofítica apresenta-se na forma M.

A parede celular do *P. brasiliensis* é composta principalmente de polissacarídeos (quitinas e hexoses), proteínas e lipídeos, sendo a presença da hexose relacionada à regulação do dimorfismo e à morfologia do fungo. Assim sendo, na sua forma micelial a parede celular é constituída principalmente pela β -1,3 glucana e na forma leveduriforme pela α -1,3 glucana, sendo a galactomanana encontrada em ambas as formas (Kanetsuma *et al.*, 1972).

A presença de α -1,3 glucana na superfície da parede celular do fungo tem sido considerada como um dos fatores de virulência deste patógeno, contribuindo para seu sucesso no parasitismo. Esta hexose, presente em maior concentração na parede celular da forma leveduriforme do *P. brasiliensis*, deve agir como um escudo para o fungo, protegendo-o da fagocitose, uma vez que

os fagócitos humanos produzem a β -glucanase, capaz de digerir a parede celular do *P. brasiliensis* somente quando na sua forma micelial (San-Blas, 1982).

A proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, atribuída à composição bioquímica da parede celular, foi também observada em outro agente de micose sistêmica, o *Histoplasma capsulatum* (Klimpel *et al.*, 1988).

No que diz respeito à transição reversível de micélio à levedura, esta pode ser induzida *in vitro* apenas por alteração da temperatura de incubação, que parece ter um papel crucial no ciclo biológico deste fungo. Acredita-se ser este, o principal fator envolvido na diferenciação celular e no sucesso da infecção *in vivo*. Estudos sobre os eventos moleculares associados a estes processos têm sido realizados, objetivando-se identificação, isolamento e sequenciamento dos genes associados à expressão dos fenótipos estágio-específico do fungo *P. brasiliensis* (Silva *et al.*, 1994).

No que diz respeito à identificação deste agente, não tem sido possível, até o momento, a utilização de provas bioquímicas e soros específicos na diferenciação das cepas isoladas. Com relação à sorologia, reações de aglutinação das formas leveduriformes não são recomendadas, tendo-se em vista as características hidrofóbicas do fungo (Hazen *et al.*, 1988).

Contudo, trabalhos recentes têm abordado diferenciação das cepas através da verificação do padrão de proteínas totais, extraídas de cepas do *P. brasiliensis* e avaliadas em eletroforese bidimensional, com posterior sequenciamento da porção N-terminal das proteínas expressas diferencialmente nas fases micelial e leveduriforme das culturas. Este último procedimento tem objetivado possibilitar uma posterior síntese dos oligonucleotídeos relativos a este terminal, capazes de serem utilizados como

sondas moleculares em experimentos de identificação de genes cDNAs do *P. brasiliensis* (Soares *et al.*, 1995).

Por outro lado, a técnica do PCR (Polimerase Chain Reaction) também tem sido recentemente utilizada, com o propósito de identificação de cepas deste fungo pela utilização de sondas arbitrárias, denominadas de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Soares *et al.*, 1995). A possibilidade de se poder distinguir cepas individuais do *P. brasiliensis*, através de técnicas sensíveis e objetivas, certamente deverá contribuir com os estudos epidemiológicos deste agente, estabelecer correlações com virulência das cepas e formas clínicas da doença, além de auxiliar na análise das vias de infecção.

Com relação aos antígenos extracelulares do *P. brasiliensis*, este é capaz de secretar pelo menos 60 antígenos solúveis, que incluem glicoproteínas e proteínas com atividade enzimática (Yarzabal, 1982). Dentre estes antígenos, a glicoproteína de 43kDa (gp43) é considerada a de maior valor diagnóstico tendo sido, inclusive, encontrada no soro de pacientes com PCM (Mendes-Giannini *et al.*, 1989).

Estudos iniciais sobre a análise da composição antigênica do *P. brasiliensis*, obtidos à partir de extratos brutos de culturas do fungo, apresentaram resultados diversos conforme as cepas analisadas, meios de culturas utilizados e tempo de incubação do cultivo (Yarzabal, 1982).

Em relação às diferentes cepas do fungo, estas podem produzir quantidades variáveis de antígenos. Em trabalho realizado por Blumer *et al.* (1984), seis cepas do *P. brasiliensis* foram avaliadas quanto a capacidade das mesmas em produzirem antígenos. Dentre estas, a cepa PbB-339 foi a que produziu maiores concentrações de antígenos específicos sendo esta, atualmente, considerada como cepa padrão deste agente.

Na obtenção de antígenos do fungo na sua forma micelial, Standard and Kaufman (1980) caracterizaram a presença de três bandas antigênicas, denominadas de antígenos 1, 2 e 3, através da técnica de imunodifusão dupla. Com relação aos antígenos obtidos de culturas na forma leveduriforme do *P. brasiliensis*, cinco frações antigênicas foram identificadas e denominadas de A, B, C, D e E. Estas frações antigênicas, após análise em imunoeletroforese formaram arcos de precipitação frente aos anticorpos específicos correspondentes (Restrepo and Drouhet, 1970).

Yarzabal *et al.* (1973) também analisaram, por imunoeletroforese, extratos solúveis de culturas leveduriformes do *P. brasiliensis*, verificando a presença de oito frações protéicas. Estas apresentaram grande reatividade frente aos soros hiperimunes, revelando 25 linhas de precipitação, dentre as quais, uma apresentou mobilidade catódica e atividade de fosfatase alcalina, permitindo a formação de um arco nítido e mais intenso de precipitado, que foi reconhecido por estes autores como o arco E.

Este antígeno demonstrou ser espécie-específico e estar presente tanto na forma micelial como leveduriforme do *P. brasiliensis* sendo que esses autores conseguiram, nas diversas reações realizadas, identificar no arco de precipitação E inicial, duas frações antigênicas às quais denominaram de E1 e E2. Com relação ao antígeno E2, em trabalho posterior de Campo-Aasen *et al.* (1980), esta mesma fração antigênica foi identificada na membrana citoplasmática de sete cepas do *P. brasiliensis*.

Prosseguindo-se os estudos sobre os componentes antigênicos deste fungo, Puccia *et al.* (1986) analisaram, por imunodifusão dupla, a reatividade de componentes solúveis de culturas do *P. brasiliensis* frente aos soros de pacientes com PCM. Verificaram, então, que a fração glicoprotéica de 43kDa (gp43) observada em experimentos de eletroforese, reagia tanto com os soros de pacientes como com o soro anti-E2, obtido em coelhos após

imunização com esta fração. Através de análise imunoeletróforética da gp43, estes autores constataram que esta proteína apresentava uma migração catódica idêntica a do antígeno E2.

À partir destes resultados, esta glicoproteína passou a ser caracterizada como o antígeno extracelular específico do *P. brasiliensis*. Na caracterização da mesma, verificou-se que a gp43 apresentava relativa termo-estabilidade, sendo encontrada em meio de cultura de formas leveduriformes do *P. brasiliensis*, observando-se uma maior concentração deste antígeno principalmente na fase exponencial de crescimento (Puccia *et al.*, 1986; Stambuk *et al.* 1988).

Em relação à presença da gp43 no soro de pacientes com PCM, esta tem sido considerada como um importante marcador da eficácia terapêutica (Mendes-Giannini *et al.*, 1989).

Trabalhos realizados por Mendes-Giannini *et al.* (1990) revelaram que esta glicoproteína apresentava atividade proteolítica, sendo que os autores verificaram ação enzimática da mesma sobre o colágeno, elastina e caseína.

No que diz respeito a utilização da gp43 na avaliação de resposta imune celular, os testes realizados demonstraram não reatividade, tendo sido esta proteína considerada como destituída de valor para uso em reações intradérmicas, na avaliação de resposta imune celular e infecção pelo *P. brasiliensis* (San-Blas and San-Blas, 1989).

Nestas avaliações, o antígeno utilizado, denominado de paracoccidioidina é constituído por um preparado antigênico procedente de filtrado de cultura de diversas cepas do *P. brasiliensis* cultivadas à temperatura ambiente por três meses, avaliando-se a reatividade intradérmica individual após 24 a 48 horas (Chacha, 1981).

C. Nicho ecológico e epidemiologia

Apesar de ainda não ser conhecido o nicho ecológico do *P. brasiliensis*, acredita-se que este seja encontrado na natureza onde, provavelmente, clamidosporos e conídios do fungo devam estar presentes no solo, na água e em plantas (Restrepo, 1985). Contudo, muitos pesquisadores já tentaram, sem sucesso, determinar o nicho ecológico deste fungo através de isolamento à partir de diferentes materiais.

Inicialmente, a grande maioria dos casos de PCM foi diagnosticada em trabalhadores rurais, que devem ter sido infectados através da inalação de conídios do fungo presentes no solo ou na vegetação local. As observações de lesões localizadas nas mucosas bucais e anais, cogitou-se a possibilidade destes indivíduos terem sido infectados devido aos hábitos culturais, tais como mascar gravetos e praticar a toailete anal com folhas de plantas.

A dificuldade em se isolar o *P. brasiliensis* da natureza tem levantado a hipótese de serem alguns animais, os reservatórios naturais deste fungo. A favor da mesma, em trabalhos desenvolvidos por (Costa and Fava Netto, 1978) foi verificado em animais domésticos provenientes de áreas endêmicas, representados por como cavalos, vacas, carneiros e cachorros, a presença de testes sorológicos positivos para antígenos do *P. brasiliensis*. Porém, em nenhum destes animais conseguiu-se o isolamento do fungo.

Em contrapartida, o *P. brasiliensis* já foi isolado de animais silvestres, mais precisamente de fezes de morcegos frutívoros (*Artibeus lituratus*) (Grose *et al.*, 1965) e, mais recentemente, também de fezes de pingüim (*Pygoscelis adeliae*) procedente da Antártica Uruguaia (Gezuele *et al.*, 1989). Inicialmente, esta cepa isolada de pingüim foi considerada como sendo

uma nova espécie de fungo, tendo sido denominada de *Paracoccidioides antarticus*.

Posteriormente, esta classificação foi contestado por Camargo *et al.* (1992) e Garcia *et al.* (1993), que através de estudos comparativos realizados em provas de imunodifusão dupla, SDS-PAGE e imunoeletroforese, constataram identidade antigênica deste isolado com o antígeno gp43 do *P. brasiliensis*. Estes autores sugeriram, então, que este isolado deveria corresponder a uma variedade do *P. brasiliensis* e não a uma nova espécie. Apesar destes achados não existem ainda dados conclusivos que estabeleçam, de forma objetiva, serem estes animais os hospedeiros naturais do fungo.

Por outro lado, Naiff *et al.* (1986) conseguiram isolar este agente a partir de cepas do fígado, baço e pulmões de tatu (*Dasypus novemcinctus*), sendo que estes animais haviam sido naturalmente infectados pelo *P. brasiliensis*. Confirmando este achado, Peraçoli *et al.* (1992), após inoculações do fungo isolado de tatu, conseguiram reproduzir lesões em hamsters, semelhantes às ocorridas em pacientes com PCM.

No que diz respeito a prevalência da doença, a PCM é endêmica na América Latina, estendendo-se desde a América Central até a Argentina, estando as regiões de maior incidência localizadas no Brasil, Colômbia e Venezuela (Mackinnon, 1972; Restrepo, 1985). Até o momento, não existem relatos de casos de PCM no México e no Chile, países estes com grandes extensões desérticas, condições geográficas opostas às encontradas nas regiões endêmicas.

Com relação aos países onde a PCM tem sido diagnosticada, não se tem verificado uma distribuição homogênea dos casos de PCM, sendo este fato atribuído às variações climáticas de cada região. Verificando-se estas condições nas regiões endêmicas, constatou-se que estas se assemelham por

representarem áreas quentes e úmidas, com presença de abundante vegetação florestal.

Quanto ao estudo dos elementos da cadeia epidemiológica da PCM, este tem sido bastante dificultado, em grande parte, por ser esta uma doença crônica na maioria dos casos. Assim sendo, frequentemente o indivíduo apenas manifesta a doença muito tempo após o contágio inicial, estando normalmente distante do local onde ocorreu a infecção, não sendo possível precisar quando e onde esta teria ocorrido.

Na tentativa de se estabelecer uma relação entre o nicho ecológico do fungo e o desenvolvimento da PCM, Borelli (1964) propôs o termo “reservarea” buscando traçar um perfil epidemiológico da doença. Desta forma, este autor tentou uma provável caracterização das áreas onde o fungo deveria se encontrar na natureza, relacionando-as como o local onde o indivíduo teria se infectado.

Porém, a definição inicial do termo “reservarea” não caracteriza necessariamente uma área endêmica. Isto porque área endêmica de PCM é atualmente verificada por vários aspectos que incluem a reatividade intradérmica positiva dos indivíduos frente à paracoccidioidina, indicativa da ocorrência de infecção pelo *P. brasiliensis*.

No Brasil, Forjaz (1989) caracterizou 14 diferentes áreas endêmicas e de “reservareas”, através do perfil migratório residencial-profissional de pacientes com PCM. Estas áreas encontram-se distribuídas nos estados do Pará, Rondônia, Bahia, Minas Gerais e São Paulo, apresentando estas regiões, características climáticas semelhantes, representadas por períodos de verão úmido e inverno seco.

D. Características da doença

As lesões observadas em pacientes com PCM podem atingir áreas cutâneas e/ou mucosas verificando-se, com frequência, comprometimento orgânico múltiplo e de evolução prolongada (Franco, 1987). Acredita-se que o contágio do hospedeiro deve ocorrer por inalação de conídios do fungo através das vias aéreas superiores, que devem se instalar, inicialmente, nos pulmões.

A partir deste órgão, pode-se desenvolver um quadro pulmonar localizado ou o fungo pode se disseminar por todo o corpo através da via sangüínea e/ou linfática, provocando quadro sistêmico que envolve outros órgãos ou sistemas, incluindo pele e mucosas (Giraldo *et al.*, 1976).

Clinicamente, agrupando-se os sinais e sintomas da PCM, esta pode se apresentar sob a forma de dois padrões principais a saber: forma aguda ou subaguda, também denominada tipo juvenil, e forma crônica ou do tipo adulto. A forma aguda ou sub-aguda é habitualmente severa, de evolução rápida, afetando predominantemente jovens de ambos os sexos. Nesta forma, principalmente o sistema retículo-endotelial é comprometido (Franco *et al.*, 1989). Por outro lado, a forma crônica tem instalação lenta, gradual e é observada com maior frequência em pacientes do sexo masculino, apresentando principalmente comprometimento pulmonar e eventualmente mucocutâneo (Fava Netto, 1955).

Atribui-se a maior resistência observada na forma crônica da doença em pessoas do sexo feminino, aos fatores hormonais. Neste sentido, em experimentos realizados *in vitro* verificou-se que o estrógeno era capaz de inibir a transição do *P. brasiliensis* da sua forma micelial, para a forma

leveduriforme (Restrepo *et al.*, 1984). Porém, os mesmos autores demonstraram que este hormônio não era capaz de impedir a transição reversa, isto é, da forma leveduriforme para a forma micelial, nem afetar o crescimento do fungo ou a formação de multibrotamentos nas leveduras

E. Diagnóstico da PCM

Com relação ao diagnóstico laboratorial da PCM, este é atualmente realizado através da pesquisa de anticorpos séricos reativos contra antígenos do *P. brasiliensis*. Inicialmente, no diagnóstico da PCM, Moses (1916) introduziu a reação de fixação do complemento. Posteriormente, outros pesquisadores também a empregaram, tais como Gomez and Assumpção (1924) e Lacaz (1949).

Contudo, apenas em 1955 é que Fava Netto padronizou esta técnica pela utilização de um antígeno polissacarídico extraído do fungo. A seguir, a reação de imunodifusão dupla em gel de agarose foi empregada no diagnóstico da PCM, utilizada pela primeira vez por Ferri em 1961. Restrepo (1966), estudando com maior ênfase esta reação, demonstrou bons resultados quanto à sensibilidade e especificidade da mesma no diagnóstico da PCM.

Como já relatado, o antígeno específico do sistema só foi purificado e identificado por Yarbáza *et al.* em 1977, tendo sido denominado de antígeno E2. Ainda na década de 70 outras técnicas também foram utilizadas na PCM, tais como a imunoeletroforese e contraimunoeletroforese, sem terem contudo demonstrado um avanço significativo no diagnóstico desta doença.

Com relação à introdução de reações imunoenzimáticas para este diagnóstico, o uso da técnica de ELISA foi inicialmente empregado por Mendes-Giannini *et al.* (1984) e Camargo *et al.* (1984). Apesar da alta sensibilidade, a técnica apresentou o inconveniente de reações cruzadas com antígenos de agentes de outras micoses sistêmicas, tais como Histoplasmose e Doença de Jorge Lobo (Puccia *et al.*, 1991). Entretanto, a prova de ELISA demonstrou ser perfeitamente adequada para o acompanhamento da conversão sorológica em pacientes sob tratamento antifúngico.

No diagnóstico da PCM, o marco fundamental foi a purificação e caracterização da gp43, molécula imunodominante do sistema (Puccia *et al.*, 1986), o que permitiu a padronização da técnica de Western-Blot, decisiva para a confirmação do mesmo. Trabalhos realizados a seguir demonstraram que 100% dos soros de pacientes com PCM apresentavam anticorpos capazes de reconhecer a glicoproteína gp43 (Mendes-Gianini *et al.*, 1989; Blotta and Camargo, 1993).

Atualmente, tendo-se estabelecido e padronizado a metodologia de semipurificação da gp43, denominada desta forma como Ag7 do *P. brasiliensis* (Camargo, 1996), vários centros ainda utilizam para fins diagnósticos a técnica da imunodifusão, inclusive no acompanhamento dos pacientes durante a terapêutica. Isto, devido ao menor custo da prova quando comparada às reações imunoenzimáticas. Em contrapartida, nos laboratórios com maiores recursos e nos centros de referência, principalmente a técnica do Western-Blot tem sido utilizada no diagnóstico e acompanhamento da PCM.

F. Relação hospedeiro-parasita

Quando um hospedeiro é infectado pelo *P. brasiliensis*, o desenvolvimento da PCM e a avaliação da doença dependerão do grau de

virulência do agente infectante e das condições e resposta imune do hospedeiro. Acredita-se que, além de fatores hormonais estarem relacionados ao desenvolvimento, ou não, da PCM, a evolução desta doença possa estar relacionada também a uma predisposição genética, representada por antígenos do sistema de histocompatibilidade.

Neste sentido, Lacerda *et al.* (1988), em estudo realizado com pacientes da região Sudeste do Brasil, observaram alta incidência de indivíduos com PCM apresentando o fenótipo HLA-B40. Entretanto, estes resultados se contrapõem aos obtidos em estudos realizados na Colômbia, onde os fenótipos mais frequentemente observados em pacientes com PCM foram HLA-A9 e HLA-B13, enquanto que o fenótipo HLA-B40 foi observado, com maior frequência, em indivíduos saudáveis. Estes resultados indicam que a susceptibilidade de um indivíduo em relação à PCM pode estar relacionada também a fatores étnicos.

No estudo da PCM, muitos trabalhos têm verificado a resposta do hospedeiro frente à infecção pelo *P. brasiliensis* e a participação desta reação nas diversas lesões inflamatórias observadas na doença. Neste processo, quando um indivíduo se infecta por inalação de propágulos da forma saprofítica do *P. brasiliensis*, o conídio pode se transformar na forma leveduriforme do fungo nos pulmões do hospedeiro, causando apenas um processo inflamatório local ou podendo se disseminar pelo organismo do hospedeiro provocando outras lesões.

O fungo, portanto, pode se replicar por multibrotamentos, sendo capaz de sintetizar glicoproteínas, polissacarídeos, peptídeos e lipídeos. Algumas proteínas apresentam atividade proteolítica cuja função pode ser, inclusive, auxiliar no processo de disseminação e invasão do fungo nos tecidos do hospedeiro. Para controlar todo este processo infeccioso, intensa reação

inflamatória é estimulada no hospedeiro e tanto o sistema imune celular, quanto o humoral, são ativados.

Estudando-se pacientes apresentando as diferentes formas clínicas da doença verificou-se que estes apresentavam graus variáveis de depressão da resposta imune celular, existindo uma correlação entre a gravidade da doença e o nível da imunossupressão (Siqueira, 1982). Determinou-se, também, que pacientes manifestando a forma aguda da PCM apresentavam número reduzido de células T CD4 circulantes, porém número de linfócitos B normal, com ocorrência de ativação policlonal e consequente, aumento nos níveis de imunoglobulinas (Mota *et al.*, 1988; Chequer-Bou-Habib *et al.*, 1989).

