

LIVIA CRISTINA LIPORAGI LOPES

**Efeito de anticorpos monoclonais na
patobiologia de infecções por *Pseudallescheria
boydii* e *Histoplasma capsulatum***



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientador: Profa. Eliana Barreto-Bergter

Co-orientador: Prof. Joshua Daniel Nosanchuk

RIO DE JANEIRO

JULHO/2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Efeito de anticorpos monoclonais na patobiologia de infecções por *Pseudallescheria boydii* e *Histoplasma capsulatum*

Livia Cristina Liporagi Lopes

Orientador: Profa. Eliana Barreto-Bergter

Co-orientador: Joshua Daniel Nosanchuk

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Aprovada por:

Eliana Barreto-Bergter, Doutora, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes – UFRJ

Carlos Pelleschi Taborda, Doutor, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, USP

José Roberto Meyer-Fernandes, Doutor, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

Paulo Antônio de Souza Mourão, Doutor, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

André Luis Souza dos Santos, Doutor, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes – UFRJ

FICHA CATALOGRÁFICA

LOPES, Livia Cristina Liporagi

Efeito de anticorpos monoclonais na patobiologia de infecções por *Pseudallescheria boydii* e *Histoplasma capsulatum* / Livia Cristina Liporagi Lopes – Rio de Janeiro, Julho de 2010. XVI, 142p.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientador: Profa. Eliana Barreto-Bergter.

Co-orientador: Prof. Joshua Daniel Nosanchuk

Referências Bibliográficas: f114-141

1. *Pseudallescheria boydii* 2. Anticorpos monoclonais 3. Peptidoramnomana 4. *Histoplasma capsulatum*

I. Barreto-Bergter, Eliana II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes

III. Efeito de anticorpos deletérios na patobiologia de infecções fúngicas

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Química Biológica de Microrganismos, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a orientação da Profa. Eliana Barreto-Bergter, e sob co-orientação do Prof. Joshua Daniel Nosanchuk, do Albert Einstein College of Medicine, NY, USA.

DEDICATÓRIA

“Eis meu Servo que eu amparo, meu eleito ao qual dou toda minha afeição; nada temas pois eu te resgato, eu te chamo pelo nome, és meu.” Is 42,1; 43,1.

Meu agradecimento e amor total, incondicional e irrestrito à Deus, meu Senhor, e meu reconhecimento à poderosa intercessão de Maria Santíssima em minha vida.

Ao meu Deus que nunca me abandona.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Antônio e Vera Lúcia, que dão sentido a palavra amor na minha vida, sempre comigo...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele eu nada seria.

A Prof. Eliana, uma profissional inigualável, que me incentivou e me apoiou, me ajudou a seguir adiante, por ter tornado o meu ambiente de trabalho um verdadeiro lar, com todo seu carinho. Obrigada pela confiança depositada em mim. Pelo seu exemplo de profissionalismo e por sua dedicação achei um espelho de tudo aquilo que quero ser como uma profissional.

The Boss (Dr. Nosanchuk): I have to thank you for your friendship in all my moments since I arrived in the US. You were (and you are) a great boss, you believed in me and in my job, you never gave up on me, and helped me in everything. I really thank God to give me a boss (and a friend) like you. Luis, Radu, Long, Jessica, Allan, David Trofa, Li, David Sanchez, Mariangela: thank you for making my days happier. Thanks for everything that you have taught and for the patience with my English and with my pink world.

Dr. Casadevall and the people of his lab: for the availability of his lab, and the help of the people that work there. Thank you!

A Prof. Rosa, por ter sido uma grande amiga, me estendendo a mão e se lembrando de mim sempre que eu precisei.

A Prof. Vera, por ter me ensinado praticamente tudo o que sei dentro de um laboratório, pela sua paciência comigo, pelo apoio e pela preciosa amizade. Minha total admiração e agradecimento eternos.

Ao Prof. André Santos, um exemplo de profissional e ser humano. Desejo pra você tudo aquilo que desejo pra mim, e pra você ainda é pouco. A Prof Marta Branquinha, uma das pessoas mais adoráveis que já conheci, um verdadeiro anjo e a minha confidente. E a todos os estudantes dos laboratórios de ambos os professores, pessoas maravilhosas, que são o mais puro reflexo de seus orientadores. Em especial à minha querida Bianca Ancântara, a Bib's boydii para os íntimos, por ser uma pessoa

que é só bondade e integridade, e que se Deus não tivesse inventado o mundo seria, pelo menos, uns 75% menos alegre!

A minha mainha querida de coração, o meu colinho diário e a companheira mais animada pra comer batata inglesa comigo. E ao meu grande amigo Rodrigo, que provou que a distância só fortalece uma amizade quando ela é verdadeira! Obrigada por saber o que é ser um amigo de verdade!!!

A todos do lab. 065, que é uma grande família, praticamente a família Buscapé: Mariana, Bianca, Jardel e Renata, pelas risadas, pelo apoio, pelo carinho e por fazerem parte do lab mais feliz e unido da UFRJ todinha. Vocês são muito queridos pra mim! O que seria de mim se vocês não existissem? Deixo expresso aqui também o enorme carinho que eu sinto pela Marcia Pinto, além da sensação que ela sempre faz parte do nosso lab, apesar de estar em São Paulo.

A Prof. Maria Teresa Romanos, pelo seu carinho, pelas conversas e pela ajuda nos ensaios de citotoxicidade.

Aos Profs. André Santos, Carlos Taborda, Paulo Mourão, José Roberto Meyer, Antônio Pereira e Guilherme Sasaki, por aceitarem fazer parte da minha banca, como membros ou suplentes.

Aos meus pais, meus maiores amigos e companheiros. Aos meus irmãos, Jorge André e Ana Paula, que ajudaram a me criar e me proporcionaram as três maiores bênçãos do mundo: Daniel, Victor e Gabriel. Amo vocês!!!

A toda minha família, pela escolha de Deus, pelos genes em comum e pela dádiva de ter um pouco de cada um de vocês em mim.

As pessoas que me ajudaram a chegar aqui, as quais Deus me agraciou por tê-las em meu caminho: à tia Dina (*in memoriam*), tio Élbio (*in memoriam*) e Luís, e à família Peralles.

A todos os meus amigos, a maioria tenho como desde a infância, que fazem parte de mim, pois ajudaram na formação daquilo que sou, e aqueles que a vida e a pesquisa me agradeceram por conhecer no decorrer do meu caminho.

Aos professores e funcionários da UFRJ, pelos ensinamentos obtidos nesta Instituição.

Enfim, a todos que de alguma forma fizeram parte da minha vida, que passaram por ela e que contribuíram ou não comigo; afinal, todas as experiências são válidas e importantes, e nos permitem crescer como pessoa.

As agências e fontes de financiamento CNPq, CAPES, FAPERJ e Fogarty Program – Einstein.

RESUMO

Efeito de anticorpos monoclonais na patobiologia de infecções por *Pseudallescheria boydii* e *Histoplasma capsulatum*

LIVIA CRISTINA LIPORAGI LOPES

Orientador: Profa. Eliana Barreto-Bergter

Co-orientador: Prof. Joshua Daniel Nosanchuk

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Pseudallescheria boydii é um fungo pertencente ao complexo *Pseudallescheria/Scedosporium*. *P. boydii* é um fungo oportunista capaz de causar infecções similares, em termos de variedade e predisposição, àquelas infecções causadas por espécies de *Aspergillus*. Peptidoramnomanas (PRMs) são glicoconjugados presentes na parede celular de fungos, e sua presença e estrutura parcial já foram caracterizadas em *P. boydii*, *Scedosporium prolificans* e *Sporothrix schenckii*. Estudos anteriores relataram a antigenicidade desta molécula, bem como sua participação na interação com células animais. No presente estudo, 3 anticorpos monoclonais (IgG1) anti-PRM de *P. boydii* foram gerados e purificados, e seus efeitos na biologia e virulência de *P. boydii* foram testados em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados demonstraram que os anticorpos monoclonais competem pelo mesmo epítipo na molécula de PRM, e que este epítipo corresponde à porção carboidrato da molécula. Os resultados *in vitro* mostraram que, na presença destes anticorpos, conídios de *P. boydii* germinaram mais e foram menos fagocitados por macrófagos J774.16. Os experimentos *in vivo* mostraram que os animais tratados com os anticorpos, previamente à infecção com o fungo, morreram mais que os animais controles, demonstrando que os anticorpos anti-PRM podem aumentar a doença fúngica nos camundongos, elevando assim os índices de letalidade. Assim, esta glicoproteína parece estar modulando funções como germinação e virulência do fungo, além de interação com células hospedeiras. Neste contexto, torna-se de grande

importância a elucidação dos mecanismos de patogênese e resistência fúngicas, e o entendimento sobre a composição e possíveis funções destes glicoconjugados, o que pode levar a um progresso substancial na prevenção e tratamento das infecções fúngicas.

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* é um fungo dimórfico e cosmopolita, sendo um dos agentes etiológicos de micoses respiratórias mais prevalentes. A resposta na histoplasmose tem sido caracterizada nos últimos anos, mas a relevância destes anticorpos na patogênese fúngica ainda é desconhecido. Estudos recentes demonstraram a existência de anticorpos monoclonais protetores, não protetores e com capacidade de acentuar a doença. Neste trabalho, os possíveis efeitos do anticorpo monoclonal (H1C) contra uma proteína de 70 kDa de superfície celular de *H. capsulatum* foram testados em diferentes experimentos. Na presença deste anticorpo, foi observado um aumento na sobrevivência intracelular de leveduras de *H. capsulatum* em macrófagos J774.16. De forma semelhante, observou-se uma diminuição da liberação de óxido nítrico por estes fagócitos. Os estudos *in vivo* também demonstraram que o anticorpo não se mostrou hábil em proteger os animais após infecção letal por *H. capsulatum*. Estes resultados prévios apontam para um possível papel desta molécula na virulência do fungo e na interação com células do hospedeiro, o que revela a grande complexidade no que concerne às interações patógeno – célula hospedeira.

Palavras-chave: *Pseudallescheria boydii*, Anticorpos monoclonais, Peptidomannana, *Histoplasma capsulatum*, patobiologia, interação com célula hospedeira

Rio de Janeiro

Julho/2010

ABSTRACT

Effect of monoclonal antibodies in the patobiology of *Pseudallescheria boydii* e
Histoplasma capsulatum infections

LIVIA CRISTINA LIPORAGI LOPES

Orientador: Profa. Eliana Barreto-Bergter

Co-orientador: Prof. Joshua Daniel Nosanchuk

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Pseudallescheria boydii is part of the *Pseudallescheria* - *Scedosporium* complex. *P. boydii* is an opportunistic fungus that can cause a broad spectrum of diseases, very similar with infections of other fungi, as *Aspergillus* species. Peptidorhamnomannans (PRMs) are cell wall glycoconjugates present in some fungi, and their structures have been characterized in *P. boydii*, *Scedosporium prolificans* and *Sporothrix schenckii*. Previous works related the antigenic properties of this molecule as well as its participation in interaction process with animal cells. In the present study, three monoclonal antibodies (mAbs, IgG1) against PRM from *P. boydii* were generated and their effects on *P. boydii* biology and virulence were examined by *in vitro* and *in vivo* experiments. The mAbs recognized a very similar or overlapping epitope, which is formed by the carbohydrate moiety of the PRM. In culture, the addition of PRM mAbs increased the *P. boydii* conidia germination and reduced the conidial phagocytosis by J774.16 macrophages. In a murine infection model, mice treated with these antibodies against PRM died in a higher level than compared to the control animals, suggesting that anti-PRM antibodies can exacerbate the fungal disease enhancing the fungal lethality. Thus, PRM should be involved with fungal morphogenesis and virulence. Further insights into the effects of these glycoconjugates on the pathobiology of *P. boydii* may lead to new avenues for preventing and treating pseudallescheriosis, with a focus in the antifungal therapies.

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* is a dimorphic fungus with worldwide distribution. This pathogen is one of the most important etiologic fungal agent of

respiratory mycosis. Histoplasmosis has been studied in the last years, but the role of mAbs in the pathogenesis is still unclear. Recent work showed that mAbs can be protective, non-protective or enhancing-disease. This study showed that monoclonal antibody H1C against a 70 kDa cell surface antigen of *H. capsulatum*, in the highest concentrations, increased intracellular fungal growth and reduces macrophage nitric oxide release. This antibody was not able to protect mice against experimental histoplasmosis. These previous results indicate that this 70 kDa protein can be evolved in the virulence of *H. capsulatum* and the interaction of this fungus with the host cells, demonstrating the complexities of host-pathogen interactions.

Palavras-chave: *Pseudallescheria boydii*, Anticorpos monoclonais, Peptidoramnomana, *Histoplasma capsulatum*, patobiologia, interação com célula hospedeira

Rio de Janeiro

Julho/2010

ABREVIATURAS

A549 – célula epitelial pulmonar humana

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida

Asn - asparagina

BSA – soro albumina bovina

CD – agrupamento de diferenciação (“cluster of differentiation”)

CMH – monohexosilceramida

CR – receptor de complemento

DMEM – Meio basal de Eagle modificado por Dulbecco (“Dulbecco’s modified Eagle medium”)

DMF - N,N-dimetilformamida

DO – densidade óptica

ELISA – ensaio imunoenzimático (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”)

FACS – citômetro de fluxo

FITC – isotiocianato de fluoresceína

gal - galactose

glc - glucose

GPI – glicosilfosfatidilinositol

HEp2 – células de carcinoma de laringe humana

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IFN - interferon

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

kDa – kilodalton

LFA-1 – antígeno 1 associado à função leucocitária

man – manose

MTT –[3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio]

MyD88 – Gen 88 de resposta primária à diferenciação mielóide (“Myeloid differentiation primary response gene 88”)

NHSRho – marcador fluorescente 5-(e 6)-carboxi succinimidil tetrametilrodamina

p – piranose

PAS – ácido periódico- Schiff

PBS – tampão fosfato salina

PSC – complexo *Pseudallescheria/Scedosporium*

pNPP – p-nitrofenil fosfato

PRM – peptidoramnomanana

Rha – ramnose

Rho - rodamina

SDS – dodecil sulfato de sódio

Ser - serina

SFB – soro fetal bovino

TBS – tampão Tris-salina

TLR – receptor do tipo “toll”