Dentre as alterações da resposta imune, observadas em pacientes com PCM, distúrbios imunoregulatorios têm sido descritos demonstrando o envolvimento e participação de várias células efectoras e diferentes citocinas contribuindo para o processo inflamatório da doença, estimulando ou reprimindo os mecanismos envolvidos no controle do parasita.

No que diz respeito ao processo da fagocitose, este é um dos mecanismos mais eficientes do hospedeiro no combate ao parasitismo, constituindo uma importante barreira, principalmente após ser estimulado pelo sistema imune. Em relação ao *P. brasiliensis*, vários estudos foram realizados para a verificação da atividade fagocítica de macrófagos e monócitos, frente a este fungo.

Desta forma, Castaneda *et al.* (1987) realizaram estudos em murinos infectados intraperitonealmente com este agente na sua forma leveduriforme. Os resultados observados demonstraram que a capacidade de replicação do fungo, após ser fagocitado, continuava ativa verificando-se formas do *P. brasiliensis* apresentando inclusive brotamentos no interior das células fagocíticas.

Em outra abordagem, Brummer *et al.* (1989) verificaram que apenas fagócitos ativados eram capazes de exercer atividade fungicida eficaz sobre as células do *P. brasiliensis* fagocitado. Desta forma, estes autores demonstraram que macrófagos peritoneais de camundongos apresentavam capacidade fungicida elevada contra a forma leveduriforme do fungo apenas quando previamente estimulados por linfocinas obtidas a partir de sobrenadantes de cultura de células esplênicas estimuladas com concanavalina A (ConA), ou quando tratadas diretamente com IFN- γ . Por outro lado Moscardi-Bacchi *et al.* (1993), realizando estudos para avaliar a imunomodulação de citocinas (linfocinas e IFN- γ) em macrófagos, verificaram que estas células apresentavam principalmente uma atividade fungistática sobre a replicação do *P. brasiliensis*, observando-se até 95% de inibição da replicação do fungo fagocitado.

Com relação aos monócitos de pacientes determinou-se experimentalmente que estes não apresentavam, em provas realizadas *in vitro*, deficiência na capacidade de produção de interleucina-1 (IL-1) e do fator de necrose tumoral (FNT). Na avaliação da atividade fungicida destas células, frente ao *P. brasiliensis*, os resultados obtidos demonstraram que a produção de FNT era maior em pacientes com PCM do que em indivíduos normais, indicando que a infecção deve levar a uma estimulação constante da produção de citocinas reguladoras da reação inflamatória. Por outro lado, nestes mesmos pacientes, observou-se diminuição da produção de interferon-2 (IL-2) (Peraçoli, 1996).

Considerando-se que as células T dependem da interação com IL-2 para que ocorra proliferação, Reskallah-Iwasso *et al.* (1989) já haviam observado em trabalho anterior, realizado em pacientes com PCM, que a baixa capacidade proliferativa das células T estava relacionada a baixa produção de IL-2.

Com relação à resposta imune humoral na PCM, vários estudos foram realizados para a avaliação deste aspecto. Assim sendo, Calich *et al.* (1985) estudando camundongos recém-nascidos infectados intraperitonealmente com células leveduriformes do *P. brasiliensis*, verificaram uma ativação policlonal das células B do sistema imune, após 60 dias de infecção. Também, Biagioni *et al.* (1987) avaliando a resposta humoral, em presença de processo inflamatório de PCM experimental, observaram anticorpos da classe IgG e o componente C3 do sistema complemento ligados à parede celular do fungo, presentes no interior do granuloma. Estes resultados sugeriram que a IgG poderia agir como um bloqueador de antígenos secretados pelo *P. brasiliensis*, possivelmente impedindo a difusão dos mesmos pelos tecidos do hospedeiro e provavelmente inativando-os.

Com relação aos produtos extracelulares, muitos microrganismos patogênicos produzem antígenos que participam direta ou indiretamente da relação parasita-hospedeiro. Dentre as glicoproteínas com atividade enzimática, as proteinases têm se revelado como sendo uma das mais importantes. Neste sentido, algumas evidências sugerem que a presença de proteinases na membrana das diferentes formas do *Trypanosoma cruzi* devem impedir a associação deste protozoário com as células fibroblásticas (Piras *et al.*, 1985), ou a sua ingestão por macrófagos (Souto-Padron *et al.*, 1990).

No caso da PCM, a maior ou menor concentração de alguns antígenos do *P. brasiliensis*, em especial a gp43, no sangue periférico de pacientes apresentam uma relação direta com o grau de severidade da doença (Garcia *et al.* 1987; Mendes-Giannini *et al.*, 1989).

Porém, apesar da grande importância deste antígeno no diagnóstico e acompanhamento da PCM, a relevância do mesmo no quadro da doença, como um fator de virulência, tem apenas sido sugerida com base em suas características proteolíticas e pela constatação de ser o mesmo espécie-

específico e, portanto, presente em todas as cepas analisadas. Entretanto, o papel efetivo da proteinase gp43 na patogênese da PCM, ainda precisa ser melhor investigado.

De maneira geral, com relação ao estudo dos mecanismos e fatores de virulência dos fungos patogênicos, pouco tem sido realizado no que diz respeito à avaliação da capacidade adesiva e/ou invasiva destes agentes. Recentemente, através de estudos desenvolvidos *in vitro* utilizando culturas celulares, alguns aspectos têm sido esclarecidos.

Quanto a esta abordagem, estudos sobre a capacidade adesiva de leveduras, realizados com *Candida albicans* demonstraram a participação de múltiplos fatores para que uma efetiva adesão deste fungo pudesse ser observada às células de cultura (Ollert *et al.*, 1993; Rotrosen *et al.*, 1985). Dentre os trabalhos já realizados a esse respeito, destacam-se os que abordaram o estudo das interações, a nível molecular, entre adesinas do fungo e receptores da célula hospedeira (Kennedy *et al.*, 1992), demonstrando-se a contribuição da característica de hidrofobicidade da superfície celular das leveduras neste processo (Hazen, 1989).

Em especial, nos estudos relacionados à patogenicidade de várias bactérias, a contribuição da utilização de modelos de cultura de células tem sido extremamente relevante, elucidando mecanismos de colonização e invasão.

Desta forma, através de experimentos realizados *in vitro*, com diferentes culturas celulares, ressaltam-se os estudos desenvolvidos para a compreensão dos mecanismos de adesão e invasão da *Salmonella typhimurium* (Kihlström, 1977), *Shigella flexneri* (Mournier *et al.*, 1992) e *Listeria monocytogenes* (Gaillard *et al.*, 1987). Através deste modelo, pode-se verificar que os mecanismos de invasão destas três bactérias eram diferentes, envolvendo distintos mecanismos de disseminação e escape às barreiras do

hospedeiro. Por outro lado, a verificação de um padrão de adesão diferenciado em culturas celulares, tem contribuído para a distinção entre os seis virotipos atualmente descritos para a *Escherichia coli* enteropatogênica (Knutton *et al.*, 1987; Dytoc *et al.*, 1993).

Uma vez que, como para outros fungos patogênicos, a virulência do *P. brasiliensis* parece ser multifatorial, requerendo a interação de mecanismos complexos, a utilização deste modelo deve permitir investigar separadamente cada possível fator envolvido. Assim sendo, Mendes-Giannini *et al.* (1994) utilizando pela primeira vez o modelo simplificado de cultura de células obtiveram, em experimentos com células Vero infectadas pela cepa Pb113 do *P. brasiliensis*, resultados que demonstraram adesão e invasão celular pelo fungo. Apesar dos inúmeros estudos histológicos já realizados, estes dois importantes mecanismos de patogenicidade só desta forma puderam ser evidenciados, por observações em microscopia ótica.

OBJETIVOS DO TRABALHO

- Caracterizar a cinética do processo de infecção do *P. brasiliensis* à cultura de células HeLa.
- Avaliar o processo de infecção celular por diferentes cepas do *P. brasiliensis*.
- Analisar diferentes métodos de revelação do processo de infecção.
- Comprovar o processo de adesão entre diferentes cepas do *P. brasiliensis*.
- Verificar a influência de diferentes soros específicos na adesão do fungo às células HeLa.
- Verificar parasitismo intracelular do *P. brasiliensis* em cultura de células HeLa através de observações em Microscopia Eletrônica de Transmissão.
- Comprovar a existência de formas intracelulares do *P. brasiliensis* através de revelações pela técnica do "immunegold".

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cepas estudadas.

Cinco diferentes cepas do *P. brasiliensis* (Pb18, Pb113, Pb265, PbB-339 e Pb6182) foram utilizadas no presente trabalho, todas procedentes da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FCM-USP). As cepas Pb113, Pb18 e Pb265 foram isoladas de casos de PCM no Brasil, enquanto PbB-339 é procedente da Colombia e Pb6182 da Venezuela. Durante a realização deste trabalho, as cepas foram mantidas em meio de Fava Netto (item 3.13.1.1) em estufa a 35°C, em culturas na forma leveduriforme do fungo e à temperatura ambiente, na forma micelial do mesmo.

3.2. Cultura celular

No presente estudo foram utilizadas as células de cultura epitelial HeLa, procedentes de adenocarcinoma cervical humano (ATCC: CCL2). A cultura celular foi mantida através de repiques contínuos, em garrafas de vidro tipo xarope, contendo meio mínimo essencial de Eagle modificado (MEM-Eagle), ao qual foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma, Chemical Co). As células permaneceram incubadas em estufa umedecido, a 36,5°C, em atmosfera com 5% de CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias e, pelo menos uma vez por semana, as células foram repicadas. No preparo dos sub-cultivos procedia-se o descolamento do tapete celular, através de tripsinização utilizando-se 1,0 mL de ATV (solução de tripsina a 0,2% e versene a 0,025%), de procedência do Instituto Adolfo Lutz, permanecendo nesta solução por 1 a 2 minutos.

Para a realização dos testes de infecção do *P. brasiliensis*, células HeLa foram cultivadas sobre lamínulas de vidro contidas no interior de tubos de Leighton. No preparo destes cultivos distribuiu-se por tubo, 1,0 mL de suspensão celular em MEM com 2% SFB, padronizada a 1×10^6 células/mL, incubando-se as culturas por 24 horas em estufa a 36,5°C, em atmosfera com 5% de CO₂. A concentração de células foi ajustada após contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se o teste de exclusão pelo corante Azul de Trypan (item 3.13.5.4.), na determinação da viabilidade.

3.3. Preparo de antígenos do *P. brasiliensis*

3.3.1. Filtrado de cultura

No preparo de antígenos do *P. brasiliensis* a partir de filtrados de cultura inoculou-se, inicialmente, a forma leveduriforme da cepa Pb113 em 500 mL de meio de Negroni (item 3.13.1.2.). Após incubação com agitação a 150 rpm desta cultura, a 35°C por 15 dias, acrescentou-se à mesma Timerosal (Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind.), para uma concentração final de 1:10.000, re-incubando-se o cultivo por mais 4 dias nas mesmas condições. Após este período, a cultura foi centrifugada a 5.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante obtido concentrado em sacos de diálise (Sigma D-9277),

utilizando-se polietilenoglicol (Sigma P-2263). A seguir, o filtrado foi dialisado contra tampão PBS 0,15M, pH7,2 e a concentração protéica determinada pela técnica de Lowry (1951). Este preparado foi aliquotado e estocado a -20°C.

3.3.2. Antígeno gp43

Após a obtenção do filtrado de cultura, este foi submetido às técnicas de fracionamento e purificação por gel filtração e cromatografia de afinidade para obtenção da gp43, utilizando-se metodologia descrita por Mendes-Giannini *et. al.* (1989). Nestes procedimentos, alíquota de 3,0 mL do filtrado obtido foi aplicada em coluna de Sepharose 4B-Concanavalina A (ConA) (Pharmacia Fine Chemical) equilibrada com PBS 0,15M pH7,2 (Ellsworth *et al.*, 1977). Alíquotas de 2,0 mL foram coletadas e analisadas espectrofotometricamente a 280 nm. A seguir, os picos eletroforéticos obtidos foram determinados e as frações correspondentes aos mesmos foram reunidas, concentradas com polietilenoglicol e dialisadas contra PBS 0,15M pH7,2, a 4°C. A avaliação dos picos obtidos foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970).

3.3.3. Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

No preparo de cepas a serem aplicadas no SDS-PAGE estas foram, inicialmente, diluídas a 1:4 em tampão de amostra (item 3.13.2.1.) e aquecidas em água fervente por 3 minutos. Para determinação do peso molecular das bandas obtidas utilizou-se como padrão o kit da Pharmacia de "LMW", com os seguintes marcadores: Fosforilase B (94.0000 d); Albumina

Bovina (67.000 d); Ovoalbumina (43.000 d); Anidrase Carbônica (30.000 d); Inibidor de Tripsina (20.000 d) e Alfa-Lactoalbumina (14.400 d).

A separação dos componentes protéicos foi realizada em géis com 5% e 10% de acrilamida, respectivamente géis de empacotamento e de separação, preparados como apresentado no item 3.13.2.2. As corridas eletroforéticas foram realizadas a 10 mA (50V) até o momento da penetração da cepa no gel de separação, aumentando-se a corrente para 20 mA (120V) até o final da mesma, utilizando-se no processo tampão de corrida (item 3.13.2.2.6.).

3.3.3.1. Revelação pela prata

Na revelação das bandas pelo nitrato de prata fixou-se, inicialmente, o gel em solução de ácido tricloroacético a 10% por 30 minutos, a 4°C. A seguir, este foi colocado em solução de ácido acético a 5% e etanol a 10%, por 3 vezes, 10 minutos cada. Permaneceu, a seguir, em solução oxidante (ácido acético a 0,0032N e dicromato de potássio 0,0034M) por 5 minutos. Na sequência, o gel foi lavado em água deionizada por 1 minuto e, em seguida, transferido para uma solução de nitrato de prata 0,012M, por 20 minutos. Novamente, o gel foi lavado em água deionizada por 1 minuto e colocado em uma solução redutora preparada com carbonato de cálcio 0,28M e formaldeído a 0,00185%. Após revelação das bandas, o gel permaneceu em ácido acético a 5%.

3.4. Obtenção de soros policlonais

3.4.1. Soro anti-gp43

No preparo destes antissoros procedeu-se de maneira similar, seguindo esquema de imunização proposto por Yarzabal (1982), com modificações introduzidas por Mendes-Gianinni *et al.* (1988). Resumidamente, no caso do preparo do primeiro antissoro a banda excisada após eletroforese em SDS-PAGE foi, a seguir, emulsionada em igual quantidade de adjuvante completo de Freund (ACF), no preparo das duas primeiras doses inoculadas. Utilizou-se adjuvante incompleto de Freund (AIF) nas mesmas proporções no preparo das demais doses. As emulsões antigênicas assim preparadas foram injetadas intradermicamente em coelhos albinos de aproximadamente 2,0 Kg, em 7 doses de 1,0 mL cada, em períodos de duas semanas. Decorridos quinze dias da última inoculação, procedeu-se sangria de prova determinando-se o título do soro em provas de imunodifusão e "immunoblotting" (Mendes-Giannini, *et al.*, 1989).

3.4.1.1. Precipitação de Imunoglobulinas totais

Para a separação da fração imunoglobulínica do soro anti-gp43, este foi precipitado com solução de sulfato de amônio a 1,56M. Neste procedimento, o soro, diluído para 1:2 em tampão PBS 0,15M, pH7,2, foi mantido sob agitação constante, em banho de gelo, adicionando-se lentamente o sulfato de amônio. Após este procedimento, a solução permaneceu 18 horas a 4°C sendo, então, centrifugada sob refrigeração a 5.000 rpm por 30 minutos. À seguir, o precipitado obtido foi lavado em solução de sulfato de amônio a

40%, novamente centrifugado, ressuspenso e dialisado contra tampão PBS pH7,2, por 24 a 48 horas, a 4°C. Após eliminação do excesso de sal, a solução de imunoglobulinas foi misturada (vol/vol) com glicerina, neutralizada para pH7,0, e em seguida, aliquotada e estocada a -70°C.

3.4.1.2. “Imunobloting”

As frações antigênicas parcialmente purificadas, obtidas após cromatografia em coluna Sepharose 4B-ConA (item 3.3.2.), foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose segundo Towbin *et al.* (1979). Resumidamente, o gel obtido após separação das proteínas foi colocado em contato com membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Millipore Corp.), sendo este conjunto colocado entre papéis de filtro, que por sua vez foram colocados entre camadas de espuma embebidas em tampão de corrida (item 3.13.3.1.). A corrida desenvolveu-se por 18 horas em voltagem constante de 20V. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi cortada no sentido vertical, sendo em seguida incubada em tampão bloqueador (item 3.13.3.2.) a 4°C, por 4 horas. Após este procedimento, as tiras foram incubadas com soro diluído em tampão bloqueador, permanecendo sob agitação por 18 horas, à temperatura ambiente. As tiras de nitrocelulose foram, então, lavadas seis vezes com tampão PBS 0,01M, pH7,2, efetuando-se a troca do tampão a cada 10 minutos. Em seguida, as mesmas foram incubadas por 2 horas com soro anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (horse hardish peroxidase, Sigma Chem. Co.) diluído para 1:2.000 em tampão bloqueador. Novamente, as tiras foram lavadas pelo procedimento anteriormente citado. A reação imunológica foi evidenciada após tratamento

com solução reveladora utilizando-se como substrato a diaminobenzidina (item 3.13.3.3.).

3.4.2. Soro anti-filtrado de cultura

No preparo deste soro, 50 ug de filtrado de cultura (item 3.3.1.) foi inoculado intravenosamente na veia marginal da orelha de coelhos, seguindo o mesmo esquema de imunização descrito no preparo do soro anti-gp43 (item 3.4.1.). Após sangria de prova, o soro obtido foi titulado contra o mesmo antígeno, em provas de imudifusão e "immunoblotting" (item .3.4.1.2.).

3.4.3. Soro anti-célula total do *P. brasiliensis*.

Para o preparo da obtenção de soro anti-célula total, utilizou-se suspensões formolizadas da cepa Pb113, na sua forma leveduriforme, obtidas à partir de cultivos em meio Fava Netto. Para isto, culturas de 5 dias foram, inicialmente, ressuspensas em salina formolada (0,5%), onde permaneceram por 24 horas. Procedeu-se, então, teste de viabilidade desta suspensão segundo Calich, *et al.* (1978). Para as inoculações, as células formolizadas preparadas foram lavadas por três vezes em PBS 0,05M, pH7,4, estéril, ressuspensas no mesmo tampão e padronizadas em espectrofotômetro a 550 nm, para uma concentração final de 1×10^5 células/mL. A imunização foi realizada com intervalos de 4 dias, inoculando-se os seguintes volumes desta suspensão: 0,2 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 2,0 mL; 2,0 mL e 2,0 mL. Após sangria de prova, o soro foi exaustivamente absorvido com células formolizadas do *Histoplasma capsulatum* e titulado em provas de imunodifusão e

"immunobloting", utilizando-se o antígeno somático das células leveduriformes da cepa Pb113 do *P. brasiliensis* (3.3.1.).

3.4.4. "Pool" de soros de pacientes com PCM

No preparo do "pool" de soros de pacientes, foram coletadas cepas de sangue de pessoas apresentando a fase aguda da PCM. Estes soros foram gentilmente cedidos pela Prof^a. Dr^a. Maria José Soares Mendes-Giannini, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, São Paulo.

3.5. Estudo da infecção do *P. brasiliensis* às células HeLa

3.5.1. Padronização das suspensões do *P. brasiliensis*

Inicialmente, para as provas de infecção em cultura, as cepas leveduriformes do *P. brasiliensis* foram cultivadas em meio Fava Netto, por 5 dias, em estufa a 35°C. Em condições de esterilidade, os cultivos foram ressuspensos em tubos contendo MEM-Eagle acrescido de 2% de SFB. As suspensões foram, então, homogeneizadas através de aspirações sucessivas com pipetas estéreis. As concentrações foram ajustadas, utilizando-se diluições preparadas em paraformaldeído a 4%, para 0,5 de absorção a 550 nm, correspondendo esta D.O. a uma concentração de aproximadamente 1×10^6 células/mL. Todas as suspensões utilizadas como inóculos foram preparadas no momento da realização dos testes de infecção.