TNF – Fator de necrose tumoral

Thr - treonina

TRITC – tetrametil isotiocianato de rodamina

UFC – unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

RESUMO	x-xi
ABSTRACT	xii-xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv-xv
1) INTRODUÇÃO	1-37
Parte I: <i>Pseudallescheria boydii</i> :	1-12
Parte II: <i>Histoplasma capsulatum</i> :	13-24
Parte III: A parede celular fúngica e resposta imune às infecções fúngicas	25-37
2) OBJETIVOS	38-39
2.1) Objetivos Gerais	38
2.2) e 2.3) Objetivos específicos	38-39
3) METODOLOGIA	40-53
4) RESULTADOS	54-102
5) DISCUSSÃO	103-112
6) CONCLUSÕES	113
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114-141
8) ANEXOS	142

1. Introdução

Parte I: *Pseudallescheria boydii*

1.1. O complexo *Pseudallescheria/Scedosporium*

Os fungos são seres presentes em todos os ambientes do ecossistema, participando de processos importantes, como a reciclagem de carbono e minerais. Industrialmente, são amplamente utilizados na produção de pães e derivados, bebidas, diversas enzimas e antibióticos, como a penicilina. Por outro lado, alguns fungos são responsáveis por doenças em humanos e em outros animais, chamadas genericamente de micoses. Nas últimas décadas, com o surgimento da imunossupressão causada por doenças, como a síndrome da imunodeficiência adquirida, e tratamentos invasivos e agressivos para pacientes, como as quimioterapias, essas micoses vêm crescendo em importância na clínica, por causarem graves problemas para estes pacientes. Neste contexto, podemos constatar o aumento da incidência de fungos do complexo *Pseudallescheria/Scedosporium*, sendo considerados assim, atuais fungos emergentes (STEINBACH *et al.*, 2003a).

Nos últimos anos, considerava-se o gênero *Scedosporium* sendo constituído por duas principais espécies de importância médica, *Scedosporium prolificans* e *Scedosporium apiospermum* / *Pseudallescheria boydii*. A espécie *S. prolificans* é um fungo imperfeito, pois apresenta apenas a forma assexuada de reprodução, enquanto *S. apiospermum* era considerado um fungo perfeito por apresentar uma forma assexuada ou anamorfa (*S. apiospermum*) e outra forma sexuada ou teleomorfa (*P. boydii*) (CORTEZ *et al.*, 2008). Recentemente, Gilgado e colaboradores evidenciaram diferenças moleculares entre *S. apiospermum* e *P. boydii*, propondo a distinção destes em duas espécies diferentes, bem como caracterizaram diversas outras espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Scedosporium* e *Pseudallescheria*, algumas de interesse estritamente ambiental e

outras de origem clínica. Com isto, foi estabelecida uma nova classificação para tais fungos, considerando-se que estes fazem parte de um grande complexo, denominado complexo *Pseudallescheria/Scedosporium*, no qual encontramos mais do que as 3 espécies citadas dentro do antigo gênero *Scedosporium*, e onde foi estabelecido que *S. apiospermum* e *P. boydii* não são a mesma espécie fúngica (HARUN *et al.*, 2009, GILGADO *et al.*, 2010).

1.2. Histórico, biodiversidade e taxonomia do complexo *Pseudallescheria/Scedosporium*

Fungos do complexo *Pseudallescheria/Scedosporium* pertencem ao domínio Eukarya, filo Ascomycota, classe Euascomycetes, ordem Microascales e família Microascaceae.

P. boydii foi isolado pela primeira vez em 1889, como o agente infeccioso de uma otite humana (Apud GUARRO *et al.*, 2006). Em 1911, foi isolado um fungo de micetoma, o qual foi nomeado como *Monosporium apiospermum* (atualmente, *Scedosporium apiospermum*) (Apud GUARRO *et al.*, 2006).

A taxonomia deste complexo mudou muito desde a descoberta do *Monosporium apiospermum*. Quando este foi descoberto, observou-se apenas o desenvolvimento do estágio assexuado de reprodução e, por isso, foi classificado como um deuteromiceto. Anos depois, foi sugerido o nome *Scedosporium* para esse fungo, mas não foi proposta a criação de um novo gênero e, após algum tempo, esse termo começou a ser aceito pelos micologistas (Apud GUARRO *et al.*, 2006). Em 1922, foi descrito um novo ascomiceto, *Allescheria boydii*, isolado de um micetoma (Apud GUARRO *et al.*, 2006). Apenas em 1944, *Allescheria boydii* e *Monosporium apiospermum* passaram a ser considerados, respectivamente, a forma teleomorfa e a forma anamorfa (Apud GUARRO *et al.*, 2006), e suas nomenclaturas mudaram muito ao longo do tempo. Em 1970, reclassificou-se o teleomorfo como *Petriellidium boydii* e, mais tarde, o gênero

passou a ser chamado de *Pseudallescheria*. Já o anamorfo foi renomeado para *Scedosporium apiospermum* (Apud GUARRO *et al.*, 2006).

Inicialmente, a forma utilizada para distinguir tais espécies fúngicas era a sua estrutura de reprodução. Esta estrutura permitia a distinção desse gênero em sete espécies: *P. africana*, *P. angusta*, *P. boydii*, *P. desertorum*, *P. ellipsoidea*, *P. fimeti* e *P. fusioidea*. Posteriormente, análises das regiões ITS1 e ITS2 do ribossomo e seqüências genéticas de subunidades pequenas e grandes do rRNA revelaram semelhanças entre algumas dessas espécies e a completa distinção de *S. prolificans* (ISSAKAINEN *et al.*, 1997, ISSAKAINEN *et al.*, 2003, RAINER & DE HOOG, 2006).

Estudos recentes propõem algumas mudanças e novas descobertas em relação ao gênero *Scedosporium*. Gilgado propôs duas novas espécies: *S. aurantiacum* e *P. minutispora* (GILGADO *et al.*, 2005). Baseado em estudos morfológicos, fisiológicos e moleculares, *S. apiospermum* e *P. boydii* foram consideradas espécies distintas. Uma nova espécie, *Scedosporium dehoogii*, é descoberta e o nome *S. boydii* é proposto para a forma anamorfa de *P. boydii* (GILGADO *et al.*, 2005). Em outro estudo, essa distinção entre *P. boydii* e *S. apiospermum* foi novamente evidenciada e foi proposta a nomenclatura *P. apiosperma* para o teleomorfo de *S. apiospermum* (GILGADO *et al.*, 2008, 2010) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Espécies e diferentes nomenclaturas (sinônimos) do complexo *Pseudallescheria/Scedosporium*. Tabela baseada em Cortez *et al.*, 2008.

Complexo <i>Scedosporium</i> / <i>P. boydii</i>	<i>Scedosporium</i> <i>apiospermum</i>	<i>Pseudallescheria</i> <i>boydii</i>	<i>Scedosporium</i> <i>prolificans</i>	Outras espécies
Sinônimos	<i>Monosporium</i> <i>apiospermum</i> ; <i>Monosporium</i> <i>sclerotiale</i> ; <i>Indiella americana</i> ; <i>Acremonia lutzii</i> ; <i>Polycyrtella hominis</i>	<i>Allescheria boydii</i> ; <i>Pseudallescheria</i> <i>shearii</i> ; <i>Petriellidium</i> <i>mallochii</i> ; <i>Petriellidium</i> <i>boydii</i> ; <i>Glenospora</i> <i>graphii</i> ; <i>Petriellidium</i> <i>boydii</i> ; <i>Pseudallescheria</i> <i>shearii</i> ; <i>Raffaelea castellani</i> ; <i>Sporocybe</i> <i>chartoikoon</i>	<i>Scedosporium</i> <i>inflatum</i>	<i>P. minutispora</i> , <i>S. dehoogii</i> , <i>S.</i> <i>aurantiacum</i>

1.3. Características morfológicas

As colônias de *P. boydii* crescem rapidamente a 25°C em meio de cultura ágar Sabouraud, podendo tolerar temperaturas de 37°C até 42°C. Além disso, *P. boydii* é capaz de assimilar manitol, maltose e lactose e crescer em meio de cultura contendo até 8 mg/mL de cicloheximida. As colônias são inicialmente brancas, tornando-se cinza escuras ao longo do tempo. Observando-se o reverso da colônia, as colônias apresentam-se pálidas com zonas escuras e amarronzadas (KIMURA & MCGINNIS, 1998, CORTEZ *et al.*, 2008).

P. boydii apresenta o estágio sexuado de reprodução e tem como principal característica a presença de corpos de frutificação fechados, chamados de cleistotécio (estrutura característica da reprodução sexuada deste fungo), onde localizam-se os ascos, contendo em média oito ascósporos (4 × 8 µm) (**Figura 1**). É uma estrutura globosa, apresentando uma coloração escura, com paredes espessas (em média 5 µm), composta de duas a três camadas de hifas septadas que uma vez rompida, libera esses ascos que logo se dissolvem, liberando os ascósporos (**Figura 1**) (GUARRO *et al.*, 2006; CORTEZ *et al.*, 2008; GILGADO *et al.*, 2009). Os ascósporos são unicelulares, ovais e lisos (CORTEZ *et al.*, 2008; GILGADO *et al.*, 2009).

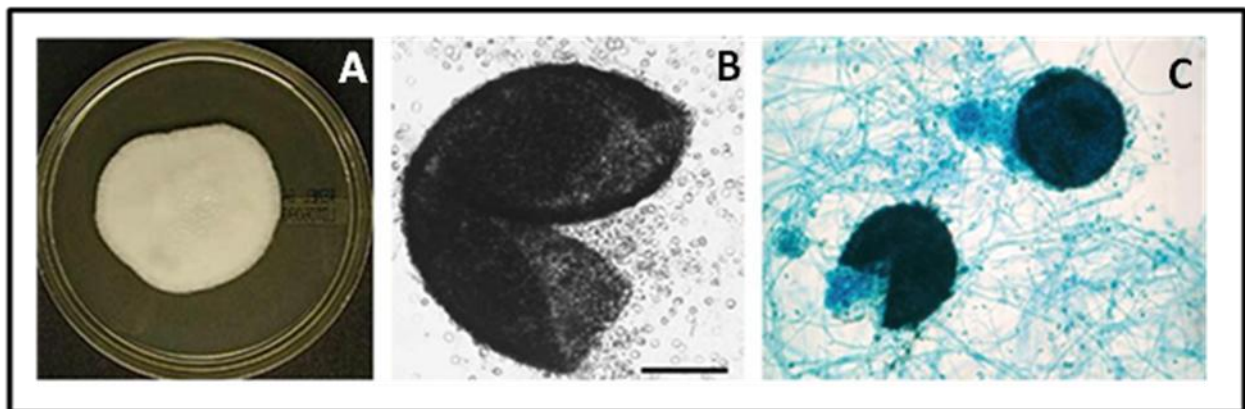


Figura 1: *Pseudallescheria boydii*. (A) Crescimento em placa com meio de cultura ágar Sabouraud. Fonte: www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/img/fungi/p/Pseudallescheria_boydii

(B-C) Cleistotécio rompido de *P. boydii* *in vitro*, mostrando a liberação dos ascosporos. Fontes: (CORTEZ *et al.*, 2008; GILGADO *et al.*, 2009).

1.4. Epidemiologia

P. boydii é normalmente encontrado em regiões de clima temperado, com menor prevalência em regiões de clima tropical. Além disso, esta espécie é termotolerante e capaz de sobreviver em condições de baixa pressão de oxigênio e alta concentração de sal (5%), permitindo a sobrevivência em ambientes poluídos onde há baixa aeração e pressão osmótica alta (DE HOOG *et al.*, 1994). Esse fungo já foi encontrado em diversos ambientes, como água salgada, esgoto, solo, fezes de aves, gado e morcegos (GUARRO *et al.*, 2006). A frequência de *P. boydii* no ambiente está diretamente relacionada à poluição orgânica originada de humanos, como solo de agricultura, solo contaminado com hidrocarbonetos, sedimento e esgoto, onde o conteúdo de nitrogênio é abundante. Isso pode ser explicado pela capacidade desse fungo em utilizar gás natural e compostos aromáticos. Já em ambientes não impactados, é raro encontrar essa espécie (APRIL *et al.*, 1998; GUARRO *et al.*, 2006). Estudos recentes demonstraram que certas espécies do complexo *Pseudallescheria/Scedosporium* são encontradas com mais frequência em fontes ambientais e clínicas. *P. boydii* e *S. apiospermum* são frequentemente encontrados em amostras clínicas e, em menor frequência, em amostras ambientais. Já *S. dehoogii* e *P. minutispora* são principalmente encontrados em amostras ambientais e raramente em amostras clínicas (KALTSEIS, RAINES & DE HOOG, 2009).

Em áreas endêmicas, fungos deste complexo têm crescimento sapróbita em espinhos de árvores (muito encontrado nessas regiões) e as infecções ocorrem por trauma, onde o fungo acaba sendo inoculado no tecido humano. A doença (micetoma) não é transmitida de um indivíduo para outro, nem de uma espécie animal para outra e não há nenhuma evidência de predominância racial ou étnica (CORTEZ *et al.*, 2008).

Desde 1984, casos de infecções por espécies fúngicas pertencentes a este complexo têm sido relatados, principalmente na Península Ibérica e Austrália (BOUCHARA, HORRE & HOOG, 2009; GRENOUILLET *et al.*, 2009). Posteriormente, tais fungos foram associados à patologias em outros países, como Alemanha, França, Estados Unidos da América (EUA), Japão e Brasil (BOUCHARA HORRE & HOOG, 2009). Apesar de ser frequentemente isolado de indivíduos imunocomprometidos, *P. boydii* só teve sua importância médica reconhecida em 1948, quando BENHAM & GEORGE reportaram um caso de meningite causada por esta espécie (BENHAM & GEORGE, 1948). Este atraso no reconhecimento de *P. boydii* como patógeno de importância médica pode ser devido à difícil classificação taxonômica do fungo.

A frequência destas infecções não é considerada extremamente alta; entretanto, alguns casos já foram relatados em pacientes hospitalizados apresentando doenças hematológicas (ALVAREZ *et al.*, 1995, WILLIAMSON *et al.*, 2001). Segundo estudos feitos entre 1992 e 1993, na área da baía de São Francisco (EUA), a frequência de infecções por *P. boydii* é de um caso em um milhão de pessoas (REES *et al.*, 1998).