3.5.2. Infecção das células HeLa

Após formação da monocamada celular sobre a lamínula contidas nos tubos de Leighton, desprezou-se o sobrenadante de cultura, lavando-se as células por três vezes com MEM-Eagle, utilizando-se 1,0 mL por vez. Em seguida, a cada tubo adicionou-se 1,0 mL de suspensão padronizada de cada cepa do *P. brasiliensis*. As células infectadas foram, então, incubadas em estufa a 36,5°C, por diferentes períodos de tempo (30 minutos; 1, 3, 5, 18, 24 e 48 horas). Após estes períodos, as células foram lavadas dez vezes, utilizando-se 1,0 mL por vez, com tampão PBS 0,05M, pH7,4. À seguir, as culturas infectadas foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4%, por 18 horas.

3.6. Revelação das provas de infecção

3.6.1. Coloração May-Grünwald/Giemsa.

Depois de fixadas, as células infectadas foram lavadas cinco vezes com tampão PBS. As lamínulas foram retiradas do interior dos tubos de Leighton e secas à temperatura ambiente. À seguir, as células foram coradas com solução de May-Grünwald (eosina e azul de metileno, Merck) (item 3.13.5.1.) a 2%, diluído 1:2 em tampão Sørensen (item 3.13.4.3.), por 5 minutos. Em seguida, as células foram lavadas em água corrente e coradas com solução de Giemsa, diluída a 1:3 em tampão Sørensen, permanecendo na mesma por 20 minutos. Na seqüência, as células foram novamente lavadas com água corrente e depois de secas, as lamínulas foram colocadas sobre

lâminas de vidro e vedadas em suas laterais com esmalte incolor. À seguir, as células foram observadas ao microscópio ótico.

3.6.2. Coloração por PAS (Periodic Acid-Schiff).

A coloração das culturas infectadas pelo método de PAS foi realizada segundo Michalany (1980). Neste procedimento, após a fixação das células infectadas com solução de paraformaldeído a 4%, o material foi imerso em ácido periódico a 1%, por 15 minutos, à temperatura ambiente e lavado com água destilada por 5 minutos. Em seguida, permaneceram no reativo de Schiff (item 3.13.5.2.), por 45 minutos, à temperatura ambiente e em câmara escura. A reação foi interrompida com ácido sulfuroso (item 3.13.6.1.), preparado no momento de uso, colocando-se as lamínulas em três banhos de imersão de 2 minutos cada. Para retirar o excesso de corante, as células foram lavadas em água corrente por 1 hora. Após esse período, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente e montadas em lâminas de vidro com esmalte incolor. À seguir, as células foram observadas ao microscópio ótico.

3.6.3. Revelação por imunofluorescência indireta

Foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta (IFI), descrita por Oliveira (1967), com algumas modificações. Para a realização deste experimento, as células HeLa foram infectadas apenas com a cepa Pb113. Após período de infecção, estas foram fixadas com álcool/acetona gelado (vol/vol), por 5 minutos e, a seguir, lavadas três vezes com tampão PBS 0,05M, pH7,4. As células foram incubadas por 18 horas, a 4°C, com os

seguintes soros imunes: anti-célula total (1:320) e anti-gp43 (1:40). Ao término deste período, foram lavadas três vezes com o tampão PBS e incubadas com soro anti-IgG de coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC: Sigma Chemical Co.) diluído a 1:200 no mesmo tampão, acrescido de Azul de Evans a 0,001% (item 3.13.5.3.), permanecendo em câmara escura por 1 hora, a 36,5°C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com tampão PBS e as lamínulas depositadas sobre lâminas de vidro contendo uma gota de solução tamponada de glicerina a 10%. Este preparado foi mantido em câmara escura, a 4°C, até a observação da reação em microscópio de luz ultravioleta, em período máximo de 18 horas.

3.7. Avaliação da adesão por ensaio imunoenzimático

3.7.1. Inóculo do *P. brasiliensis*

No preparo destas provas, a cepa Pb113 foi, inicialmente, cultivada em meio Fava Netto por 5 dias, a 35°C. A partir desta cultura, o inóculo foi semeado em caldo Fava Netto e mantido sob agitação por 24 horas, na mesma temperatura. A seguir, este cultivo foi centrifugado e ressuspenso em MEM-Eagle acrescido de 2% de SFB. O inóculo foi padronizado por espectrofotometria para 0,5 de D.O. a 550 nm, sendo esta, equivalente a aproximadamente 1×10^6 leveduras por mL.

3.7.2. Preparo da cultura de células em microplacas

Para as provas de infecção reveladas por ensaio imunoenzimático, a cultura de células HeLa foi cultivada em placas de poliestireno com fundo chato (Corning, New York), contendo 96 orifícios. Para obtenção da monocamada de células, 100 μL da suspensão celular padronizada a 1×10^6 células/mL (item 3.2) foi aplicada a cada orifício da placa. As placas foram, então, incubadas em estufa a $36,5^\circ\text{C}$, em atmosfera de 5% de CO_2 , por 24 horas.

3.7.3. Infecção das células

Após formação de monocamada semiconfluente, as células foram lavadas três vezes com tampão PBS estéril e a cada orifício da placa adicionou-se 100 μL da suspensão padronizada do fungo. À seguir, as placas foram re-incubadas em estufa a $36,5^\circ\text{C}$ e 5% de CO_2 , por 3 horas. Após este período, as células infectadas foram lavadas, por três vezes, com tampão PBS 0,05M pH7,4 e fixadas com solução de álcool/acetona gelado (vol/vol), por 10 minutos. A solução fixadora foi retirada e as culturas lavadas com tampão PBS 0,05M, pH7,4, acrescido de 1% de Tween 20.

3.7.4.Revelação da reação imunoenzimática

Para bloqueio de sítios inespecíficos, as células foram incubadas com solução de leite Molico a 2,5%, preparada em tampão PBS 0,05, pH7,4,

por 1 hora, à temperatura ambiente. Após este período, esta solução foi desprezada e aplicou-se por orifício 50 μL dos soros anti-célula total (1:400) ou “pool” de soro de pacientes com PCM (1:100), incubando-se a reação por 1 hora, em estufa umidificada a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO_2 . Em seguida, as células foram lavadas por três vezes com tampão PBS, adicionando-se a seguir 50 μL por orifício, dos soros anti-IgG de coelho ou anti-IgG humano, ambos os soros conjugados com peroxidase (horse hardish peroxidase: Sigma Chem. Co.) e diluídos para 1:2.000, permanecendo por 2 horas em câmara escura, à temperatura ambiente. Os conjugados foram desprezados e as células lavadas por três vezes com tampão PBS. Procedeu-se a revelação final da reação imunoenzimática adicionando-se 100 μL de uma solução de OPD (ortofenilenediamina) a 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão acetato de sódio 0,001M, pH4,5, acrescido de 0,3% de H_2O_2 30V.

Após 30 minutos, a reação final foi bloqueada adicionando-se 25 μL de H_2SO_4 2M por orifício. Para leitura das reações, utilizou-se leitor de ELISA (Labsystem Multiskan Bichromatic, 348) em comprimento de onda a 492nm. Como controles negativos das reações foram utilizadas células não infectadas reveladas pelos mesmos soros e reagentes. Os soros primários utilizados nestes experimentos foram absorvidos por três vezes, com suspensões densas de células HeLa antes de serem utilizados.

3.8. Teste de inibição da adesão

O estudo da inibição da adesão foi realizado com a cepa Pb113. Nesta abordagem, a cepa foi previamente tratada com os soros anti-gp43

(1:2), anti-"pool" de soros pacientes com PCM e soro normal de coelho. Como controle positivo, as leveduras foram tratadas com tampão PBS, nas mesmas condições.

Nestes procedimentos, 1,0 mL da suspensão padronizada a 1×10^6 da cepa Pb113 foi, inicialmente, incubada com igual volume dos diferentes soros, por 1 hora a 36,5°C. À seguir, as suspensões foram lavadas três vezes com tampão PBS estéril e ressuspensas em 1,0 mL de MEM-Eagle acrescido de SFB a 2%. Células HeLa preparadas em tubos de Leighton foram, então, infectadas com 1,0 mL das suspensões pré-tratadas do *P. brasiliensis*. A revelação do teste foi realizada por coloração de May-Grünwald/Giemsa (item 3.6.1.) e P.A.S.(item 3.6.2.).

3.9. Verificação da participação ativa do parasita e do hospedeiro no processo de infecção.

3.9.1. Inativação do parasita

Nesta abordagem, realizou-se a infecção de células HeLa com suspensões inativadas do *P.brasiliensis*, utilizando-se apenas a cepa Pb113. Após 5 dias de cultivo em meio de Fava Netto, o crescimento leveduriforme do fungo foi morto por ressuspensão em solução de paraformaldeído a 4%, permanecendo por 24 horas. Após este período, prova de viabilidade foi realizada, semeando-se inóculos desta suspensão em três placas contendo meio de Fava Netto, aguardando-se 30 dias para verificação de possível crescimento do fungo. Confirmando-se a inviabilidade do inóculo as células leveduriformes foram, então, lavadas cinco vezes com PBS estéril e

novamente ressuspensas no mesmo tampão. Procedeu-se, a seguir, testes de infecção realizados segundo item 3.5.3. Após período de infecção de 5 e 24 horas as células foram fixadas e coradas pelo método de P.A.S.(item 3.6.2.).

3.9.2. Inativação da célula hospedeira.

Para esta avaliação, as células HeLa foram cultivadas em lamínulas de vidro contidas em tubos de Leighton. Após formação de monocamada confluyente de células, estas foram inativadas com paraformaldeído a 4%, permanecendo nesta solução por 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram, então, lavadas cinco vezes com tampão PBS estéril, por 3 minutos cada. Em seguida, infectadas com suspensão padronizada do Pb113 e incubadas por 5 e 24 horas. Na revelação desta prova as células foram fixadas e coradas pelo método de PAS (item 3.6.2.).

3.10. Verificação do parasitismo intracelular do *P. brasiliensis*

3.10.1. Determinação do número total de células fúngicas após infecção.

Para comparação da infectividade das cinco cepas do *P. brasiliensis* em estudo, determinou-se o número total de células fúngicas após infecção da cultura HeLa pelas mesmas. As provas foram realizadas como descrito no item 3.5.3., incubando-se por 24 horas as culturas infectadas. A

seguir, as células foram lavadas cinco vezes com tampão PBS 0,05M, pH7,4 e lisadas, colocando-se 1,0 mL de água destilada em cada tubo de Leighton.

O conteúdo liberado pelas células após a lise foi, então, centrifugado a 2.000 rpm, por 10 minutos, tendo sido o precipitado ressuspenso em 1,0 mL de solução de paraformaldeído a 4%, permanecendo nesta solução por 18 horas. Nesta suspensão determinou-se o número total de células do fungo, através de contagem em câmara de Neubauer. Este experimento foi repetido três vezes para cada cepa.

3.10.2. Determinação do número de unidades formadoras de colônia (*u.f.c.*).

Para determinar-se o número de células viáveis em parasitismo intracelular, verificou-se o número de unidades formadoras de colônia (*u.f.c.*) do *P. brasiliensis*, após provas de infecção celular. Nestes procedimentos utilizou-se a cepa Pb113. Inicialmente, verificou-se possível efeito citotóxico de diferentes concentrações do antifúngico Ketoconazol diretamente sobre a cultura de células HeLa. Paralelamente, determinou-se a concentração fungicida mínima do mesmo, utilizando-se suspensões padronizadas a 1×10^6 células/mL do Pb113.

Na sequência, provas de infecção foram realizadas segundo item 3.5.3. Após período de incubação de 24 horas, adicionou-se às culturas Ketoconazol em concentrações finais de 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$, objetivando-se eliminar células fúngicas extra-celulares. As células infectadas e tratadas permaneceram, então, por mais 3 horas em estufa a 36,5°C. Para verificação da viabilidade do *P. brasiliensis* no sobrenadante destas culturas, alíquotas de

0,1 mL foram semeadas em 3 placas contendo meio de Fava Netto enriquecido (item 3.13.1.4.) e incubadas em estufa a 35°C por 20 dias.

À seguir, desprezou-se o restante do sobrenadante e lavou-se as culturas infectadas por cinco vezes com tampão PBS. As células foram, então, lisadas com 1,0 mL de água destilada. O conteúdo do lisado celular foi plaqueado em meios de cultura nas mesmas condições mencionadas acima. Após 20 dias de incubação, determinou-se o número de *u.f.c.* nas placas semeadas.

3.11. Estudo da infecção celular em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

3.11.1. Infecção das células

No preparo de material para observações em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), células HeLa foram cultivadas em garrafas de plástico (Corning, New York), até a formação de monocamada celular confluyente. Em seguida, infectou-se a cultura com 5,0 mL de uma suspensão contendo 1×10^6 células/mL da cepa Pb113 em MEM-Eagle com 2% de SFB. Nas várias preparações realizadas, períodos de infecção de 3, 5 e 24 horas foram estudados. À seguir, as culturas foram lavadas 5 vezes com tampão PBS 0,05M pH7,4.

3.11.2. Fixação das células infectadas.

Inicialmente, fixou-se as células infectadas colocando-se nas garrafas 1,0 mL de uma solução preparada em tampão PBS 0,05M pH7,4, contendo aldeído glutárico a 1,5%, paraformaldeído a 2% e sacarose a 2,5%, permanecendo nesta por 90 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas três vezes com tampão PBS 0,05M pH7,4 e pós-fixadas com tetróxido de ósmio aquoso a 1% por 30 minutos, à temperatura ambiente. As células foram, então, lavadas três vezes com tampão PBS.

3.11.3. Emblocamento do material em agarose

Com o auxílio do “policeman”, o tapete celular foi raspado da superfície das garrafas, ressuspensando-se as células em tampão PBS. Em seguida, realizou-se centrifugação a 2.000 rpm, por 10 minutos. O material centrifugado foi, então, cuidadosamente depositado em depressões feitas em camada de agarose a 2%, solidificada sobre uma lâmina de vidro. Uma segunda camada de agarose foi, em seguida, aplicada sobre este material para imobilizá-lo. O material emblocado foi, então, delimitado retirando-se o excesso de agarose com o auxílio de um bisturi.

3.11.4. Desidratação.

No processo de desidratação o material emblocado em agarose foi mergulhado em etanol a 50%, sendo este substituído por três vezes a cada 5

minutos. Em seguida, o material foi mantido em etanol a 70% e a 95%, permanecendo por 10 minutos em cada concentração. Prosseguindo-se a desidratação, o material permaneceu em etanol P.A. tendo sido substituído por três vezes a cada 5 minutos.

3.11.5. Inclusão em resina

Para inclusão das células infectadas em resina mergulhou-se, inicialmente, o material em solução de etanol P.A. e óxido de propileno (vol/vol) por 20 minutos e apenas em óxido de propileno por mais 20 minutos. O material permaneceu em soluções mistas de óxido de propileno e resina Epon nas concentrações 2:1, 1:1 e 1:2, por 1 hora em cada concentração. Na sequência, foi colocado em resina pura por 24 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi depositado em moldes preenchidos com a resina sendo, a seguir, polimerizado a 60°C por 48 horas.

3.11.6. Obtenção de cortes semifinos para avaliação do material.

Cortes semifinos (cor dourada) foram obtidos com auxílio de um ultramicrótomo (Supernova), utilizando-se navalhas de vidro. Após serem fixados pelo calor em lâminas de vidro, estes cortes foram corados com solução de azul de toluidina a 0,5%, acrescida de borato de sódio a 5% e observados em microscopia óptica. Uma vez avaliado este material, foram obtidos cortes ultrafinos (cor prateada), depositados em telas de cobre de 200 "mesh".

3.11.7. Contrastação dos cortes ultra-finos

Os cortes ultrafinos foram contrastados com solução de acetato de uranila a 2% em tampão maleato por 15 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos. O material assim preparado foi observado em Microscópio de Transmissão Eletrônica (EM9S-2, Carl Zeiss).

3.12. Preparados para MET revelados por reação imunocitoquímica

3.12.1. Processamento do material infectado.

Células HeLa infectadas, preparadas em garrafas de plástico (item 3.11.1) foram, inicialmente, fixadas com solução de paraformaldeído a 4% e aldeído glutárico a 0,2%, em tampão PBS 0,05M, pH7,4, permanecendo nesta solução por 2 horas, a 4°C. A seguir, estas foram lavadas com tampão PBS 0,05M, pH7,4, por três vezes, e pós-fixadas por 18 horas em paraformaldeído a 8%, acrescido com 2,5% de sacarose em tampão PBS. Após as lavagens com o mesmo tampão, as células foram raspadas da superfície do recipiente plástico, ressuspensas no mesmo tampão, centrifugadas e o material sedimentado foi acondicionado em agarose segundo item 3.11.3.

3.12.2. Desidratação e inclusão em resina

O material foi desidratado por três vezes em etanol a 70%, por 5 minutos cada; duas vezes em etanol a 90% por 7 minutos cada e duas vezes em etanol a 100%, por 7 minutos cada. Em seguida, este foi incluído em resina LR-White (LR-White resin-hard: LADO Research Industries, Inc.). Neste processo, permaneceu em solução de resina e etanol P.A. (vol/vol) por duas vezes de 15 minutos cada e em resina por 18 horas, a 4°C. Após este período, a resina foi trocada quatro vezes a cada 15 minutos. Realizou-se novamente a troca da resina e só, então, o material foi polimerizado em estufa a 52°C em 5 dias.

3.12.3. Reação de “immunegold”

Inicialmente, os cortes ultrafinos do material polimerizado foram depositados em telas de níquel de 200 “mesh” e depois de secas, as telas foram submetidas à reação de “immunegold”.

Nestes procedimentos, as telas foram reidratadas, permanecendo por 5 minutos em tampão TBS 0,02M, pH 7,4 (item 3.13.4.5.). Em seguida, estas foram tratadas três vezes com solução tampão TBS 0,02M, pH7,4 acrescido com 1% de soro albumina bovina (BSA fração V: Sigma Chemical Co.) e 0,05% de Tween 20, permanecendo nesta solução por 10 minutos cada.

O material foi, então, incubado com soro anti-célula total diluído a 1:200 em tampão PBS 0,05, pH7,4, permanecendo nesta solução por 18 horas a 4°C. Após este período de incubação, os cortes contendo as células infectadas foram lavados dez vezes, por 3 minutos cada, em tampão TBS 0,02M, pH 7,4, acrescido de 1% de BSA e 0,05% de Tween 20. Na sequência,

estes foram lavados cinco vezes, 3 minutos cada, em solução tampão TBS 0,02M pH8,2, acrescido de BSA a 1%.

Em seguida, os cortes foram incubados em uma solução contendo Proteína A conjugada com partículas de ouro coloidal de 10 nm, diluída a 1:50 em tampão TBS 0,02M, pH8,2, acrescido de BSA a 1%, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Os cortes foram, então, lavados quatro vezes, por 4 minutos cada, com tampão TBS 0,02M pH8,2 acrescido de 1% de BSA e 0,05% de Tween 20 e uma vez em água destilada, por 1 minuto.

Para preservação das reações antígeno-anticorpo, os cortes ultrafinos foram fixados com glutaraldeído aquoso a 2%, permanecendo por 5 minutos nesta solução. Em seguida, foram lavados cinco vezes em água destilada, por 3 minutos cada. Prosseguindo-se esta fixação, os cortes ultrafinos permaneceram 5 minutos em tetróxido de ósmio aquoso a 2%. Após este período, os mesmos foram lavados três vezes com água destilada, por 3 minutos cada, permanecendo à temperatura ambiente para secar. Só, então, o material foi contrastado segundo item 3.11.7. e observado em Microscópio Eletrônico de Transmissão.

3.13. Meios de cultura, soluções e metodologias específicas utilizadas.

3.13.1. Meios de cultura

3.13.1.1. Meio de Fava Netto

Proteose peptona nº3 (Difco)	3,0 g
Peptona (Difco)	10,0 g
Extrato de carne	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Dextrose	40,0 g
Ágar (Difco)	18,0 g
H ₂ O destilada	1000 mL
pH 7,4	

3.13.1.2. Meio de Negroni (NGTA) modificado*

Neopeptona	30,0 g
Glicose	18,0 g
Tiamina	0,36 g
H ₂ O destilada.	1800 mL

*Preparação segundo Negroni (1968), com base na técnica de Evans and Kessel e modificado por Siqueira (1982).