No Brasil, alguns casos já foram relatados, principalmente em pacientes apresentando outras patologias, como diabetes, artrite reumatóide e histórico de tuberculose. Todos os pacientes apresentaram sintomas pulmonares, o que poderia confundir o diagnóstico com o de outras micoses, como as causadas por *Aspergillus fumigatus* (MACHADO *et al.*, 1998, SEVERO, OLIVEIRA & IRION, 2004).

Com o avanço das técnicas, como eletroforese de multilocus de enzima e PCR, é possível diferenciar genotipicamente os isolados de pacientes (como os casos de pacientes com fibrose cística), tornando mais eficiente a identificação de *Scedosporium* spp. isolados a partir de amostras clínicas (ZOUHAIR *et al.*, 2001, DEFONTAINE *et al.*, 2002).

1.5. Infecção

As doenças em humanos são causadas predominantemente por *P. boydii* e *S. prolificans* e suas principais características são o grau de gravidade e a localização no

paciente. As pseudallescherioses/scedosporioses podem variar desde simples infecções cutâneas e subcutâneas até infecções disseminadas em pacientes imunossuprimidos. Os agentes causadores dessas infecções fúngicas são considerados emergentes, devido ao aumento da freqüência de aparecimento de novos casos ao longo dos anos (WALSH & GROLL, 1999; LAMARIS *et al.*, 2006).

As manifestações clínicas das pseudallescherioses/scedosporioses são muito variadas, devido à capacidade desse fungo causar infecções em diversos órgãos do corpo humano.

Apesar de ser geralmente considerado um patógeno oportunista, *P. boydii* é o principal agente causador do micetoma micótico (**Figura 2**), que é uma infecção fúngica que acomete pacientes imunocompetentes. O micetoma micótico é uma infecção subcutânea crônica, normalmente ocasionada por introdução traumática do agente infeccioso no tecido, apresentando uma maior incidência nos membros inferiores e superiores e podendo ser causado por fungos (eumicetoma ou micetoma micótico) ou por actinomicetos (actinomicetoma). No micetoma pode-se observar o acometimento dos tecidos cutâneo e subcutâneo e tecidos moles, sendo ainda possível a extensão da infecção aos tendões, ligamentos e ossos. A patologia é caracterizada por supuração, formação de abscesso, granuloma e sinus contendo grânulos de coloração branca amarelada contendo microcolônias do fungo envolvido com debris do tecido (CORTEZ *et al.*, 2008).

P. boydii é capaz de causar infecções similares, em termos de variedade e predisposição, às infecções causadas por espécies do gênero *Aspergillus*. Essas infecções incluem colonização pulmonar (SEVERO, OLIVEIRA & IRION, 2004; PIHET *et al.*, 2008), pneumonias invasivas (STEINBACH *et al.*, 2003a), micose broncopulmonar alérgica, uveítes, sinusites (THIAGALINGAM *et al.*, 2004), endocardites (O'BRYAN, BROWNE & SCHONDER, 2002), abscessos cerebrais (MONTEJO *et al.*, 2002, SAFDAR *et al.*, 2002; KANAFANI, COMAIR & KANJ, 2004), infecções cutâneas e subcutâneas (CHAVEIRO *et al.*, 2003), bola fúngica (WILLINGER *et al.*, 2003), otites (BHALLY *et al.*, 2004) e micoses sistêmicas e disseminadas (BUZINA *et al.*, 2006).

O pulmão é o segundo sítio mais comum de infecção por *P. boydii* e a doença pulmonar pode ser classificada em três grupos: (i) alérgica, (ii) de colonização intracavitária e (iii) invasiva (SEVERO, PORTO & LONDERO, 1998). MILLER e colaboradores (1993) descreveram dois casos de pacientes com aspergilose broncopulmonar alérgica recorrente e que apresentaram uma exacerbação da micose broncopulmonar alérgica devido à colonização por *P. boydii*, apresentando imunoglobulina E (IgE) total, IgG e IgE específica, teste cutâneo e preceptina para este fungo, acompanhados de um quadro clínico bem definido para pseudallescheriose broncopulmonar alérgica (MILLER *et al.*, 1993). A doença pulmonar invasiva por *P. boydii* pode se caracterizar pela presença de um nódulo solitário assintomático ou por uma pneumonia necrotizante, fatal na maioria dos casos ((SEVERO, PORTO & LONDERO, 1998). Em indivíduos não imunossuprimidos, o isolamento do fungo a partir do escarro, demonstra uma colonização transiente dos brônquios e/ou pulmões, principalmente, cavidades previamente formadas devido à tuberculose ou à fibrose cística, as quais são condições que predispõem à colonização intracavitária com a posterior formação de bola fúngica (TRAVIS, ROBERTS & WILSON, 1985). *P. boydii* é o segundo fungo filamentoso encontrado mais frequentemente em pacientes com fibrose cística, com um índice de prevalência de 8,6% (PIHET *et al.*, 2009); nesta condição clínica, estima-se que as alterações prévias no epitélio broncopulmonar decorrentes da infecção bacteriana e da resposta inflamatória, sejam fatores que predispõem à infecção fúngica (ZOUHAIR *et al.*, 2001, PIHET *et al.*, 2009).

A morfologia de *P. boydii* no tecido infectado é idêntica a de diversos outros agentes que causam infecções fúngicas oportunistas, como a presença de hifas hialinas septadas (**Figura 3**) semelhante à colonização por espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e outros. *P. boydii* e *Aspergillus* sp. podem coexistir em uma mesma infecção e, portanto, a presença dos dois agentes dificulta o diagnóstico diferencial em nível clínico, histopatológico, e principalmente pelas diferenças nas respostas as drogas antifúngicas (FENELON, 1999; PIHET *et al.*, 2009).

Também podem ser encontrados casos de artrite, osteomielite, infecções dos olhos, onicomicoses, infecções linfocutâneas e otite como resultado de inoculação traumática do fungo (GUARRO *et al.*, 2006).

Um outro tipo de manifestação clínica descrita em quadros causados pelo *P. boydii* é exemplificado pela formação de abscessos cerebrais causados pela aspiração de água contaminada (RUCHEL & WILICHOWSKI, 1995). Os fungos que comumente causam infecções no sistema nervoso central são espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*. No entanto, com o aumento na prevalência de indivíduos imunocomprometidos, outros fungos têm emergido como importantes causadores de doenças do sistema nervoso central. Entre esses agentes emergentes, *P. boydii* é um relativamente raro, mas bem documentado, patógeno potencial do sistema nervoso central, sendo letal na maioria dos casos (NESKY, MCDUGAL & PEACOCK, 2000). Em indivíduos imunocompetentes, algumas situações, como mecanismos de drenagem do líquido cérebro espinhal ou mesmo uma raquianestesia podem levar a um processo de meningite crônica causada por *P. boydii* (POZA *et al.*, 2000).

No Brasil, LOPES e colaboradores (1994) e SEVERO e colaboradores (1997) relataram alguns casos de nódulos subcutâneos causados por *P. boydii*, possivelmente de origem não traumática, em pacientes imunossuprimidos por tratamento com drogas imunossupressoras após transplantes de órgãos (LOPES *et al.*, 1994; SEVERO *et al.*, 1997). GINTER e colaboradores (1999) registraram um caso de pseudallescheriose cutânea atípica e que era refratária aos antifúngicos (GINTER *et al.*, 1999). SEVERO e colaboradores (2004) reportaram quatro casos de colonização intracavitária (bola fúngica) do trato respiratório por *S. apiospermum* (SEVERO, OLIVEIRA & IRION, 2004). Foi enfatizada, no estudo, a necessidade de uma busca minuciosa de conídios do fungo, a fim de estabelecer o diagnóstico etiológico no espécime clínico, evitando assim a administração de uma terapia inadequada, pois o tratamento das infecções causadas por *P. boydii* é complicado devido à resistência do fungo as drogas antifúngicas clássicas, como por exemplo, anfotericina B (SEVERO, OLIVEIRA & IRION, 2004; CORTEZ *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009).

O tratamento ideal para essas infecções é desconhecido e os índices de mortalidade são muito altos na ausência de tratamento com antifúngicos (STEINBACH *et al.*, 2003a,b).



Figura 2: Exemplos de micetomas micóticos. Fontes: (GUARRO *et al.*, 2006; CORTEZ *et al.*, 2008).

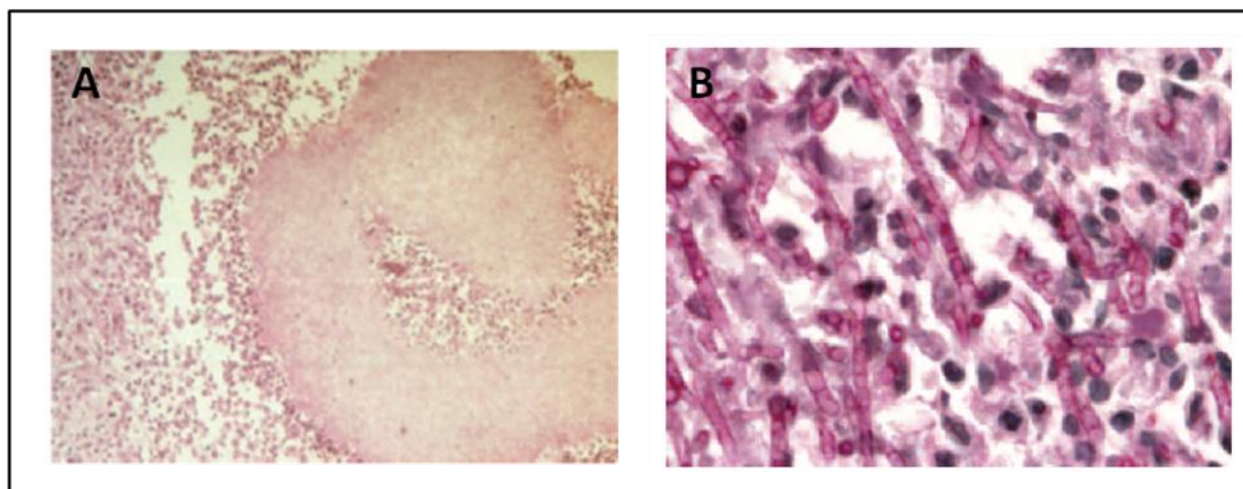


Figura 3: (A) Contre transversal de uma fístula mostrando a presença de grãos e infiltrado inflamatório. (B) Infecção em tecido humano. Presença de infiltrado de

neutrófilos e monócitos oriundos da resposta imune hospedeira. Fonte: (CORTEZ *et al.*, 2008).

1.6. Terapia antifúngica

Como mencionado anteriormente, *P. boydii* pode ser confundido no tecido com outros fungos filamentosos, o que faz com que infecções sistêmicas ocasionadas por esse fungo possam ser facilmente confundidas com outros quadros causados por espécies hialinas, como as pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* (NUCCI, 2003). Considerando que a anfotericina B é a droga de escolha para o tratamento da aspergilose e *P. boydii* é resistente a essa droga, tal erro resultaria numa terapia inadequada. Essa é potencialmente uma das razões para uma alta taxa de mortalidade por pseudallescheriose invasiva (GONZALEZ *et al.*, 2005).

Vários estudos mostraram que drogas antifúngicas, como anfotericina B, nistatina, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e terbinafina apresentam baixa atividade *in vitro* contra *S. apiospermum* (GUARRO *et al.*, 2006). Entretanto, alguns estudos indicaram alguma atividade pelo itraconazol (WALSH *et al.*, 1995, WALSH & GROLL, 1999; CHAVEIRO *et al.*, 2003). Porém, devido ao isolamento de algumas cepas de *P. boydii* resistentes ao itraconazol, o voriconazol (triazol de segunda geração derivado do fluconazol) tem emergido como uma potente droga antifúngica utilizada no tratamento de pseudallescheriose pulmonar invasiva, disseminada e pseudallescheriose do sistema nervoso central (KANAFANI, COMAIR & KANJ, 2004). Há ainda, no entanto, outro fator a ser considerado: devido à existência de múltiplas interações medicamentosas do voriconazol com outras drogas administradas na clínica, o que inclui drogas utilizadas com fins de imunossupressão em pacientes transplantados, nem sempre seu uso é possível. Neste caso, a droga de escolha para o tratamento das pseudallescherioses permanece desconhecida (O'BRYAN, BROWNE & SCHONDER, 2002). Outros agentes antifúngicos, como os novos azóis, são promissores, como o triazol ravuconazol (CARRILLO & GUARRO, 2001). A atividade dos antifúngicos do grupo das equinocandinas tem sido considerada fraca (GUARRO *et al.*, 2006). Utiliza-

se também como tratamento, principalmente da bola fúngica, a intervenção cirúrgica, com a finalidade de remover o tecido lesionado pelo fungo (GONZALEZ *et al.*, 2005).

Devido à baixa susceptibilidade de fungos do complexo *Pseudallescheria/Scedosporium* a esses agentes antifúngicos, vários estudos analisaram a combinação desses agentes. A combinação anfotericina B / fluconazol e anfotericina B / micafungina apresentam uma grande sinergia (WALSH *et al.*, 1995, YUSTES & GUARRO, 2005). O mecanismo de sinergia ainda não está claro. Micafungina exerce atividade antifúngica através da inibição da (1,3)- β -D-glucana sintase, interferindo na síntese da parede celular do fungo, o que provavelmente facilita a ação da anfotericina B na membrana celular em menores concentrações (GUARRO *et al.*, 2006). Alguns trabalhos também já demonstraram a sinergia entre agentes antifúngicos e certos anticorpos. A combinação de caspofungina e anticorpo anti- β -glucana, por exemplo, intensifica o dano causado em hifas por células polimorfonucleares (LAMARIS *et al.*, 2008).

Parte II: *Histoplasma capsulatum*

1.7. Histórico, biodiversidade e taxonomia de *Histoplasma capsulatum*

A histoplasmose é uma micose sistêmica causada por um fungo dimórfico, o *Histoplasma capsulatum*. A doença foi pela primeira vez descrita por Samuel Darling, no Panamá, que entre 1905 e 1906 necropsiou três casos disseminados da doença, dois dos quais provenientes da Ilha de Martinica, onde hoje esta micose é reconhecidamente endêmica. A doença descrita por este patologista era similar à leishmaniose visceral e, portanto, tendo sido erroneamente considerada ser causada por um protozoário encapsulado. Somente em 1934, o microrganismo foi corretamente identificado como um fungo com dimorfismo térmico (POONWAN *ET AL.*, 1998, SILVA-VERGARA *et al.*, 2001, SANO & MIYAJI, 2003).