3.13.1.3. Meio de Fava Netto enriquecido*

Soro Fetal Bovino	4,0 mL
Filtrado de cultura do Pb	4,0 mL
Meio de Fava Netto	88,0 mL

* No preparo deste meio, o filtrado de cultura e o soro fetal bovino devem ser esterilizados por filtração à vácuo antes de serem adicionados ao meio de Fava Netto.

3.13.2. Preparo do SDS-PAGE

3.13.2.1. Tampão de amostra

Tris-HCl (pH 6,8)	62,5 mM
SDS	2%
Glicerol 10%	10%
Ditiotreitol	0,5M
Azul de bromofenol	0,002%
H ₂ O bidestilada q.s.p.	10 mL

3.13.2.2. Preparação dos géis de poliacrilamida

Concentração	Gel de separação	Gel de empacotamento
	10 % T	4% T
30% Acril/ 0,8% Bis	20mL	2,66mL
Tris-HCl pH 8,8	15mL	----
Tris-HCl pH 6,8	----	5,0mL
SDS 10%	600µl	200µl
H ₂ O	24,1mL	12,2mL
Persufato de Amonio	300µL	100µL
TEMED	20µL	10µL

1-Dodecil Sulfato de Sódio

2-N, N, N, N- Tetradimetiletilenodiamina

3.13.2.2.1. Solução de Acrilamida (30%) = bis (0,8%)*

Acrilamida	58,4 g
Bis-acrilamida	1,6 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	200 mL

*Armazenar a 4°C em frasco escuro

3.13.2.2.2. Tampão de Separação Tris-HCl 1,5M pH8,8*

Tris	36,3 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	200 mL

*Ajustar o pH para 8,8 com HCl

3.13.2.2.3. Tampão de Empacotamento Tris-HCl 0,5M pH6,8*

Tris	3,0 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	50 mL

*Ajustar o pH para 6.8 com HCl

3.13.2.2.4. Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%*

SDS	10 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	100 mL

*Dissolver em banho a 37°C.

3.13.2.2.5. Solução de Persulfato de Amônio (10%)

Persulfato de amônio	0,5 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	5,0 mL

3.13.2.2.6. Tampão de Corrida Tris-Glicina 0,025M pH 8,3

Tris	12 g
Glicina	57,6 g
SDS 10%	40 mL
H ₂ O bidestilada q.s.p.	4000 mL

3.13.2.2.7. Solução Fixadora

Metanol	500 mL
Ácido acético glacial	50 mL
H ₂ O destilada	450 mL

3.13.3. Soluções utilizadas nas provas de “Immunobloting”

3.13.3.1. Tampão de corrida (pH8,3)

Tris	25 mM
glicina	192 mM
metanol	20%

3.13.3.2. Tampão bloqueador

leite desnatado (Molico)	5%
Tampão PBS 0,15M pH7,2	100 mL

3.13.3.3. Solução reveladora (preparada no momento de uso)

diaminobenzidina	5 mg
H ₂ O ₂ a 30%	150 µL
Tampão PBS 0,01M pH7,2	30 mL

3.13.4. Soluções Tampão diversas

3.13.4.1. Tampão Salina-Fosfato (PBS) 0,05M pH7,4

Salina 3M	50 mL
Tampão fosfato 0,5M (A+B)	100 mL
H ₂ O destilada	1000 mL

A. Tampão Fosfato de Sódio monobásico 0,5M

NaH ₂ PO ₄	69 g
H ₂ O destilada	1000 mL

B. Tampão Fosfato de Sódio bibásico 0,5M*

Na ₂ HPO ₄	70,98 g
H ₂ O destilada	1000 mL

*Acertar o pH com o tampão fosfato de sódio monobásico

3.13.4.2. Tampão Citrato-Fosfato*

Solução A

Ácido cítrico 0,1M	1,92 g
H ₂ O destilada	100 mL

Solução B

Fosfato dibásico 0,2M	2,84 g
Água destilada	100 mL

*Misturar 20 mL da solução A e 20 mL da solução B. Ajustar para pH 5,0 e completar com água destilada para o volume final de 100 mL.

3.13.4.3. Tampão Sörensen*

Solução A

KH ₂ PO ₄	0,6356g
H ₂ O destilada	70 mL

Solução B

Na ₂ HPO ₄	2,3675g
H ₂ O destilada	250mL

*Misturar 69,6 mL da solução A e 230,4 mL da solução, armazenar a 4°C e no momento de uso, diluir para 1:2 em H₂O destilada.

3.13.4.4. TBS 0,02M pH7,4

Tris	2,42 g
NaCl	8,50 g
Água destilada	1000 mL

3.13.5. Soluções Corantes

3.13.5.1. May-Grünwald a 2% (eosina-azul de metileno)*

May-Grünwald	2,0g
metanol	100mL

*Incubar em banho-maria a 60°C por 30 minutos, filtrar em papel de filtro e armazenar em frasco escuro.

3.13.5.2. Reativo de Schiff

Fucsina básica	2,0 g
Ácido clorídrico	2,5 mL
Metabissulfito de sódio seco	4,0 g
Carvão ativado seco	6,0 g
Água destilada	250 mL

Modo de preparo:

1. Dissolver a quente 2,0 g de fucsina básica em 250 mL de água destilada, ressuspendendo o corante após o aquecimento e filtrar em papel de filtro comum.
2. Adicionar o metabissulfito de sódio seco.
3. Após dissolução e resfriamento, adicionar 2,5 mL de ácido clorídrico e agitar por 30 minutos.
5. Adicionar o carvão ativado seco e agitar por 2 minutos. Após dissolução filtrar e guardar em frasco âmbar a 4°C.

3.13.5.3. Azul de Evans (solução estoque)*

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,05 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,05 g
H ₂ SO ₄ 0,1mM	10 mL

*Filtrar em filtro Millipore. Para uso, diluir a solução estoque em água destilada na concentração desejada e filtrar em papel de filtro comum.

3.13.5.4. Azul de Trypan*

Trypan Blue	400 g
Cloreto de sódio	810 g
Ortofosfato de potássio diidrogenado	60 mg
H ₂ O destilada	100 mL

*Ajustar para pH7,2 a pH7,3 com NaOH 1M

3.13.6. Outras soluções utilizadas

3.13.6.1. Ácido Sulfuroso

Metabissulfito de sódio	10,0 g
Ácido clorídrico 1N	5,0 g
H₂O destilada	100 mL

4. RESULTADOS

4.1. Estudo da infecção do *P. brasiliensis* às células HeLa.

4.1.1. Revelação dos testes de infecção por diferentes técnicas de coloração e imunoenaios.

Formas variadas do *P. brasiliensis*, em provas de infecção de células HeLa, puderam ser observadas tanto nas revelações coradas pela técnica de May-Grünwald/Giemsa (Figura 1), como pela técnica de P.A.S. (Figura 2). Com relação à revelação pela técnica de imunofluorescência indireta foram observadas formas morfológicas extracelulares características do fungo (Figura 3).

De maneira geral, as observações realizadas através de microscopia ótica, permitiram demonstrar tanto formas características do *P. brasiliensis*, como também células de diferentes aspectos morfológicos, estas apenas sugestivas de corresponderem ao fungo. Pela técnica de imunofluorescência, destacou-se a presença de células extracelulares do fungo, algumas apresentando blastoconídios com brotamentos simples ou múltiplos (Figura 3). Após observações de provas de infecção reveladas com os soros anti-célula total e anti-gp43, não foram verificadas variações nas reações obtidas. Entretanto, por esta técnica utilizada não foram observadas de forma clara, parasitismo intracelular do fungo.

Por outro lado, revelações das provas com os corantes apresentaram, em inúmeros campos observados, muitas células infectadas com parasitismo citoplasmático intracelular do *P. brasiliensis*. Várias destas células apresentaram as formas intracelulares do fungo no interior de vacúolos citoplasmáticos (Figuras 1 e 4).

Apesar de terem sido encontradas variações morfológicas do *P. brasiliensis*, foi possível diferenciar-se as células HeLa infectadas das não infectadas pelo fungo, nas provas reveladas tanto pelo método de PAS como pela técnica do May-Grünwald/Giemsa. Entretanto, em períodos de infecção de 3 horas até 24 horas, não foi possível estabelecer-se distinção objetiva entre parasitismo intra ou extracelular do fungo, na grande maioria das células infectadas, em observações pela microscopia ótica. Em relação a adesão do fungo às células HeLa, esta propriedade já foi observada em provas de até 30 minutos de infecção.

4.1.2. Avaliação da infecção celular por diferentes cepas do *P. brasiliensis*.

Nos testes de infecção realizados com as diferentes cepas do *P. brasiliensis* não foram observadas diferenças significativas quanto ao padrão de adesão das mesmas às células HeLa. Geralmente, as células fúngicas apresentaram-se na forma esférica, algumas com brotamentos e aderidas à membrana citoplasmática da célula hospedeira.

As cepas Pb113 (Figura 4), Pb18 (Figura 5), Pb265 (Figura 6) e PbB-339 (Figura 7) e Pb6182 (Figura 8) claramente infectaram as células

HeLa, tendo-se observado frequentes células fúngicas apresentando aspectos morfológicos de formas arredondadas.

Com relação a cepa Pb6182, proveniente da Venezuela, esta apresentou-se morfológicamente distinta das demais, tendo sido observado apenas formas pequenas e arredondadas do fungo infectando as células HeLa (Fig. 8).

Na verificação da participação metabolicamente ativa do parasita e do hospedeiro no processo de adesão, observou-se em experimentos de infecção utilizando suspensões padronizadas da cepa Pb113 inativada pelo formol, formas características do *P. brasiliensis* aderidas às células HeLa viáveis (Figura 9). Após 24 horas de infecção, resultados semelhantes também foram observados em experimentos utilizando-se fungos viáveis e células de cultura inativadas pelo formol.

Em diversas provas de infecções utilizando as diferentes cepas do *P. brasiliensis* foram observadas formas fúngicas apresentando apenas a parede celular no interior das células HeLa (Figura 10).

Objetivando-se uma avaliação comparativa da capacidade de adesão das diferentes cepas do *P. brasiliensis* foram realizados testes de infecção às células HeLa, revelados por método imunoenzimático. Os resultados obtidos determinaram que a cepa Pb18 apresenta índice de adesão maior, seguida pelas cepas Pb113 e Pb265 (Figura 11).

Em testes realizados verificando-se inibição da adesão do *P. brasiliensis* às células HeLa, após tratamento das células fúngicas com diferentes soros, observou-se maior eficiência de inibição deste mecanismo pelo "pool" de soros de pacientes com PCM em relação ao soro anti-gp43 (Figura 12).

4.2. Avaliação do parasitismo intracelular do *P. brasiliensis*.

Para avaliação do parasitismo intracelular do *P. brasiliensis* foi determinado o número total de células fúngicas, após 24 horas de infecção. Após lise das células HeLa infectadas, este valor foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, sendo que os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1. Como pode ser verificado, com relação a cepa Pb6182 um maior número de leveduras por mL, foi encontrado seguido pelas cepas Pb18, Pb113 e Pb265.

Em outra abordagem, o parasitismo intracelular foi verificado através da contagem de unidades formadoras de colônia (*u.f.c.*). Após 20 dias de incubação das placas semeadas foram obtidos resultados que constataram a presença intracelular de células viáveis do *P. brasiliensis* (Tabela 2). Na determinação do número de *u.f.c.* a partir de formas intracelulares do fungo, verificou-se um índice menor de células viáveis que o obtido com o inóculo inicial, correspondente a 50 colonias.

4.3. Observações em Microscópio Eletrônico de Transmissão.

Através das várias observações realizadas em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de secções ultrafinas de células HeLa infectadas com a cepa Pb113, foi possível demonstrar uma provável sequência da infecção que incluiu os mecanismos de adesão e invasão (Figura 13).

Na sequência proposta pode-se observar o *P. brasiliensis* aderido à célula HeLa, através de uma estrutura semelhante a um pedestal,

observando-se início de propagação citoplasmática da célula hospedeira ao redor do fungo (Figura 13a). A seguir, observam-se formas do fungo aparentemente sendo englobadas pela célula hospedeira, que apresenta significativas alterações na membrana celular (Figura 13b). Formas do *P. brasiliensis* de diferentes tamanhos são, a seguir, encontradas em vacúolos citoplasmáticos da célula hospedeira, próximas ao núcleo da mesma (Figura 13c).

Finalmente, em preparados de 24 horas de infecção, observa-se a presença do fungo no interior do citoplasma da célula HeLa, apresentando vários vacúolos e totalmente destituído de parede celular (Figura 13d). Neste período de infecção, de maneira geral, formas fúngicas tanto intracelulares como extracelulares foram observadas com menor freqüência nos diferentes preparados realizados.

4.3.1. Reação de “immunegold”

Através da reação de “immunegold”, observou-se formas da cepa Pb113 do *P. brasiliensis* aderida à membrana celular da célula HeLa, apresentando marcação intensa na área da parede celular do fungo (Figura 14). Diferentes formas intracitoplasmáticas do *P. brasiliensis* (Figura 15) foram encontradas, apresentando marcação homogênea do conteúdo citoplasmático, em revelações realizadas com soro anti-célula total.

Em relação à revelação de cortes do material infectado utilizando-se soro anti-filtrado de cultura, intensa marcação no interior do núcleo da célula HeLa pode ser observada (Figura 16).

Com relação aos soros utilizados nas reações de “immunegold”, estes apresentaram diferenças em seu padrão de marcação somente em relação às formas extracelulares do *P. brasiliensis*. Assim sendo, o soro anti-célula total apresentou marcação mais intensa na área da parede celular do fungo e distribuição homogênea das partículas de ouro na reação com antígenos do citoplasma (Figura 17a). Por outro lado, o soro anti-filtrado de cultura apresentou uma marcação mais homogênea no citoplasma do fungo (Figura 17b), sem ter ressaltado a parede celular.

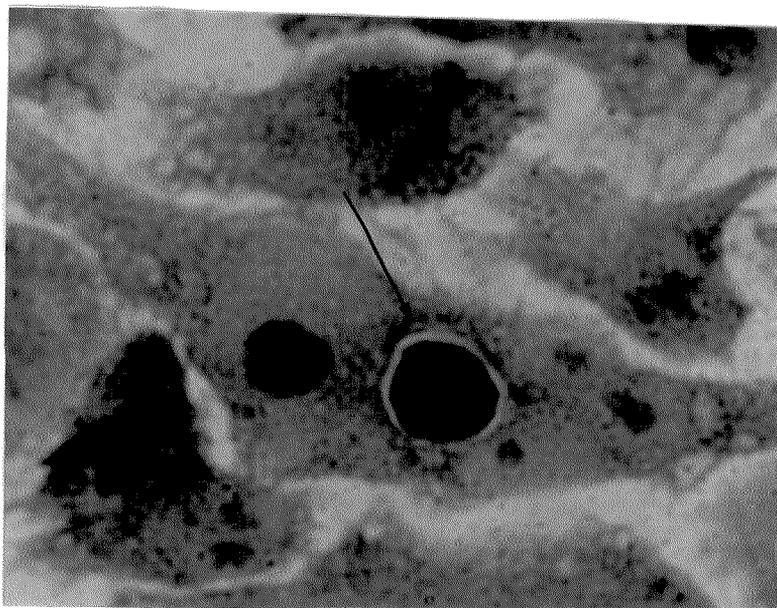


Figura 1. Infecção da cepa Pb113 do *P. brasiliensis* (seta) às células HeLa revelada pela coloração May-Grünwald/Giemsa, apresentando o fungo intracelular no citoplasma da célula. Período de infecção de 3 horas. Aumento 1000 x.

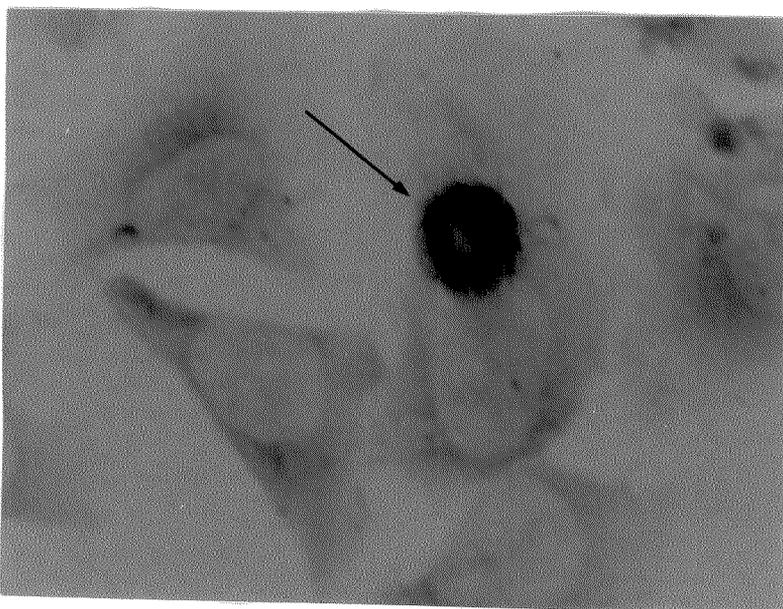


Figura 2. Observação do Pb113 (seta) infectando as células HeLa. Coloração pelo método de PAS. Período de infecção de 3 horas. Aumento 1000 x.

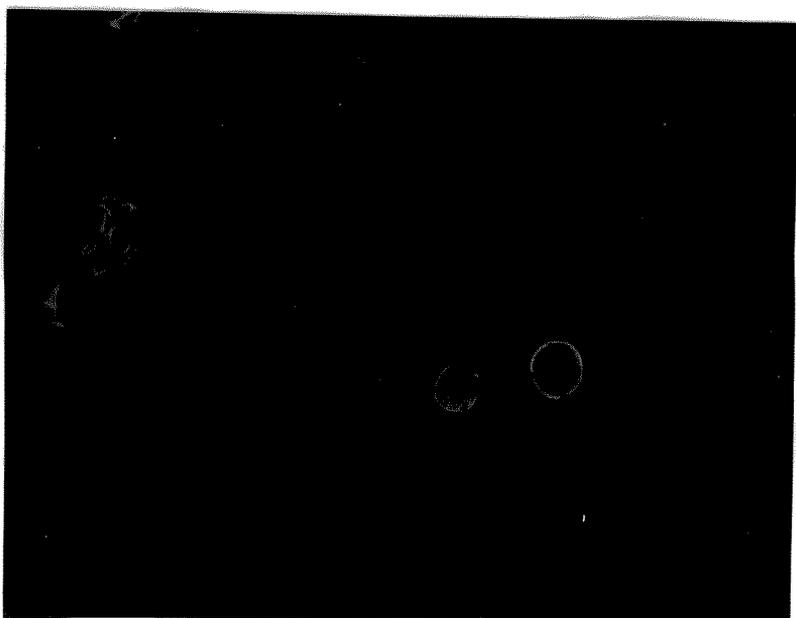


Figura 3. Revelação da infecção da cepa Pb113 às células HeLa pela técnica de Imunofluorescência Indireta, utilizando-se soro anti-célula total (1:320). Aumento: 400x

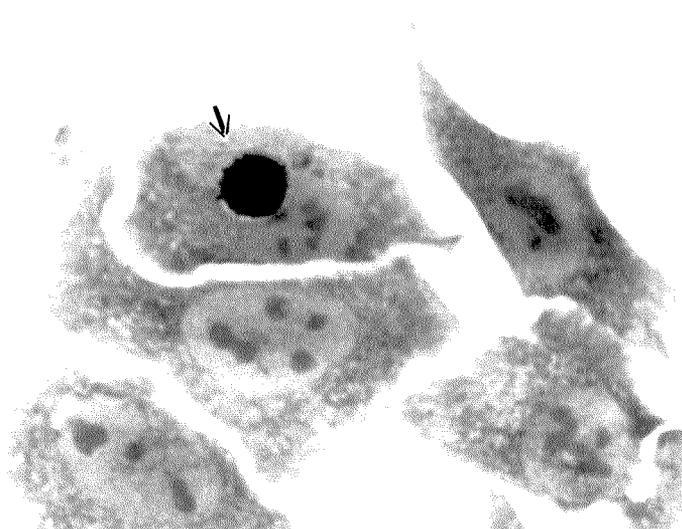


Figura 4. Forma esférica da cepa Pb113, apresentando gemulações múltiplas (seta), presentes no interior de vacúolo citoplasmático da célula HeLa. Período de infecção de 24 horas. Coloração por May-Grünwald/Giemsa. Aumento 1000 x.

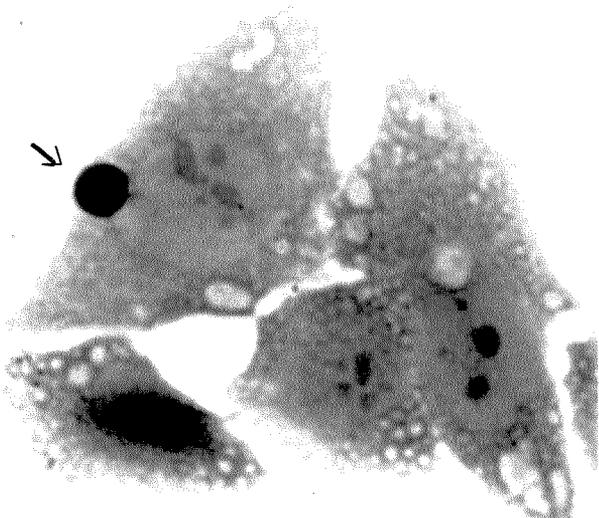


Figura 5. Observação de forma fúngica da cepa Pb18 (seta) penetrando nas células HeLa. Período de infecção 24 horas. Coloração por May-Grünwald/Giemsa. Aumento 1000 x.

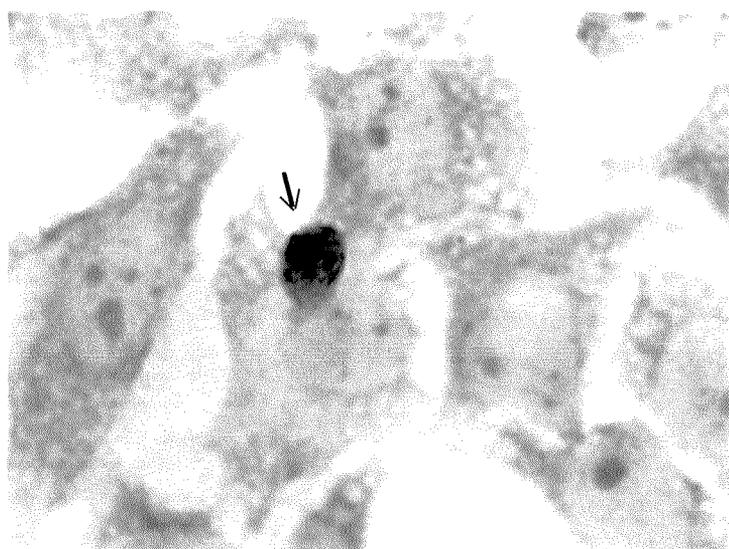


Figura 6. Forma fúngica da cepa Pb265, aparentemente penetrando na célula HeLa (seta). Período de infecção de 24 horas. Revelação por May-Grünwald/Giemsa. Aumento 1000x.

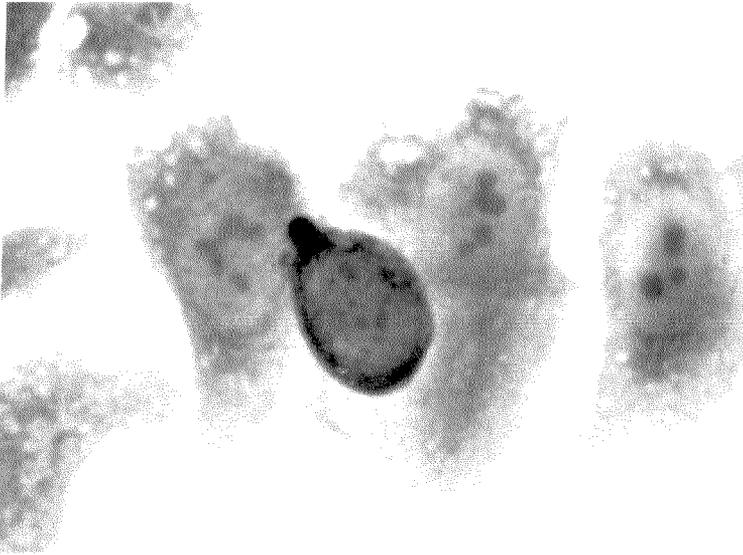


Figura 7. Formas fúngicas da cepa PbB-339 infectando células HeLa. Período de infecção de 24 horas. Coloração por May-Grünwald/Giemsa. Aumento 1000 x.

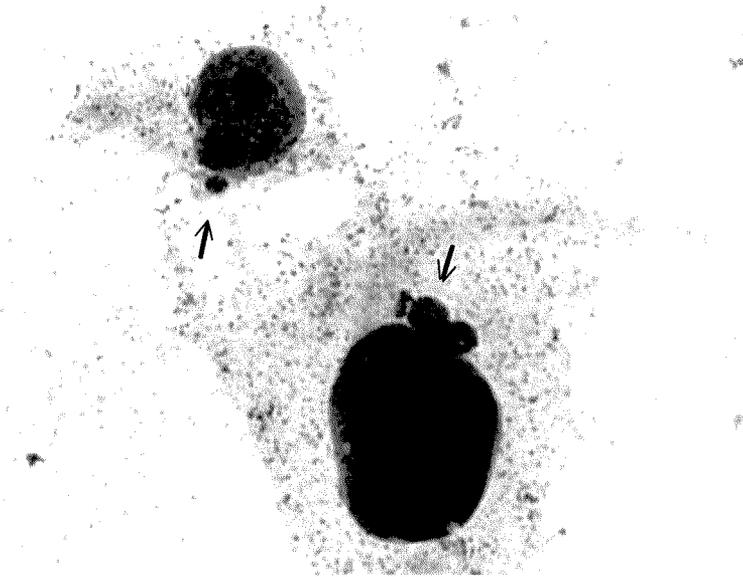


Figura 8. Cepa Pb6182 em prova de infecção onde observa-se a presença de formas fúngicas esféricas pequenas (setas), próximas ao núcleo da célula HeLa. Período de infecção de 24 horas. Coloração pelo PAS. Aumento 1000 x.

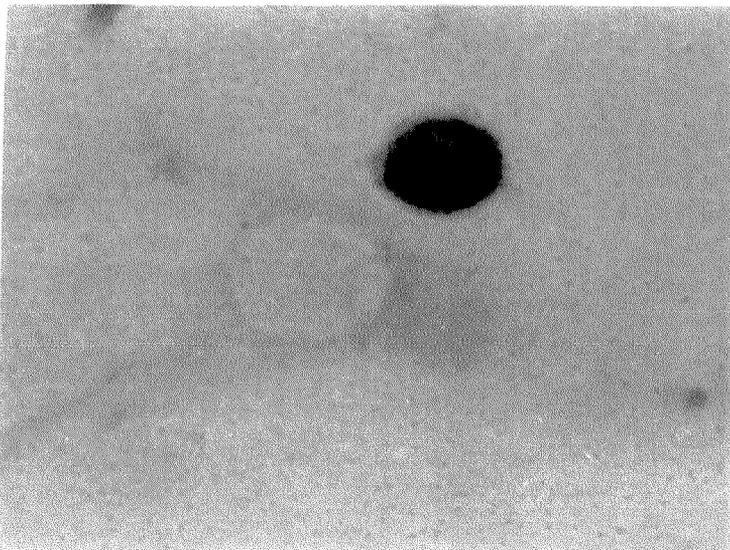


Figura 9. Presença de forma leveduriforme da cepa Pb113 do *P. brasiliensis* inviabilizado pelo formol, aderido à célula HeLa. Revelação pelo PAS. Aumento: 1000 x.

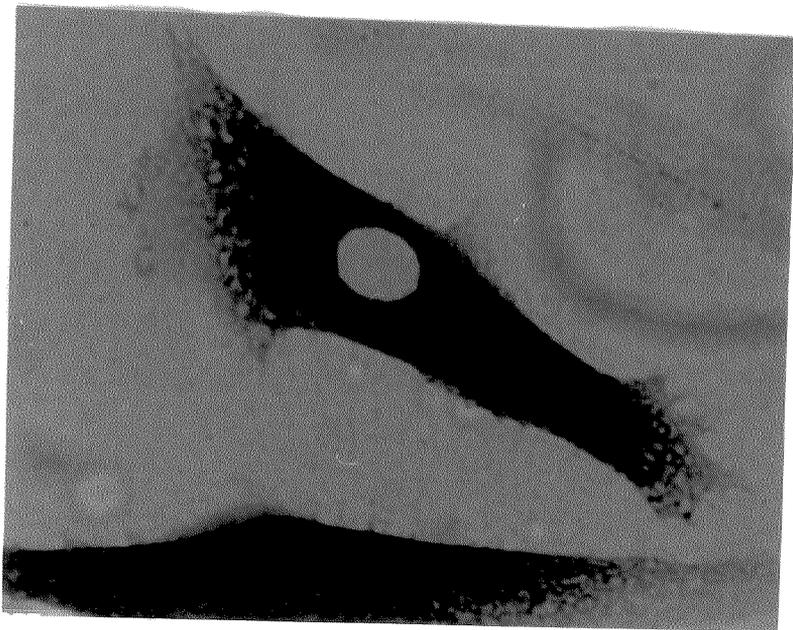
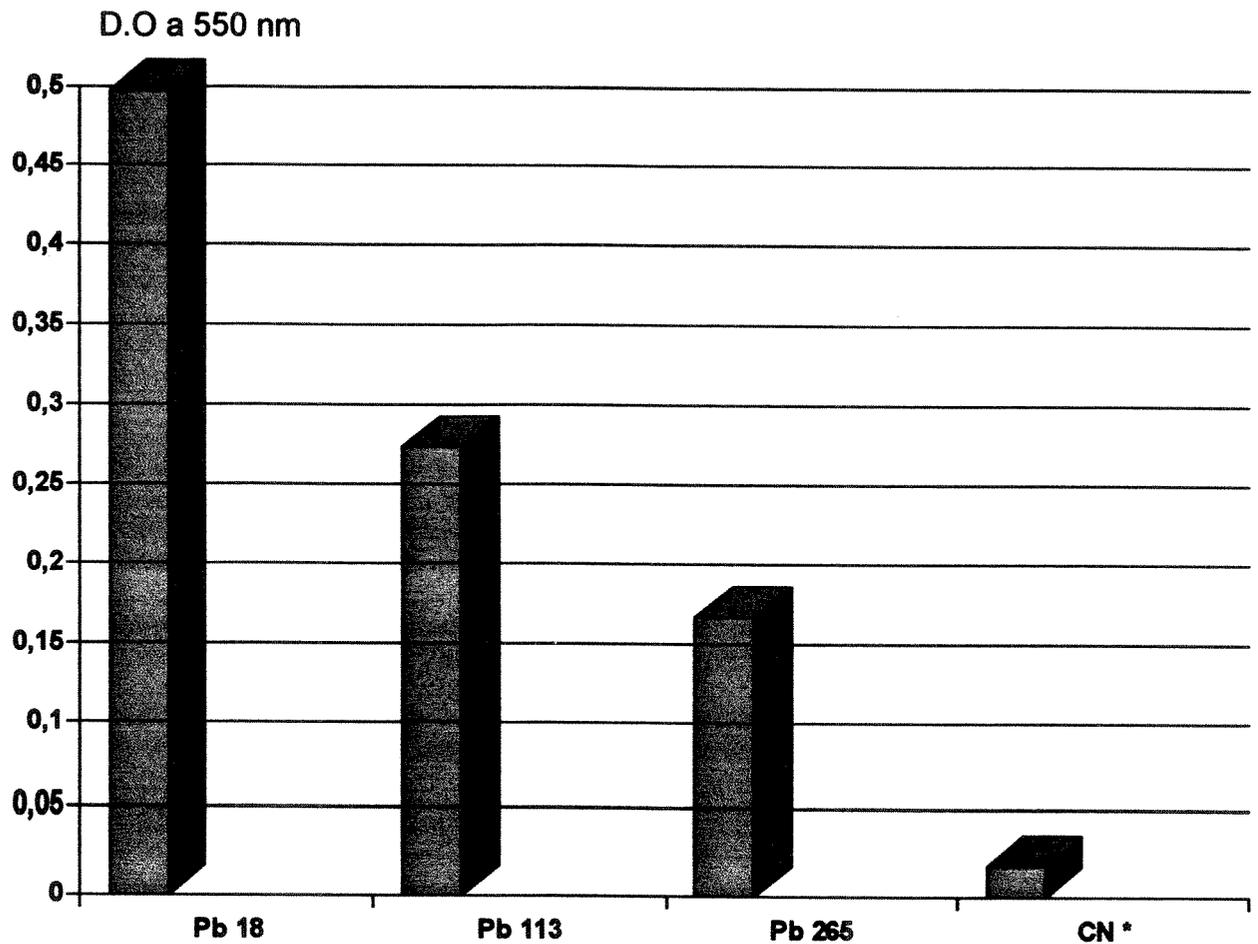


Figura 10. Observação de forma intracelular da cepa Pb113 apresentando apenas a parede celular. Coloração por May-Grünwald/Giemsa. Aumento 1000x.



CN*: Células não infectadas

Figura 11. Determinação da adesão de cepas do *P. brasiliensis* às células HeLa, através de ensaio imunoenzimático.

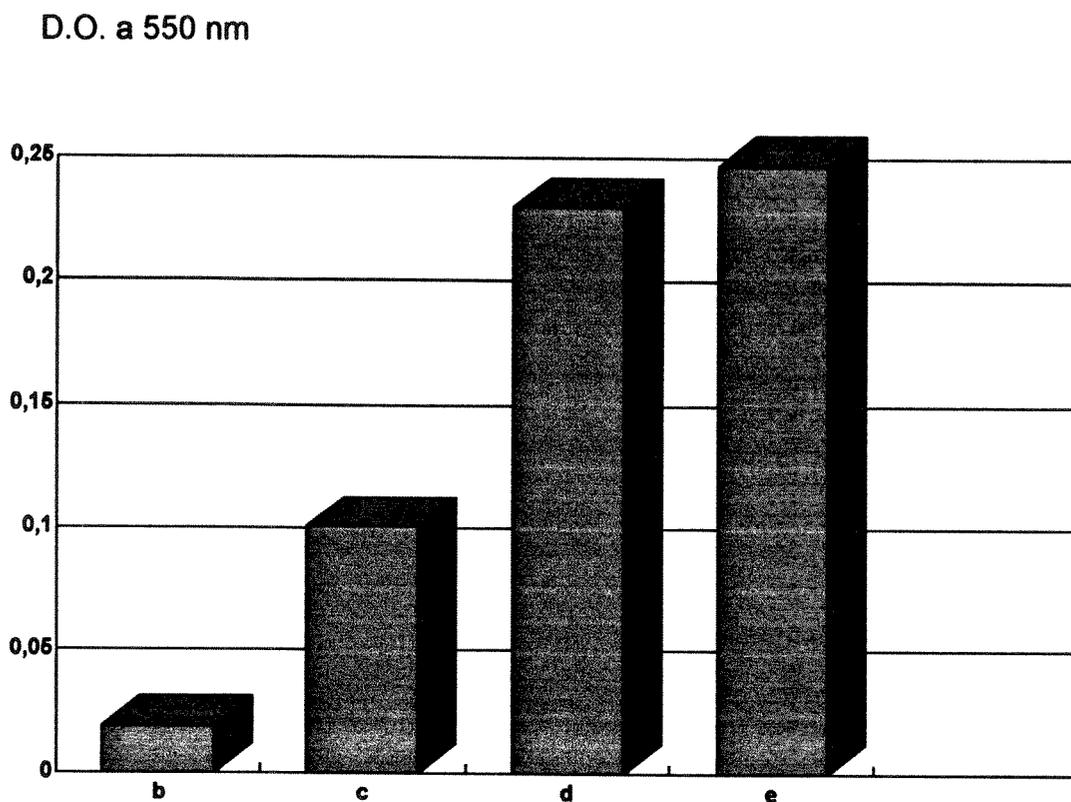


Figura 12. Inibição da adesão da cepa Pb113 do *P. brasiliensis* às células HeLa, após tratamento com diferentes soros. Determinação quantitativa por ensaio imunoenzimático: Legenda: a- células não infectadas (0,01= coluna não apresentada); b- inibição com “pool” de soros de pacientes; c- inibição pelo soro anti-gp43, d- inibição pelo soro normal de coelho, e- infecção com o Pb113 sem tratamento.

Tabela 1. Número total de células de diferentes cepas do *P. brasiliensis*, após 24 horas de infecção às células HeLa.

Cepas do <i>P. brasiliensis</i>	Número de células fúngicas/mL determinado após lise das células infectadas.*
Pb339	$0,23 \times 10^4$
Pb113	$1,75 \times 10^4$
Pb265	$4,25 \times 10^4$
Pb18	$8,12 \times 10^4$
Pb6182	$20,37 \times 10^4$

* Média obtida após contagem em câmara de Neubauer. Resultados a partir de três experimentos realizados (n=3).

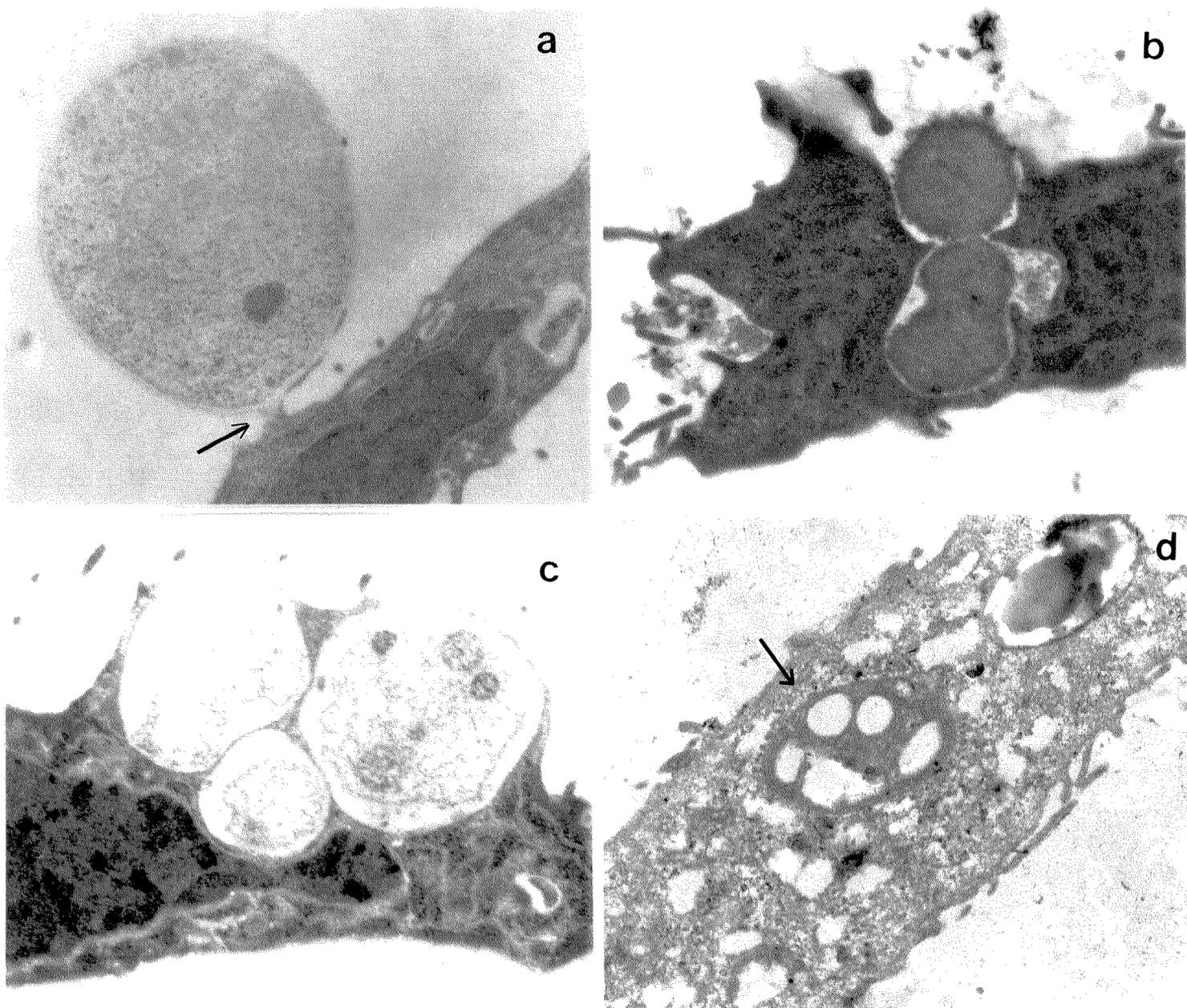
** Inóculo inicial : 1×10^6 leveduras por mL.