Taxonomicamente, o *H. capsulatum*, é um eucarioto, do Domínio Eukarya, encontra-se na divisão (filó) Ascomycota, subdivisão (subfiló) Ascomycotina, classe Ascomycetes, ordem Onygenales, família Onygenaceae, gênero *Histoplasma* (*Ajellomyces*), espécie *Histoplasma capsulatum*; sendo que esta apresenta três variedades: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum* (KERSULYTE *et al.*, 1992; KWON-CHUNG *et al.*, 1992; PERROTTA *et al.*, 2001) baseadas nas características morfológicas (CAMPBELL & BERLINER, 1973), polimorfismo genético, (KEATH *et al.*, 1989, SPITZER *et al.*, 1989; CARTER *et al.*, 1997) e preferência por diferentes regiões geográficas e hospedeiros. Tais variedades do fungo são evolutivamente, ecologicamente e biologicamente diferentes (VINCENT *et al.*, 1986) e cada uma responsável por uma forma da doença (WHEAT *et al.*, 2001a,b). A fase sexuada denomina-se *Ajellomyces capsulatus*, sendo pouco comum seu isolamento no laboratório clínico.

Morfologicamente, o *H. capsulatum* var. *capsulatum* e o *H. capsulatum* var. *duboisii* são indistinguíveis em sua fase micelial, no entanto, em tecidos animais o *H. capsulatum* var. *duboisii* é encontrado como elemento leveduriforme, de forma ovalada,

maior e de parede mais espessa do que a *H. capsulatum* var. *capsulatum*, medindo de 10 a 15 μm , de localização extracelular no tecido do hospedeiro quando corado por PAS ou pela prata-metanamina (KERSULYTE *et al.*, 1992; KWON-CHUNG *et al.*, 1992; PERROTTA *et al.*, 2001).

Trata-se de um fungo termodimórfico, difícil de ser cultivado *in vitro* dependendo da variedade a ser examinada, e os métodos utilizados para seu cultivo assim como o tempo de cultura *in vitro* afetam diretamente sua morfologia, esporulação e capacidade de dimorfismo (PERROTTA *et al.*, 2001; SILVA-VERGARA *et al.*, 2001, WHEAT *et al.*, 2001a,b). As características morfológicas e dimorfismo são adaptações dos fungos para sua preservação na natureza (HOLBROOK & RAPPLEYE, 2008).

1.8. Características morfológicas

Em meios de cultura definidos à temperatura ambiente, o *H. capsulatum* apresenta um desenvolvimento filamentosos, cresce como culturas brancas, algodonosas, de desenvolvimento lento, com micélio aéreo, que tendem a escurecer com o tempo. Em temperatura corpórea (37°C), desenvolve-se em sua fase leveduriforme formando colônias cremosas, úmidas, brilhantes e lisas. Em temperatura ambiente, observam-se hifas hialinas, septadas, ramificadas, que produzem microconídios ou clamidoconídios lisos e equinulados e macroconídios tuberculados. Na temperatura corpórea e em meios complexos, pode-se observar, microscopicamente, pequenas células leveduriformes medindo de 1 a 5 μm de diâmetro, que são encontradas, quando no tecido do hospedeiro, quase que exclusivamente no interior de macrófagos. As células leveduriformes, no meio de cultura, podem apresentar brotamento, o que raramente se observa nos tecidos. Em geral, as leveduras são ovaladas e frequentemente apresentam gemulação única. **(Figura 4)** (DRUTZ, 1989; HAJJEH, 1995; DEODHARE & SAPP, 1997; SILVA-VERGARA *et al.*, 2001; WHEAT *et al.*, 2001a)

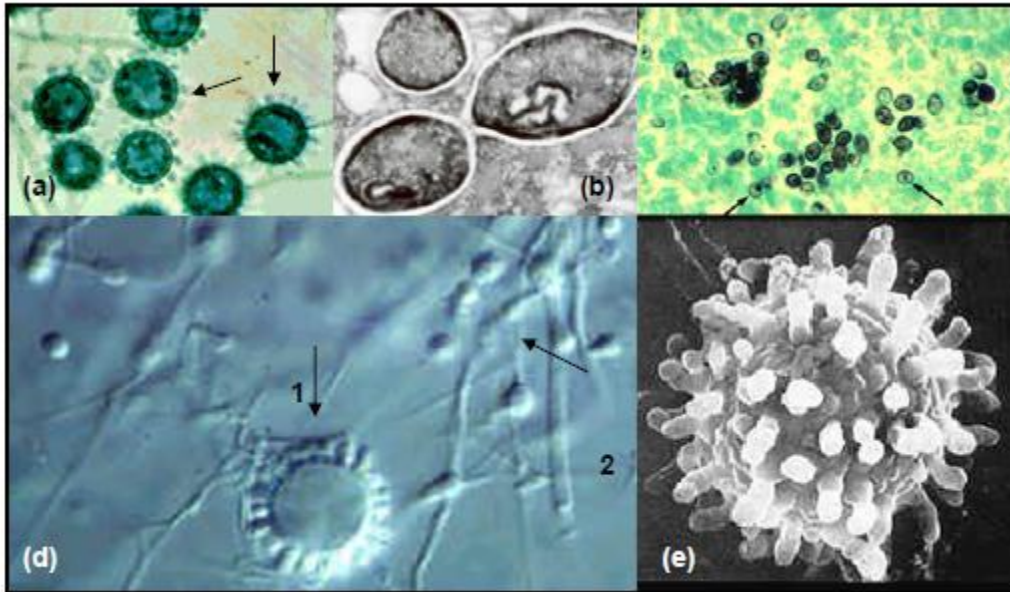


Figura 4: Morfologia de *H. capsulatum* var. *capsulatum*. (a) Conidiogênese em fase micelial. Fonte: www.vetmed.wisc.edu/students/vetmycology/lab.htm; (b) Microconídio. Fonte: www.fmvz.unam.mx/.../patologia/microscopia.htm; (c) Fase leveduriforme no tecido. Fonte: www.cat.cc.md.us/.../lab10/histlung.html; (d) Macroconídios (1) e microconídios (2). Fonte: www.doctorfungus.org/.../histoplasmosis.htm; (e) Macroconídio tuberculado. Fonte: www.mycolog.com/chapter23.htm.

1.9. Epidemiologia

O *H. capsulatum* é um fungo sapróbita. O habitat deste patógeno é o solo contendo fezes de aves e morcegos, que servem como um bom meio de crescimento para o organismo, podendo persistir no ambiente após a contaminação por longos períodos de tempo. Podem ser encontrados também em fezes de outros mamíferos como cachorros, gatos, ratos e outros roedores, carnívoros de vida silvestre e em marsupiais como o *Didelphis albiventris*, encontrado no estado de Minas Gerais no Brasil (SILVA-VERGARA *et al.*, 2001), e em solos com alto teor de nitrogênio e fosfato recolhidos nos locais frequentados por estes animais, o que confirma a presença do fungo na natureza (DEODHARE & SAPP, 1997; SILVA-VERGARA *et al.*, 2001). As

aves não albergam o fungo devido à alta temperatura corporal, mas os morcegos podem ser portadores crônicos, excretando formas viáveis em suas fezes (KERSULYTE *et al.*, 1992; PERROTTA *et al.*, 2001; SILVA-VERGARA *et al.*, 2001).