Tabela 2. Determinação do número de unidades formadoras de colônia (*u.f.c.*).

Concentração do ketoconazol ($\mu\text{g/mL}$)	n° de <i>u.f.c.</i> após 20 dias de cultivo	
	sobrenadante de cultura	lisado celular
0	**	13
10	5	**
15	0	4
20	0	0

* Inóculo inicial: 50 *u.f.c.*

** dados não obtidos



Figuras 13: Fotomicrografias de provável sequência de infecção da cepa Pb113 do *P. brasiliensis* às células HeLa. Legenda: a- célula aderida apresentando entre o fungo e o hospedeiro com formação semelhante a um pedestal (seta) ; b- formas fúngicas sendo fagocitadas; c- células fagocitadas no interior de vacúolos citoplasmáticos; d- forma protoplasmática do *P. brasiliensis* (seta) fora de vacúolo citoplasmático. (Períodos de infecção: a- 3 horas; b e c- 5 horas; d- 24 horas).

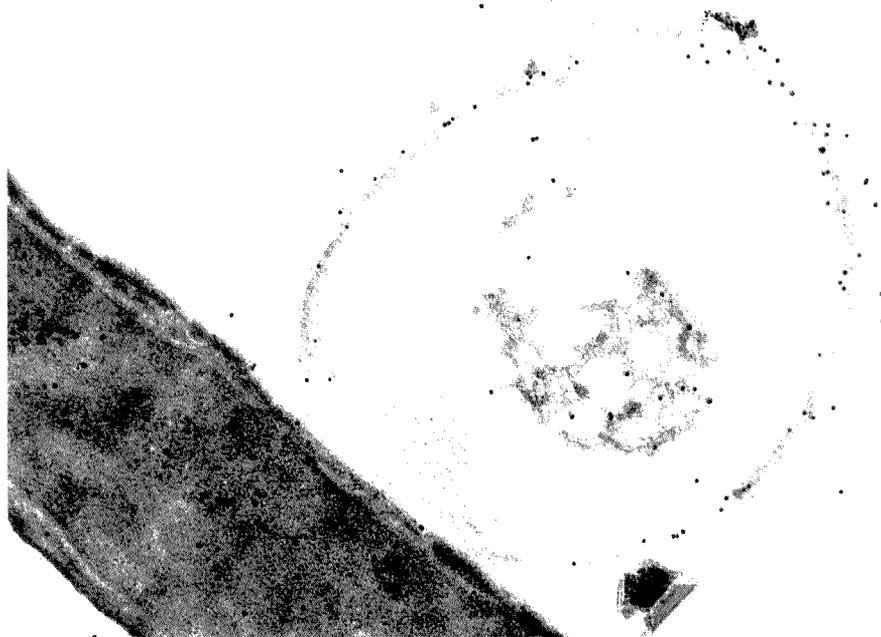
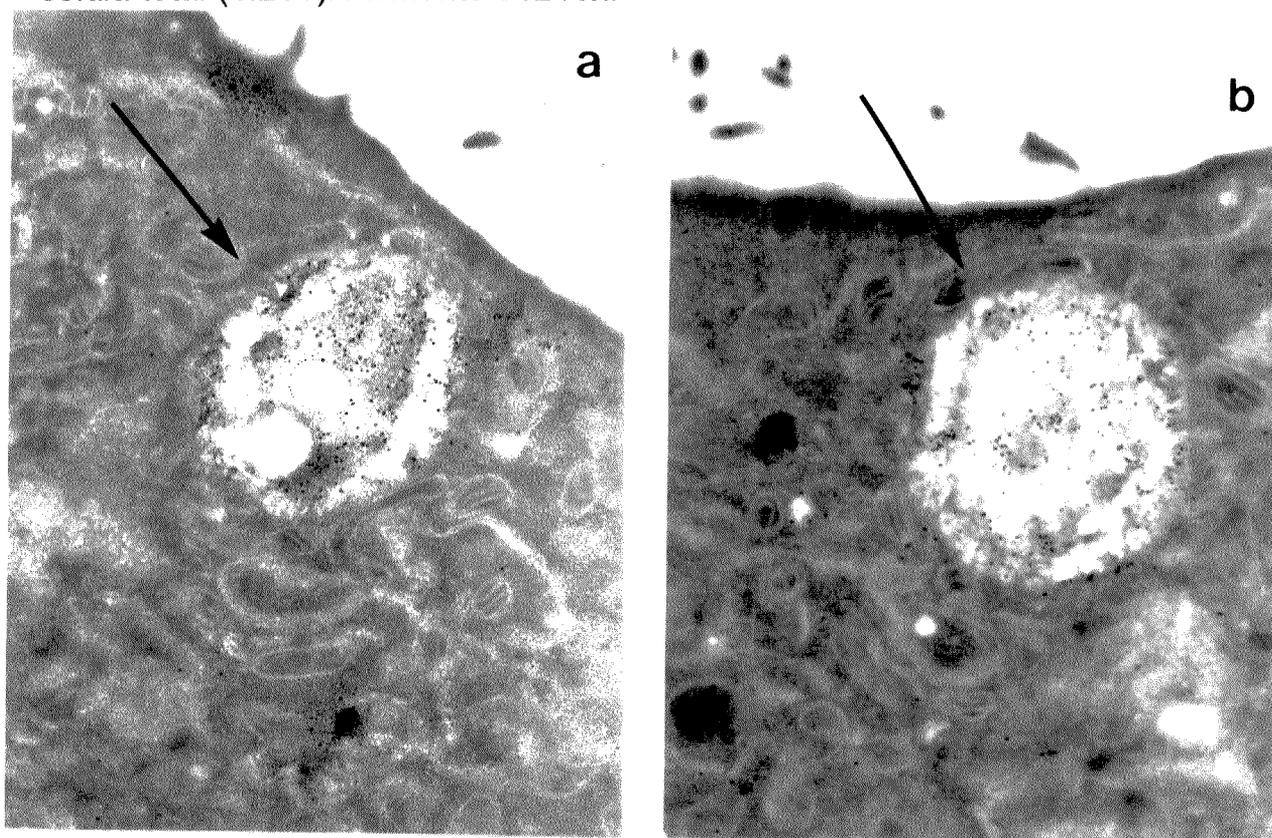


Figura 14. Forma fúngica da cepa Pb113 do *P. brasiliensis* aderida à superfície da célula HeLa, após reação de “immunegold” utilizando soro anti-célula total (1:200). Aumento 31218x.



Figuras 15. Fotomicrografias reveladas por “immunegold” de formas intracelulares da cepa Pb113 do *P. brasiliensis* no citoplasma da célula HeLa (setas), após reação com soro anti-célula total (1:200). Aumento 28380x (a) e 12528x (b).



Figura 16. Observação de intensa reação e presença de partículas de ouro coloidal no interior do núcleo da célula HeLa infectada, após revelação pelo “immunegold” utilizando-se soro anti-gp43 (1:200). Aumento 37840x.

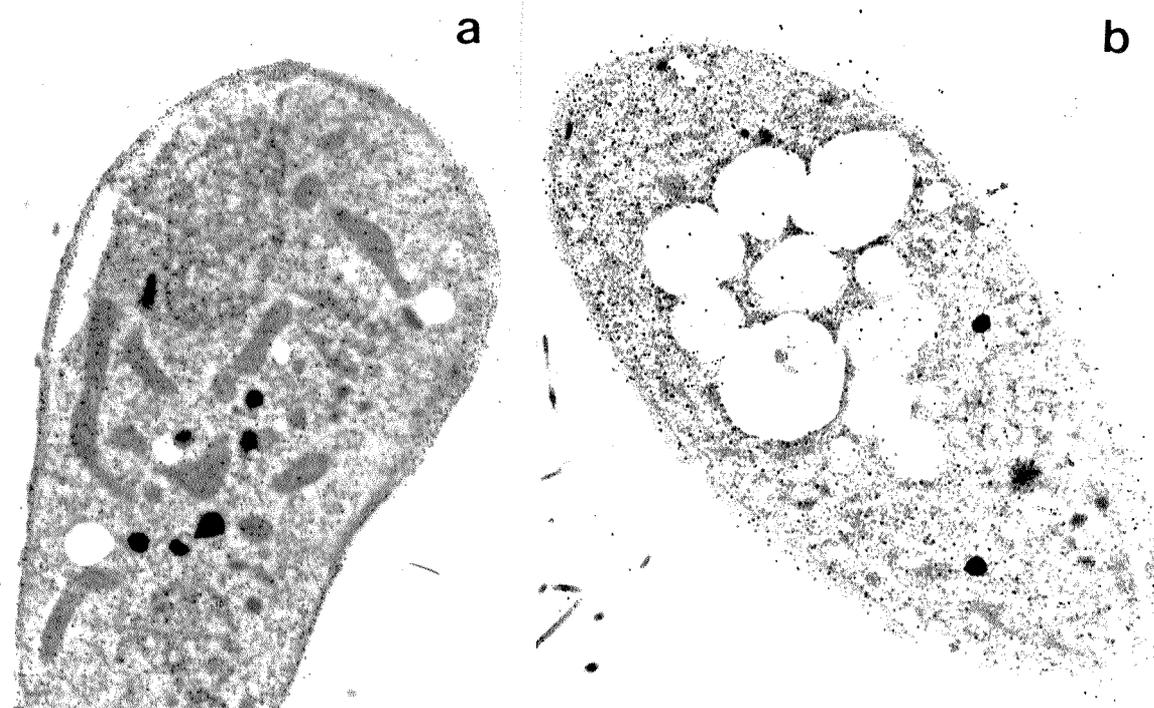


Figura 17. Fotomicrografias apresentando formas extracelulares do *P. brasiliensis* (cepa Pb113) reveladas pela técnica de “immunegold” utilizando-se soro anti-célula total (a) e soro anti-filtrado de cultura (b). Aumentos 12096x e 12960x, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

Virulência ou patogenicidade é um conceito atualmente definido como a habilidade de um microrganismo em poder estabelecer no hospedeiro um quadro infeccioso. Quando, durante este processo ocorre produção de sintomas neste último, a infecção leva a um quadro de doença.

A evolução deste processo é sempre o resultado entre a interação dos fatores de virulência do agente infeccioso e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Se as defesas deste último forem adequadas, o microrganismo é eliminado ou pode conviver em aparente harmonia com o hospedeiro, na ausência de sintomatologia por prolongados períodos de tempo. Caso contrário, o processo infeccioso leva à alterações prejudiciais para o hospedeiro, estabelecendo-se uma relação de parasitismo.

Normalmente, a patogenicidade é mediada por múltiplos fatores do microrganismo capazes de estimular diferentes respostas no hospedeiro. Com relação ao agente, para que ocorra a infecção, este deve, inicialmente, encontrar um hospedeiro que seja capaz de ser colonizado pelo mesmo, apresentando receptores específicos, penetrar a partir deste local, se difundir e multiplicar no organismo infectado podendo, então, causar danos neste processo.

Mecanismos de patogenicidade e fatores de virulência correspondem, respectivamente, às estratégias do microrganismo e aos produtos do mesmo, capazes de contribuir para sua virulência. A caracterização dos fatores de virulência de agentes infecciosos têm demonstrado uma grande pluridade de aspectos que variam, desde a comprovação da capacidade de adesão às superfícies mucosas, até a

produção de proteínas que apresentem conexões claras e diretas com o processo infeccioso.

No estudo das doenças infecciosas, apenas quando se conhece os mecanismos e os fatores de virulência dos agentes é que se torna possível o entendimento da doença e de sua evolução. Isto somado à compreensão do envolvimento da resposta do hospedeiro, ou como defesa eficaz do mesmo, ou colaborando na formação das lesões inflamatórias.

Todo este esclarecimento sobre o processo infeccioso fornece subsídios necessários para uma possível intervenção terapêutica, além de desenvolvimento e aplicação de medidas preventivas contra a doença.

Considerando-se na PCM o produto da relação entre o *P. brasiliensis* e o hospedeiro, onde um quadro de parasitismo e doença foi estabelecido após a infecção, muito já se conhece a respeito da resposta inflamatória envolvendo os mecanismos de defesa inespecíficos e específicos no homem e em modelos animais utilizados no estudo desta doença (Franco, 1986; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1993; Cano, *et al.*, 1996; Figueiredo, *et al.*, 1996; Salomão, *et al.*, 1996).

Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos de patogenicidade e sobre os fatores de virulência do *P. brasiliensis*. Trabalhos já desenvolvidos, utilizando modelos animais, apesar de muito adequados para a reprodução de alguns aspectos desta doença, não permitiram que os mecanismos básicos de virulência fossem esclarecidos e que os fatores envolvidos fossem individualmente avaliados. Sendo a PCM uma moléstia essencialmente humana, estes modelos animais, além de complexos, são representados por outros mamíferos que diferem do hospedeiro natural em muitos aspectos, tais como fisiologia, hábitos e microflora residente. Esta multiplicidade de fatores dificulta uma avaliação objetiva da patogenicidade do *P. brasiliensis* nestes experimentos.

Nos primeiros estudos sobre a PCM experimental, Splendore (1910) ao relatar novos casos desta enfermidade faz referência sobre a inoculação de cobaio, gato, cão e macaco, com material colhido de lesões humanas, sem ter obtido sucesso na época. O primeiro experimento bem sucedido, comentado na literatura, é de Montenegro (1927) que conseguiu provocar orquite nos animais inoculados. Desde então, a PCM experimental vem se desenvolvendo amplamente, permitindo estudos sobre a morfologia do fungo na forma parasitária, resposta tecidual de diferentes órgãos, vias de disseminação e respostas celular e humoral do hospedeiro. Dentre os vários modelos animais estudados, inicialmente ficou demonstrado que o hamster e o rato albino eram mais susceptíveis que o cobaio e o camundongo, à infecção experimental pelo *P. brasiliensis* (Guimarães, 1964).

Utilizando inoculações nestes animais, trabalhos de San-Blas *et al.* (1977a) avaliaram a virulência de diferentes cepas, tendo como parâmetro a recuperação do fungo a partir dos animais infectados. Nesta avaliação, uma tentativa de classificação deste agente, em cepas mais ou menos virulentas, foi baseada na composição bioquímica da parede do fungo. Contudo, neste trabalho não foi estudada a patologia das lesões nos animais inoculados com as diferentes cepas.

Em trabalhos anteriores, Brito and Fava Netto (1963) já haviam demonstrado diferença na evolução das lesões, após passagens sucessivas do agente em animais da mesma espécie, relacionando este fato com um aumento da virulência da cepa inoculada. Por outro lado, uma atenuação da virulência do fungo foi demonstrada em cepas mantidas em cultura por tempo prolongado (Rezkallah-Iwasso, 1981).

Em outro estudo, San-Blas *et al.* (1977b) avaliando cepas do *P. brasiliensis* mantidas em cultura por longos períodos de tempo, também observaram diminuição da virulência, realizando uma análise da composição

bioquímica da parede do fungo. Desta forma, os autores verificaram que cepas virulentas possuíam, em sua parede, o polissacáride α -1,3 glucana, que na mutante avirulenta IVICPb9 havia sido substituído por α -1,3 manana.

Inoculando-se camundongos e hamsters por via intraperitoneal, com ambas as cepas, foi estudada a virulência do *P. brasiliensis*, utilizando-se como critério a capacidade de disseminação do mesmo no hospedeiro e a possibilidade de recuperação de leveduras viáveis à partir de diferentes órgãos infectados. Avaliando-se mensalmente os animais inoculados, durante um período de até 6 meses após a infecção, não foi observada disseminação do agente nem se conseguiu recuperação de células fúngicas, em experimentos realizados com a cepa mutante, ao contrário das cepas virulentas. Foi sugerido, então, que a diminuição da virulência da cepa IVICPb9 estaria associada ao desaparecimento da α -1,3 glucana, que deveria atuar como uma camada protetora do fungo contra enzimas digestivas dos leucócitos e macrófagos do hospedeiro.

Comprovação destes dados foi relatada por San-Blas (1982), onde a parede celular do fungo foi realmente considerada um fator de virulência do *P. brasiliensis*, por conferir-lhe resistência a alguns dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Isto porque os fagócitos humanos produzem a enzima β -glucanase sendo, portanto, capazes de digerir apenas a β -1,3 glucana, presente nas formas miceliais do fungo. Assim sendo, a transição do fungo para formas leveduriformes, no início da infecção, evitaria a ação destas enzimas sobre o agente, promovendo o parasitismo do *P. brasiliensis*.

Recentemente, Vicentini *et al.* (1994), tendo como base trabalhos de outros autores que relacionaram a interação de diferentes células tumorais com proteínas da matrix extracelular e que demonstravam que a laminina poderia influenciar na patogênese de vários microrganismos, desenvolveram

estudos sobre a ligação do *P. brasiliensis* a esta última proteína. Os autores utilizaram, nesta abordagem, como modelo de estudo as células MDCK (células de rim de cachorro Madin-Darby) e laminina obtida de camundongo. Neste trabalho os autores, inicialmente, marcaram a laminina com ^{125}I e incubaram uma solução desta proteína com as cepas PbB-339 e Pb18 do *P. brasiliensis*. A seguir, células MDCK foram infectadas com este inóculo verificando-se, após 18 horas de experimento, um aumento significativo da aderência do fungo recoberto com a laminina, às mesmas.

Paralelamente, os autores verificaram aumento da virulência da cepa apresentando este revestimento, após inoculações no testículo de hamster e, por provas de "immunoblotting", comprovaram que a laminina tinha a capacidade de se ligar à gp43. Com base nestes dados, Vicentini *et al.* (1994) propuseram que esta proteína estaria envolvida na ligação do *P. brasiliensis* à elementos da matrix extracelular, sugerindo que este revestimento poderia explicar, inclusive, a disseminação do fungo no hospedeiro a partir do foco infeccioso inicial.

No que diz respeito ao modelo experimental utilizado no presente trabalho, representado por cultura de células de mamíferos, este tem auxiliado de forma significativa no estudo da patogenicidade de microrganismos. Isto por representar um sistema capaz de ser controlado, onde fatores isolados, abordando a interação entre a célula de cultura e o agente infeccioso, podem ser investigados de forma mais clara e objetiva.

Contudo, apesar destas vantagens, este modelo também apresenta suas limitações e requer que os resultados obtidos sejam devidamente analisados e comprovados em modelos animais.

Nestas culturas, apenas um tipo celular está presente, podendo-se reproduzir o cultivo e os experimentos em condições padronizadas. Com relação às células utilizadas em cultura, estas são normalmente derivadas de

tumores apresentando intensa divisão celular e muitas modificações genéticas, devidas às mutações ocorridas durante o processo de imortalização celular, incluindo rearranjos e duplicações no genoma. Estas modificações não são facilmente visíveis e fáceis de serem reproduzidas. Com relação aos receptores para adesinas, as células em cultura podem expressar, também, preferencialmente receptores secundários, que no hospedeiro podem ser de menor afinidade.

Porém, uma vez tendo sido um mecanismo ou um fenômeno observado em experimentos utilizando modelos celulares, torna-se possível se estabelecer uma hipótese capaz de ser averiguada em animais. Desta forma, dados relevantes sobre adesão e invasão do *P. brasiliensis* às culturas celulares já foram obtidos em trabalho de Mendes-Giannini *et al.* (1994), onde a virulência de formas leveduriformes do *P. brasiliensis*, sem nenhum tratamento prévio do fungo, foram estudadas em experimentos *in vitro* utilizando células Vero. Neste trabalho, as culturas foram inoculadas com suspensão padronizada da cepa Pb113, verificando-se o processo de infecção após diferentes períodos de tempo, que variaram de 3 horas até 12 dias. Observações dos preparados fixados e corados, em microscopia ótica, permitiram supor-se a existência de um processo sucessivo que envolveria inicialmente a adesão do fungo às células Vero, seguida de invasão e posterior infecção das células de cultura adjacentes.

Sucessivamente, verificando-se a virulência de diferentes cepas do *P. brasiliensis* após infecções de células HeLa, pode-se demonstrar pelas observações em microscopia ótica apresentados dos preparados revelados por May-Grünwald e PAS, que todas as cepas estudadas apresentaram os mecanismos de adesão e invasão celular. Com base nestes resultados, pode-se supor, portanto, serem estes processos mecanismos gerais de virulência do

P. brasiliensis que, provavelmente, devem ocorrer durante a infecção no hospedeiro.

Verificando-se a cinética destes processos por provas de infecção realizadas em diferentes períodos de tempo, pode-se observar células da cepa Pb113 aderidas à cultura, decorridos apenas 30 minutos da inoculação. Portanto, um breve período de tempo já foi suficiente para que o mecanismo de adesão ocorresse, devendo indicar a participação de adesinas específicas do fungo neste processo capazes de serem reconhecidas pelos receptores da célula hospedeira. A observação de formas do fungo no interior do citoplasma das células HeLa, em períodos de 3 horas de infecção, evidenciaram um processo de invasão celular.

Apesar das limitações, as inúmeras observações em microscopia ótica realizadas nos preparados revelados pelas técnicas de coloração, foram muito sugestivas da ocorrência dos dois mecanismos distintos, que aparentemente se sucediam: o primeiro, relacionado à adesão e o segundo, à invasão celular pelo *P. brasiliensis*. Naturalmente, a presença de brotamentos ligados às formas maiores e arredondadas, correspondentes aos blastoconídios do *P. brasiliensis*, dificultaram em algumas observações a distinção entre adesão e invasão, sugerindo em muitos campos ter-se a presença simultânea destes dois processos em continuidade com as células HeLa.

Nos preparados revelados pela técnica de imunofluorescência indireta pode-se comprovar a presença nítida de formas do *P. brasiliensis*, aderidas às células HeLa, apresentando morfologia com multibrotamentos, característicos deste fungo em sua forma parasitária. Estas formas mencionadas foram frequentemente observadas ao redor da célula hospedeira, comprovando-se a adesão. Porém, com relação às formas intracelulares, uma vez que nestas reações não foi realizado tratamento de

permeabilização das células HeLa, apenas a observação de células fúngicas com menor intensidade fluorescente, sugestivas de invasão celular puderam ser verificadas.

Dentre as formas analisadas através de microscopia ótica, algumas apresentavam somente a parede celular aparentemente íntegra, porém com visível degeneração citoplasmática. Estas estruturas são descritas na literatura e denominadas de células "ghost", sendo encontradas em cortes histológicos de lesões da PCM experimental (Coelho *et al.*, 1994). Morfologia semelhante também foi observada em células do *P. brasiliensis* fagocitadas por macrófagos ativados (Brummer *et al.*, 1989).

Abordando-se o aspecto da relação parasita-hospedeiro, quanto ao mecanismo de adesão, verificou-se pelos resultados obtidos que este é um processo que deve envolver interações físico-químicas entre as estruturas do fungo e receptores da célula HeLa. Isto porque foi comprovado que, tanto o hospedeiro como o agente não precisam estar metabolicamente ativos para que a adesão ocorra.

Por outro lado, o processo de invasão exige a participação ativa tanto do hospedeiro como do parasita, que poderiam interagir através de sinais representados provavelmente por proteínas secretadas pelo *P. brasiliensis*, capazes de se ligarem aos receptores da célula HeLa, estimulando nesta o mecanismo de fagocitose. Desta forma, esta célula epitelial, normalmente não fagocítica, se transformaria em um fagócito "não profissional". Relação semelhante já foi anteriormente proposta e demonstrada, tanto em trabalhos que estudaram a invasão de cepas da *Shigella flexeri* a culturas celulares (Kadurugamuwa *et al.*, 1991), como em estudos sobre formas parasitárias intracelulares do *Trypanosoma cruzi* (Kihlström 1977), dentre outros.

Objetivando-se uma quantificação do processo de adesão, o teste imunoenzimático foi padronizado e desenvolvido para a revelação de provas

de infecção, comparando-se a intensidade da reação com relação às diferentes cepas do *P. brasiliensis* estudadas.

Desta forma, verificou-se uma correlação direta entre os resultados obtidos quanto a um aumento da adesão *in vitro*, com os descritos avaliando-se a virulência destas mesmas cepas, em experimentos realizados *in vivo*. Isto porque pelo apresentado, a cepa Pb18 apresentou uma maior capacidade adesiva às células HeLa, que as cepas Pb113 e Pb265. Em trabalhos anteriores desenvolvidos por Kashino *et al* (1985) e Zacharias *et al.* (1986) após inoculações em animais, a cepa Pb18 demonstrou ser a mais virulenta, enquanto a cepa Pb265 foi considerada avirulenta nestes animais. Resultados semelhantes foram também obtidos por Hanna *et al.* (1996) que compararam a adesão destas mesmas cepas em modelo experimental *in vitro*, realizado com cultura de células Vero. Traçando-se um paralelo entre os dados verificados *in vivo* e *in vitro* pode-se supor que, no hospedeiro, provavelmente a maior virulência da cepa Pb18 seja devida a uma maior capacidade de adesão e conseqüente colonização no hospedeiro infectado. Ao contrário, a cepa Pb265, por ser menos adesiva, seria menos virulenta.

Por outro lado, nas provas de inibição da adesão por diferentes soros verificou-se que o "pool" de soro de pacientes com PCM foi capaz de inibir mais intensamente a adesão, quando comparado ao soro anti-gp43. Porém, não foi verificada inibição total do processo mesmo em altas concentrações dos soros utilizados, sugerindo que no hospedeiro a resposta humoral não deve ser eficiente para que este importante mecanismo de virulência seja inativado.

Comprovando-se o mecanismo de adesão do *P. brasiliensis*, em observações por Microscópio de Varredura, em trabalho semelhante desenvolvido em cultura de células Vero (Uemura *et al.*, 1996), foi verificada a presença de inúmeras formas do fungo aderidas à superfície das células.

Também nestes preparados alterações na superfície da célula hospedeira foram observadas, sugerindo uma resposta celular do hospedeiro ao mecanismo de adesão do fungo.

No que diz respeito a determinação de *u.f.c.*, esta abordagem já havia sido realizada em vários experimentos avaliando-se a diferenciação entre bactérias extra e intracelulares, após infecção de culturas celulares com bactérias patogênicas apresentando mecanismos de invasão, tendo-se demonstrado ser uma técnica reprodutível e eficiente (Tang *et al.*, 1993). Porém, pelos resultados obtidos neste trabalho esta metodologia, quando aplicada em estudos sobre a viabilidade do *P. brasiliensis*, apresentou baixo rendimento, além da necessidade de prolongado período de incubação. Em trabalhos desenvolvidos por Gohman-Yar *et al.* (1980) e Restrepo *et al.* (1982), estes autores consideraram ser esta metodologia ineficiente, para a determinação da viabilidade do *P. brasiliensis*, uma vez que pequeno crescimento do fungo foi obtido. Posteriormente, Castaneda *et al.* (1992) e Singer-Vermes *et al.* (1992) obtiveram uma eficiência mais elevada desta metodologia, após inoculação da cepa fúngica em meio de cultura suplementado com soro de cavalo e filtrado de cultura do *P. brasiliensis*, levando-se a supor que fatores ainda não esclarecidos devam interferir neste cultivo.

Contudo, a comprovação de formas viáveis do *P. brasiliensis* no interior das células HeLa infectadas pode ser verificado pela obtenção de *u.f.c.*, em experimentos utilizando tratamento das culturas infectadas por agentes antifúngicos. Porém, os resultados apenas demonstraram a presença destas células fúngicas intracelulares viáveis, tendo sido inadequados quanto à quantificação das mesmas.

Apesar do processo de invasão ter sido fortemente sugerido pelos resultados e observações iniciais, provas incontestáveis deste mecanismo só

foram obtidas através das observações realizadas em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Somente através destes preparados, aspectos e características minuciosas sobre a infecção do fungo às células HeLa, puderam ser estudados. Correlacionando-se todos os resultados obtidos, através de microscopia ótica e eletrônica, pode-se concluir que durante o processo de infecção o fungo e a célula hospedeira interagem e sofrem alterações em suas morfologias celulares.

Analisando-se em MET os processos de adesão e invasão do fungo, pode-se supor que após a adesão do *P. brasiliensis* às células HeLa, este é fagocitado pela célula hospedeira, que se modifica emitindo prolongamentos citoplasmáticos. Este mecanismo apresentou-se semelhante aos observados em “fagócitos não profissionais” em relação à bactéria *Salmonella typhimurium* (Kihlström, 1977).

Pela sequência das figuras apresentadas neste trabalho, verificou-se a presença de um processo de fagocitose englobando células fúngicas. Todo este mecanismo parece exigir grandes modificações, tanto no citoesqueleto da célula hospedeira, como no fungo, uma vez que algumas formas encontradas do *P. brasiliensis*, intracitoplasmáticas, apresentaram-se bastante alteradas.

Com relação às formas extracelulares do *P. brasiliensis* observou-se, neste trabalho, frequentemente a presença de uma parede celular bem definida. Porém, nas formas intracelulares deste agente, fagocitadas, a ausência da parede celular pareceu ser a ocorrência predominante.

Quanto à presença do fungo intracelular na forma de protoplasto, esta já havia sido relatada, anteriormente, em trabalho de Brito *et al.* (1972), estudando infecção do *P. brasiliensis* às membranas cório-alantóides de embrião de galinha. Neste estudo, os autores sugeriram que o *P. brasiliensis* deveria, inicialmente, apresentar-se na forma protoplasmática para penetrar

nas células do hospedeiro e que a seguir, a parede celular do fungo deveria ser regenerada, adquirindo, então, sua morfologia característica.

No que diz respeito às observações em MET dos preparados revelados por ensaio imunocitoquímico, os resultados apresentados foram essenciais para a comprovação do parasitismo intracelular do *P. brasiliensis*. Isto, devido à frequente observação de formas não características do fungo no interior das células hospedeiras, o que poderia gerar dúvidas .

Porém, pela positividade das reações, estas formas puderam ser conclusivamente reveladas e identificadas como o *P. brasiliensis*. A especificidade desta reação permitiu que estas formas fossem evidenciadas comprovando serem, realmente, correspondentes ao *P. brasiliensis* intracelular, sendo possível que possam as mesmas passarem despercebidas em exames microscópicos, pesquisando-se a presença deste agente em cortes histológicos.

A marcação com ouro coloidal, obtida após reações com os soros anti-célula total e anti-filtrado de cultura permitiu evidenciar-se formas alteradas do fungo também no interior de vacúolos citoplasmáticos. Traçando-se uma analogia com as observações clínicas descritas na literatura, a possibilidade da existência de formas intracelulares viáveis do *P. brasiliensis* em pacientes com PCM, é sugerida fortemente pelos resultados apresentados neste trabalho fato que, inclusive, poderia esclarecer as causas das frequentes recidivas descritas na doença.

Com relação à gp43 a provável presença desta proteinase, no núcleo da célula hospedeira invadida, é sugerida pelas observações que demonstraram reação citoquímica positiva com antígenos do *P. brasiliensis* nesta região, quando utilizou-se soro específico anti-filtrado de cultura como anticorpo primário da reação.

Tendo-se como base os resultados apresentados neste trabalho, pode-se supor a seguinte sequência de mecanismos de patogenicidade para o *P. brasiliensis*: 1- Formas leveduriformes do fungo aderem-se às células de cultura e provavelmente às do hospedeiro, através de adesinas capazes de interagir com receptores dos mesmos; 2- A seguir, produtos metabólicos do fungo devem estimular o rearranjo do citoesqueleto da célula hospedeira, que passa a se comportar como um “fagócito não profissional”; 3- Durante o processo de fagocitose, algumas formas do fungo deixam de expressar sua parede celular e penetram no citoplasma da célula do hospedeiro no interior de vacúolos. 4- Entretanto, algumas células fúngicas permanecem expressando a parede celular; 5- Nem todas as células fúngicas sobrevivem ao processo de fagocitose, provavelmente pela ação de enzimas do vacúolo intracitoplasmático; 6- Porém, algumas formas conseguem resistir, liberam-se do vacúolo e se estabelecem no interior do citoplasma da célula hospedeira, apresentando-se sob a forma de protoplasto.

Pelo apresentado, esperamos ter contribuído para o esclarecimento dos possíveis mecanismos básicos de patogenicidade do *P. brasiliensis* aguardando que, em experimentos a serem realizados *in vivo*, possam as hipóteses propostas neste trabalho serem adequadamente testadas e avaliadas.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, podemos concluir que:

1. A cultura de células HeLa representa um modelo adequado para o estudo da patogenicidade do *P. brasiliensis*.
2. Todas as cepas do *P. brasiliensis* estudadas apresentaram no processo de infecção em cultura de células HeLa os mecanismos de adesão e invasão.
3. O processo de infecção do fungo às células HeLa, por ter sido observado em um período mínimo de até 30 minutos após infecção, demonstra grande afinidade existente entre adesinas do agente e receptores celulares.
4. As cepas do *P. brasiliensis* apresentaram diferentes graus de infectividade, obtendo-se maior índice de adesão para a cepa Pb18, seguida pela cepa Pb113 e Pb265. Esta maior ou menor capacidade adesiva deve estar relacionada ao grau de patogenicidade observado para estas mesmas cepas, em experimentos *in vivo* utilizando animais, uma vez que maior adesão deve propiciar colonização mais intensa no hospedeiro.
5. O pool de soros de pacientes de PCM foi mais eficiente na inibição da adesão dos fungos às células HeLa do que o soro anti-gp43. Entretanto, nas condições dos experimentos realizados, não se obteve inibição total deste processo, sugerindo que no hospedeiro a resposta humoral não deve ser um mecanismo eficiente de proteção.

6. O processo de adesão do fungo às células HeLa ocorre independentemente de estarem, agente e hospedeiro, metabolicamente ativos. Estes resultados sugerem a presença de adesinas e características celulares do fungo, capazes de promover adesão e colonização eficiente no hospedeiro.
7. A comprovação do mecanismo de invasão do *P. brasiliensis* às células de cultura HeLa demonstra que, na relação do agente com o hospedeiro, este é capaz de estimular um processo de fagocitose em “fagócitos não profissionais”.
8. Pode-se comprovar a presença de células intracelulares viáveis do *P. brasiliensis* em experimentos realizados para a determinação de unidades formadoras de colônias. Desta forma, concluiu-se que este agente, ao invadir a célula hospedeira, é capaz de se manter metabolicamente ativo. Este fato pode, inclusive, embasar as causas das frequentes recidivas observadas em pacientes com PCM.
9. Ao penetrar na célula hospedeira, o *P. brasiliensis* é envolvido em um vacúolo, mas por motivos não esclarecidos neste trabalho, algumas destas formas parecem “escapar” do mesmo, enquanto outras permanecem e são degeneradas.
10. Dentre as formas intravacuolares do *P. brasiliensis* verificou-se células aparentemente degeneradas do fungo, apresentando parede celular.
11. Ao penetrar na célula hospedeira, as formas intracelulares do *P. brasiliensis* permanecem apenas no citoplasma, sendo que na grande

maioria das observações verificou-se proximidade destas formas ao núcleo das células invadidas.

12. Em nenhuma das observações realizadas verificou-se a presença de formas fúngicas no interior do núcleo das células HeLa. Contudo, marcação significativa desta região foi verificada pela técnica de "immunegold" revelada com soro anti-gp43. Estes dados são sugestivos da presença desta proteinase na região nuclear. Estes resultados sugerem que a gp43 pode ter participação no processo de invasão intracelular deste agente, atuando como um fator de virulência do *P. brasiliensis*, por mecanismos que carecem de ser esclarecidos.

RESUMO

O *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), fungo dimórfico, é o agente etiológico de micose sistêmica, a paracoccidioidomicose (PCM). Esta doença, invasiva no homem, é endêmica na América Latina, principalmente no Brasil, Venezuela e Colômbia. Os mecanismos de patogenicidade deste fungo ainda não estão bem esclarecidos, porém, existem indícios de que a constituição da parede celular e a produção de antígenos solúveis, como a glicoproteína de 43 kDa (gp43), sejam fatores de virulência responsáveis pelo seu estabelecimento no hospedeiro. Neste sentido, foram realizados estudos *in vitro* para avaliar possíveis mecanismos e fatores de virulência envolvendo adesão e invasão celular. No presente trabalho, foi analisado o processo de infecção de cinco diferentes cepas do *P. brasiliensis* em células HeLa (adenocarcinoma cervical humano) e revelados por diferentes técnicas de coloração (May-Grünwald/Giemsa, PAS e Imunofluorescência Indireta). Através de observações em microscopia óptica destas preparações, verificou-se que todas as cepas aderiram e invadiram as células em cultura. Em provas imunoenzimáticas, observou-se diferenças quanto a concentração de células fúngicas aderidas às células HeLa. Desta forma, a cepa Pb18 apresentou maior índice de adesão, seguida pelas cepas Pb113 e Pb265. Estes dados apresentam concordância aos diferentes graus de patogenicidade, já descritos na literatura, para estas cepas em experimentos *in vivo*. Ainda por esta metodologia, foi analisada a inibição da adesão do fungo através de tratamento prévio com diferentes soros imunes (anti-gp43 e "pool" de soros de pacientes com PCM). Dentre estes soros, o tratamento com o "pool" de soros de pacientes apresentou maior índice de inibição da adesão do *P. brasiliensis* em células HeLa. Ainda pela técnica de contagem de unidades formadoras de colônias (ufc) foi constatada a viabilidade das células fúngicas intracelulares. Estudos complementares foram realizados através de observações em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), onde foram observadas a avaliação do processo de infecção. Nesta abordagem, foi verificada uma provável sequência de infecção do *P. brasiliensis* às células HeLa. Devido a presença de formas intracelulares não usuais deste agente, apresentando-se como protoplastos, a utilização da técnica de "immunegold" foi conclusiva na comprovação do processo de adesão e invasão celular deste importante patógeno do nosso meio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIAGIONI, L.M.V., ORSI, S., CHAMMA, L.G., SADATSUNE, T. and FRANCO, M. (1987). Imunoglobulinas e C3 no granuloma paracoccidioidico. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, **29**:97-103.
- BLOTA, M.H.S.L. and CAMARGO, Z.P. (1993). Immunological response to cell free antigens *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with the clinical forms of paracoccidioidomycosis. J. Clin. Microbiol., **31**:671-676.
- BLUMER, S.O.; TALBERT, M. and KAUFMAN, L. (1984). Rapid and reliable method for production of a specific *Paracoccidioides brasiliensis*. Immunodiffusion test antigen. J. Clin. Microbiol., **19**: 404-407.
- BORELLI, D. (1964). Concepto de reservárea. La reducida reservarea de la paracoccidioidomycosis. Dermatol. Venez., **4**: 71.
- BRITO, T. de; CARVALHO, R.P. de S.; CASTRO, R.M. and FURTADO, J.S. (1972). Pathogenesis of experimental paracoccidioidomycosis. PAHO Scient. Publ., **254**: 257-260.
- BRITO, T. and FAVA NETTO, C. (1963). Disseminated experimental South American blastomycosis of the guinea pig. A pathologic and immunologic study. Path. et Microbiol. (Basel), **26**:29-43.
- BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A. and STEVENS, D.A. (1989). Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: Killing and restriction of multiplication by activated macrophages. Infect. Immun., **57**:2289-2294.
- BRUMMER, E.; SUN, S.H.; HARRISON, J.L.; PERLMAN, A.M.; PHILPOTT, D.E. and STEVENS, D.A. (1990). Ultrastructure of phagocytosed

Paracoccidioides brasiliensis in nonactivated or activated macrophages. **Infect. Immun.**, **58**:2628-2636.

CALICH, V.L.G.; PURCHIO, A. and PAULA, C.R. (1978). A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, **66**(3):175-177.

CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M. SIQUEIRA, A.M. and BURGER, E. (1985). Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Path.**, **66**: 585-594.

CAMARGO, Z.P. de; GUESDON, J.L.; DROUHET, E. and IMPROVISI, L. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis comparison with counter immunoelectrophoresis and erythro-immunoassay. **Mycopathologia**, **88**: 31-37.

CAMARGO, Z.P.; TABORDA, C.P.; RODRIGUES, E.G. and TRAVASSOS, L.R. (1991). The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **J. Med. Vet. Mycol.**, **29**: 31-38.

CAMARGO, Z.P.; TABORDA, C.P.; RODRIGUES, E.G. and UNTERKIRCHER, C. (1992). *Paracoccidioides* sp. isolado das fezes de pinguim da Antártica pertence a espécie *brasiliensis*. **Rev. Arg. Micol.**, **15**(1): 32.

CAMARGO, Z.P. (1996). Passado, presente e futuro do diagnóstico da paracoccidioidomicose. In: Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis. 6, Montevideo. **Anais**:51-52.

CAMPO-AASEN, I.; CABRAL, N.A. and YARZÁBAL, L. (1980). Subcellular localization of antigen E₂ of *Paracoccidioides brasiliensis*. An immunoenzymatic electron microscopy study. **Sabouraudia**, **18**: 167-171.

CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L.M.; VAZ, C.A.C. and CALICH, V.L.G. (1996). Protective role of the CD8⁺ T cells in experimental pulmonary

paraoccidiodomycosis. In: VI Encontro Internacional sobre paracoccidiodomycosis, Montevideo. pag. 37.

CASTANEDA, E.; BRUMMER, E.; PAPPAGIANIS, D. and STEVENS, D.A. (1987). Chronic pulmonary and disseminated paracoccidiodomycosis in mice: quantitation of progression and chronicity. J. Med. Vet. Mycol., **25**: 377-387.

CASTANEDA, E.; BRUMMER, E.; PERLMAN, A.M.; Mc EWER, J.G.; STEVENS, D.A. (1992). A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency and the effect of siderophores. J. Med. Vet. Mycol., **26**:351-358..

CHACHA, J.J. (1981). Provas imunológicas com antígenos polissacarídico e proteico em doentes de paracoccidiodomycose e seus familiares. São Paulo,. Dissertação de mestrado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

CHEQUER-BOU-HABIB, D.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; FERREIRA DA CRUZ, M. F. and GALVÃO-CASTRO, B. (1989). The possible role of circulating immune complexes in the deficiency of cell-mediated immunity in paracoccidiodomycosis. Braz. J. Med. Biol. Res., **22**: 205-212.

COELHO, K. I. R.; TAKEO, K.; YAMAGUCHI, M.; SANO, A.; KURITA, N.; NISHIMURA, K. and MIYAJI, M. (1994). Experimental paracoccidiodomycosis in hamster: transmission electron microscopy of inoculation site lesion. Rev Inst. Med. Trop. São Paulo, **36**(3): 217-223.

COSTA, E.O. and FAVA NETTO, C. (1978). Contribution to the epidemiology of paracoccidiodomycosis and histoplasmosis in the State of São Paulo, Brazil. Paracoccidiodin and histoplasmin intradermic tests in domestic animals. Sabouraudia, **16**: 93.

- DYTOC, M.; GOLD, B.; LOUIE, M.; HUESCA, M.; FEDORKO, L.; CROWE, S.; LINGWOOD, C.; BRUNTON, J. and SHERMAN, P. (1993). Comparison of *Helicobacter pylori* and Attaching-Effacing *Escherichia coli* Adhesion to Eukaryotic Cells. **Infect. Immun.**, **61**: 448-456.
- ELLSWORTH, J.H.; REISS, E.; BRADLEY, R.L.; CHMEL, H. and ARMSTRONG, D. (1977). Comparative serological and cutaneous reactivity of candidal cytoplasmic proteins and mannan separated by affinity for concanavalin A. **J. Clin. Microbiol.**, **5**: 91-99.
- FAVA NETTO, C. (1955). Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídeo. São Paulo [Tese].
- FERRI, R.G. (1961). Estudo imunoquímico de antígenos intracelulares. **Hospital** (Rio de Janeiro), **59**: 917.
- FIGUEIREDO, F.; BOCCA, A.L.; UTIEL, P.V. e SILVA, C.L. (1996). Eventos imunopatológicos envolvidos na modulação da resposta inflamatória granulomatosa induzida. In VI Encuentro Internacional sobre paracoccidioidomicosis, Montevideo. pag. 38.
- FORJAZ, M.H.H. (1989). Estudo da epidemiologia da paracoccidioidomicose. Rastreamento de áreas endêmicas e de "reservareas" no Brasil, através do traçado do perfil migratório-residencial-profissional, de pacientes diagnosticados em São Paulo. Tese apresentada para obtenção de doutor pela Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
- FRANCO, M.F. (1986). Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, **25**: 5-18.
- FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L. and MOTA, N.G. da S. (1987). Paracoccidioidomycosis: a

recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 20**: 129-132.

GAILLARD, J.L.; BERCHE, P.; MOUNIER, J.; RICHARD, S. and SANSONETTI, P.J. (1987). In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. **Infect. Immun., 55**: 2822-2829.

GARCIA, N.M.; DEL NEGRO, G.M.B.; MARTINS, H. P. and LACAZ, C.S. (1987). Detection of paracoccidioidomycosis circulating antigens by the immunoelectrophoresis - immunodiffusion technique. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 29**: 327-328.

GARCIA, N.M.; DEL NEGRO, G.M.B.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T.; ASSIS, C.M. de and LACAZ, C.S. (1993). *Paracoccidioides brasiliensis*, nova cepa isolada de fezes de um pinguim (*Pygoscelis adeliae*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 35(3)**: 227-235.

GEZUELE, E. (1989). Aislamiento de *P. brasiliensis* sp. de heces de pinguino de la Antártida: In Proc. Enc. Int. Paracoccidioidomycosis, Caracas. B-2.

GIRALDO, R.; RESTREPO, A.; GUTIERREZ, F.; ROBIEDO, M.; LONDOÑO, F.; HERNANDEZ, H.; SIERRA, F. and CALLE, G. (1976). Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a mode based on the study of 46 patients. **Mycopathologia, 58**: 63-70.

GOIHMAN-YAHR, M.; PINE, L.; ALBORNOZ, M.C.; YARZÁBAL, L.; de GOMEZ, M.H.; SAN MARTIN, B.; OCANTO, A.; MOLINA, T.; CONVIT, J. (1980). Studies on plating efficiency and estimation of viability of suspensions of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Mycopathologia, 71**: 73-83.

GOMES, J.M. and ASSUMPÇÃO, L. (1924). Em torno do gênero *Coccidioides*. **An. Paul. Med. Cir., 12**: 24.

- GROSE, E. and TAMSITT, J.R. (1965). *P. brasiliensis* recovered from the intestinal tract of 3 bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, **4**: 124.
- GUIMARAES, F.N. (1964). Inoculações em hamsters da blastomicose sul-americana (doença de Lutz), da blastomicose queiloideana (doença de Lobo) e da blastomicose dos índios do Tapajós-Xingu. **Hospital** (Rio de Janeiro), **66**: 581-593.
- HANNA, S.A.; UEMURA, M.A.; MORAES, R.; RICCI, L.C. and MENDES-GIANNINI, M.J.S. (1996). Adherence and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. In Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis, 6:p.81.
- HAZEN, B.W.; LIEBERT, R.E. and HAZEN, K.C. (1988). Relationship of cell surface hydrophobicity to morphology of monomorphic and dimorphic fungi. **Mycologia**, **80**(3): 348-355.
- HAZEN, K.C. (1989). Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. **Infect. Immun.**, **57**: 1894-1900,
- KADURUGAMUWA, J.L.; ROHDE, M.; WEHLAND, J. (1991). Intercellular spread of *Shigella flexneri* through a monolayer mediated by membranous protusions and associated with reorganization of the cytoskeletal protein vinculin. **Infect. Immun.**, **59**: 3463-3471.
- KANETSUNA, F.; CARBONELL, L.M.; AZUMA, I. and YAMAMURA, Y. (1972). Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol.**, **110**: 208-218.
- KASHINO, S.S.; CALICH, V.L.G.; BURGER, E. and SINGER-VERME, L.M. (1985). *In vivo* and *in vitro* characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strain. **Mycopathologia**, **92**: 173-178.

- KLIMPEL, K.R. and GOLDMAN, W.E. (1988). Cells walls from avirulent variants of *Histoplasma capsulatum* lack alpha-(1,3)-glucan. **Infect. Immun.**, **56**: 2997-3000.
- KENNEDY, M.J.; CALDERONE, A.; CUTLER, J.E.; KANABE, T.; RIESSELMAN, M.H.; ROBERT, R.; SENET, J.M.; ANNAIX, V.; BOUALI, A.; MAHAZA, C.; TRONCHIN, G.; BOUCHARA, J.P.; MIEGEVILLE, M.; MAROT-LEBLOND, A. and SEGAL, E. (1992). Molecular basis of *Candida albicans* adhesion. **J. Med. Mycol.**, **30**: 95-122.
- KIHLSTRÖM, E. (1977). Infection of HeLa cells with *Salmonella typhimurium* 395 MS and MR10 bacteria. **Infect. Immun.**, **17**: 290-295,
- KNUTTON, S.; LLOYD, D.R. and McNEISH, A.S. (1987). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. **Infect. Immun.**, **55**: 69-77.
- LACAZ, C. da S.; IARIA, S.T.; FERREIRA, M.; MARTINS, A.A. and VEGA, V.S. (1949). Blastomicose experimental (nota preliminar). **Hospital** (Rio de janeiro), **36**: 341-349.
- LACERDA, G.B.; ARCE-GOMES, B. and TELLES FILHO, F.Q. (1988). Increased frequency of HLA-B40 in patients with paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, **26**: 253-256.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-685.
- LIMA, A.O.; SOARES, B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J. e CANÇADO, J.R. (1969). Métodos de laboratório aplicados à clínica. 4ª ed. Editora Guanabara. Koogan S.A. Rio de Janeiro.

- LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH, N.J. FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**: 265-275.
- LUTZ, A. (1908). Uma mycose pseudococcidica localizada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. Bras-Méd., **22**: 121.
- MACKINNON, N. (1972). Geographical distribution and prevalence of paracoccidioidomycosis. In: Proceeding of the Pan-American Health Organization/World Health Organization. p:45-53.
- MENDES-GIANNINI, M.J.S.; CAMARGO, M.E.; LACAZ, C.S. and FERREIRA, W. (1984). Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. J. Clin. Microbiol., **20**: 103-108.
- MENDES- GIANNINI, M.J.S.; BUENO, J.P.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; STOLF, A.M.S.; MASUDA, A.; AMATO NETO, V. and FERREIRA, . W. (1988). Immunoglobulin G antibody response to 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as marker for the evaluation of patients under treatment. Rev. Iber. Micol., **5**(supl 1): 72.
- MENDES-GIANNINI, M.J.S.; BUENO, J.P.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; FERREIRA, A.W. and MASUDA, A. (1989). Detection of the 43.000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. J. Clin. Microbiol., **27**: 2842-285.
- MENDES-GIANNINI, M.J.S.; MORAES, R.A. and RICCI, T.A. (1990). Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, **32**: 384-385.

- MENDES-GIANNINI, M.J.S.; RICCI, L.C.; UEMURA, M.A.; TOSCANO, E. and ARNS, C.W. (1994). Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Med. Vet. Mycol., **32**:189-197.
- MICHALANY, J. (1980). Técnica histológica em anatomia patológica. Com instruções para o cirurgião, enfermeiro e citotécnico. São Paulo, EPU.
- MONTENEGRO, J. (1927). Acerca da inoculabilidade da blastomicose no Brasil, Bras-méd., **41**: 808-812.
- MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E. and STEVENS, D.D. (1993). Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. J. Med. Microbiol.,
- MOSES, A. (1916). Fixação do complemento na blastomicose. Mem. Inst. Oswald Cruz, **8**: 68-70.
- MOTA, N.G.S.; PERAÇOLI, M.T.S.; MENDES, R.P.; GATTASS, C.R.; MARGUES, S.A.; SOARES, A.M.V.C.; IZATTO, I.C. and REZKALLAH-IWASSO, M.T. (1988). Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. J. Med. Vet. Mycol., **26**: 105-111.
- MOUNIER, J.; VASSELON, T.; HELLIO, R.; LESOURD, M. and SANSONETTI, P. J. (1992). *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole. Infect. Immun., **60**: 237- 248.
- NAIFF, R.D.; FERREIRA, L.C.L.; BARRET, T.B.; NAIFF, M.F. and ARIAS, J.R. (1986). Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado o Pará. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, **28**:19-27.
- OLLERT, M.W.; SÖHNCHEN, R.; KORTING, H.C.; OLLERT, U.; BRÄUTIGAM, S. and BRÄUTIGAM, W. (1993). Mechanisms of adherence of *Candida*

albicans to cultured human epidermal keratinocytes. **Infect. Immun.**, **61**: 4560-4568.

PERAÇOLI, M.T.; SUGIZAKI, M.F.; MENDES, R.P.; NAIFF, R.D.; SARTORI, A. and MONTENEGRO, M.R. (1992). Estudo de virulência de cepa de *P. brasiliensis* isolada de tatu (*Dasypus novemcinctus*). **Rev. Arg. Micol.**, **15**: 41.

PERAÇOLI, M. T. (1996). Imunoregulação na paracoccidioidomicose. In: Proc. VI Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis, Montevideo.pag. 53.

PIRAS, M.M.; HENRIQUEZ, D. and PIRAS, R. (1985).The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction *Trypanosoma cruzi* - fibroblastos. **Molec. Bioch. Parasit.**, **14**: 151-163.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P.A.J. and TRAVASSOS, L R. (1986). Exocelular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, **53**: 199-206.

PUCCIA, R. and TRAVASSOS, L.R. (1991). 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paraoccidioidomycosis, histoplasmosis, and Jorge Lobo's disease. **J. Clin. Microbiol.**, **29**: 1610-1615.

RESKALLAH-IWASSO, M.T. (1981). Ação do levamisole na paracoccidioidomicose experimental do hamster. Estudo da imunidade humoral e celular; correlação entre a resposta imunitária e a morfologia das lesões. São Paulo.(tese) Escola Paulista de Medicina.

RESKALLAH-IWASSO, M.T.; PERAÇOLI, M.T.S.; MENDES, R.P.; GUASTALE, H.A.; MARQUES, S.A. and SOARES, A.M.V.C. (1989). Defective expression of interleukin-2 receptors in patients with

- paracoccidioidomycosis. In Proc. Encuentro Int. Paracoccidioidomycosis, Caracas. pag. 121.
- RESTREPO, A. (1966). La prueba de inmunodifusión en el diagnóstico de la paracoccidioidomycosis. Sabouraudia, **4**: 223.
- RESTREPO, A. and DROUHET, E. (1970). Étude des anticorps précipitants dans la blastomycose sudaméricaine par l'analyse immunoélectrophorétique des antigens de *Paracoccidioides brasiliensis*. Ann. Inst. Pasteur, **119**: 338-346.
- RESTREPO, A.; CANO, L. E.; BEDOUT, G.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. 1982. Comparison of various techniques for determining viability of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form cells. J. Clin. Microbiol., **16**: 209-211.
- RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E.; STOVER, E.P. FELDMAN, D. and STEVENS, D.A. (1984). Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for resistance of females to Paracoccidioidomycosis. Infect. Immun., **46**: 346-353.
- RESTREPO, A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. Sabouraudia. J. Med. Vet. Mycol., **23**: 323-334.
- ROTROSEN, D.; EDWARDS Jr., J.E.; GIBSON, T.R.; MOORE, J.C.; COHEN, A.H. and GREEN, I. (1985). Adherence of *Candida* to cultured vascular endothelial cells: Mechanisms of attachment and endothelial cell penetration. J. Infect. Diseases, **152**: 1264-1274.
- SALOMÃO, R.; KARHAWI, A.S.K.; GRANATO, C.H.F. and COLOMBO, A.L. (1996). CD4+ and CD8- T lymphocytes in patients with paracoccidioidomycosis. In: VI Encuentro Internacional sobre paracoccidioidomycosis, Montevideo. pag. 39.

- SAN-BLAS, G.; and VERNET, D. (1977a). Induction of the synthesis of cell wall α -1-3-glucan in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. Infect. Immun., **15**: 897-902.
- SAN-BLAS, S.; SAN-BLAS, F. and SERRANO, L.E. (1977b). Host-parasit relationships in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. Infect. Immun., **15**: 343-346.
- SAN-BLAS, G. (1982). Cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. A review. Mycophatologia, **79**: 159-184.
- SAN-BLAS, F. and SAN-BLAS, G. (1985). *Paracoccidioides brasiliensis* In: P. J. SZANISZLO (Ed.) Fungal Dimorphism, pp 93-120. Plenum Press, New York.
- SAN-BLAS, G. and SAN-BLAS, F. (1989). Antigenic struture of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: E. Kurstak (Ed.). Immunology of fungal diseases, pp171-192. Marcel Dekker, New York.
- SANSONETTI, P.J.; RYTER, A.; CLERC, P.; MAURELLI, A.T. and MOUNIER, J. (1986). Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: Lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-medited contact hemolysis. Infect. Immun., **51**: 461-469.
- SILVA, S.P.; FELIPE, M.S.S.; PEREIRA, M.; AZEVEDO, M.O. and SOARES, C.M.A. (1994). Phase transition and storage specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Exp. Mycol. **18**(4): 294-299.
- SINGER-VERMES, L.M.; COAVAGLIA, M.C.; KASHINO, S.S.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Med. Vet. Mycol., **30**: 261-264. 1992.

- SIQUEIRA, A.M. (1982). avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidiodomicose. Caracterização imunoquímica do antígeno E2 do *Paracoccidioides brasiliensis*. (tese). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SOARES, C.M.A.; MOLLINARI-MADLUN, E.E.W.I.; SILVA, S.P.; PEREIRA, M. and FELIPE, M.S.S. ET AL (1995). Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), J. Clin. Microbiol., **33**(2): 505-507.
- SOUTO-PADRON, T.; CAMPETELLA, O.E.; CAZZULO, J.J. and SOUZA, W. de (1990). Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasit-host cell interaction. Journal of Cell Science, **96**: 485-490.
- SPLENDORE, A. (1910). Blastomycoses americanas. Brasil-méd., **24**: 153-157.
- STANDARD, P.G. and KAUFMAN, L. A rapid specific method for the immunological identification of mycelial from cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. Curr. Microbiol., **4**: 297-300.
- STAMBUK, U.E.; PUCCIA, R.; ALMEIDA, M.L.C.; TRAVASSOS, L.R. and SCHENKMAN, S. (1988). Secretion of the 43 kDa glycoprotein antigen by *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Med. Vet. Mycol., **26**: 367.
- TABORDA, C.P. and CAMARGO, Z.P. (1993). Diagnosis of paracoccidiodomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen-gp 43. J. Med. Vet. Mycol., **31**: 155-160.
- TANG, P.; FOUBISTER, V.; PUCCIARELLI, M. G. and FINLAY, B. B. (1993). Methods to study bacterial invasion. J. Microbiol. Meth., **18**: 227-240.

- TOWBIN, H.; STACHELIN, T. and GORDON, J. (1979). Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci., **76**: 4350.
- UEMURA, M.A.; HANNA, S.A.; RICCI, L.C.; SANDOVAL, M. and MENDES-GIANNINI, M.J.S. (1996). An electron microscopy study of *Paracoccidioides brasiliensis* adherence and invasion of culture cells. In. VI Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis. pag. 83.
- VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; FRANCO, M.F.; de SOUZA, W.; de MORAES, J.Z.; TRAVASSOS, L.R. and LOPES, J.D. (1994). Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to Laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. Infect. Immun., **62(4)**: 1465-1469.
- YARZÁBAL, L.A.; BIGUET, J.; VAUCELLE, T.; ANDRIEU, S.; TORRES, J.M. and DA LUZ, S. (1973). Análisis inmunoquímico de extractos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis*. Sabouraudia, **11**: 80-88.
- YARZÁBAL, L.A.; BOUT, D.; NAQUIRA, F.; FRUIT, J. and ANDRIEU, S. (1978). Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. Sabouraudia, **15**: 79.
- YARZÁBAL, L.A. (1982). Composición antigenica de *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Paracoccidioidomicose-blastomicose sul-americana (G. del Negro, C. S. Lacaz and A. M. Fiorillo, eds.), Sarvier-EDUSP, São paulo. pp. 59-67.
- ZACHARIAS, D.; UEDA, A.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M. and SANBLAS, G. (1986). A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. J. Med. Vet. Mycol., **24**: 445-454.