A histoplasmose é amplamente distribuída no continente americano. O *H. capsulatum* é cosmopolita, amplamente distribuído em regiões subtropicais e tropicais, nas quais existem áreas de grande endemicidade. É altamente prevalente em determinadas áreas dos EUA (regiões centrais e sul do país, ao longo dos vales dos rios Mississipi e Ohio) (SILVA-VERGARA *et al.*, 2001), México, Honduras, Guatemala, Nicarágua, Panamá, em várias ilhas do Caribe (Jamaica, Porto Rico, Martinica e Cuba) e em diversos países sul-americanos, principalmente Venezuela, Colômbia, Peru, Brasil, Argentina e Uruguai (SZANISZLO, KANG & CABIB, 1985; KERSULYTE *et al.*, 1992; PERROTTA *et al.*, 2001; SILVA-VERGARA *et al.*, 2001; SANO SANO & MIYAJI, 2003, 2003). Casos também têm sido descritos na África, onde as duas variedades (*capsulatum* e *duboisii*) co-existem, e no Sudeste Asiático, em particular na Tailândia, Malásia, Indonésia, Índia e Vietnã (AJELLO *et al.*, 1960; SANO SANO & MIYAJI, 2003; UEDA *et al.*, 2003). Raramente tem sido diagnosticada na Europa, à exceção da Itália, onde poucos casos foram observados (KERSULYTE *et al.*, 1992, PERROTTA *et al.*, 2001). Como já mencionado, a variedade *duboisii* ocorre apenas nas áreas tropicais da África, com 70% dos casos provenientes da Nigéria, Zaire, Uganda e Senegal. Casos esporádicos têm sido publicados na Europa em imigrantes africanos, provenientes de áreas endêmicas da micose. No Brasil, antes do surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a histoplasmose era raramente diagnosticada, constituindo uma curiosidade observada apenas em doentes com linfoma ou outras neoplasias e, esporadicamente, em transplantados renais. Nos anos de 1980 a 1990, com o advento da AIDS, centenas de casos de histoplasmose, em particular na forma disseminada, foram observados entre os portadores desta síndrome, passando a ter esta micose um lugar de destaque entre as doenças fúngicas vistas no país. Epidemias de histoplasmose aguda têm ocorrido em áreas endêmicas e não endêmicas, após a exposição a ambientes contaminados com o fungo, particularmente cavernas onde habitam morcegos, galinheiros, telhados de casas abandonadas, dentre outros. Estes

surtos já foram observados no Brasil nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso e Minas Gerais. Em geral, nas áreas endêmicas de histoplasmoze, mais de 80% da população, com idade maior que 20 anos, mostram reações cutâneas de hipersensibilidade à histoplasmina positivas. Essa prova cutânea é um método simples e eficaz para reconhecer infecções passadas, assintomáticas e subclínicas, estabelecendo a endemidade de uma região (MENGES *et al.*, 1967a). De acordo com estudos epidemiológicos de PERROTTA e colaboradores (2001), KERSULYTE e colaboradores (1992) e AJELLO (1960) acredita-se que as diferentes variedades do fungo tenham uma distribuição regional limitada: a *H. capsulatum* var. *capsulatum* tem distribuição mundial, é endêmica na América, incluindo o Brasil (AJELLO *et al.*, 1960,; KERSULYTE *et al.*, 1992; PERROTTA *et al.*, 2001) e algumas áreas da África, Ásia e Europa; a *H. capsulatum* var. *duboisii* é encontrada somente na África e, por último, a *H. capsulatum* var. *farciminosum* foi descrita apenas como patógeno de cavalos e mulas em algumas áreas da Europa, África e Ásia (KERSULYTE *et al.*, 1992, PERROTTA *et al.*, 2001, UEDA *et al.*, 2003).

O isolamento do *H. capsulatum* de animais silvestres e domésticos naturalmente infectados tem sido utilizado como método complementar na determinação da distribuição geográfica da histoplasmoze indicando a existência de fontes comuns de infecção aos homens e animais em determinada região. Várias espécies de mamíferos pertencentes às ordens dos roedores, canídeos, felídeos, marsupiais e quirópteros são suscetíveis a esta infecção fúngica (MENGES, 1951, 1954d, 1955, MENGES *et al.*, 1950, 1952, 1954a,b,c, 1955, 1965, 1967a,b), mas somente os quirópteros parecem participar ativamente do ciclo epidemiológico desta micose sistêmica, porque são suscetíveis à infecção, podendo disseminar o fungo de um local a outro (TAYLOR & SHACKLETTE, 1962), além de adubarem os solos com suas fezes. HOFF & BIGLER (1981) demonstraram que, apesar de certas espécies participarem no ciclo do *H. capsulatum* como disseminadores ativos deste microrganismo no ambiente, não significa que todas as espécies de morcegos tenham histoplasmoze ou sejam capazes de atuarem como disseminadores; com isso, a importância dos morcegos na dinâmica

da transmissão da histoplasmose ainda não está totalmente esclarecida (HOFF & BIGLER., 1981).

No Brasil, alguns estudos apontam para a pesquisa em animais domésticos e silvestres. Além de espécies já conhecidas como suscetíveis ao *H. capsulatum*, foram encontradas outras nunca descritas na literatura médica, como o *Proechimys dimidiatus* (NAIFF *et al.*, 1985). Todas as espécies animais que foram encontradas naturalmente infectadas estão descritas em revisões feitas sobre a histoplasmose animal no Brasil (NAIFF *et al.*, 1985). Após estas revisões, NAIFF e colaboradores (1985) demonstraram quatro gambás *Didelphis marsupialis* e duas pacas *Agouti paca* infectados, capturados na região Amazônica.

1.10. Infecção

A histoplasmose também é conhecida como doença de Darling, citomicose reticulo endotelial, doença das cavernas e doença dos “exploradores de cavernas” devido às suas características clínicas e epidemiológicas (SZANISZLO, KANG & CABIB, 1985; SAROSI *et al.*, 1986a,b; DRUTZ, 1989; MUNIZ *et al.*, 2001). Pode ser considerada uma infecção micótica clinicamente similar a infecção bacteriana da tuberculose, pois tanto o *H. capsulatum* quanto o *Mycobacterium tuberculosis* utilizam os macrófagos como célula hospedeira e podem causar comprometimento agudo ou crônico do pulmão, infecção disseminada e reativação da doença (GLATMAN-FREEDMAN & CASADEVALL, 1998, TEITELBAUM *et al.*, 1998). É uma doença sistêmica e respiratória (RUBIN *et al.*, 1959; MUNIZ *et al.*, 2001), relativamente rara, restrita a surtos epidêmicos, apresentando manifestações variadas, dependendo do estado imunológico do paciente.

O ser humano adquire a infecção através da inalação dos conídios presentes na natureza. A maioria das infecções é leve ou subclínica e pode ser diagnosticada retrospectivamente através da prova cutânea com a histoplasmina, como já

comentado, ou pela presença de pequenas lesões calcificadas contendo os fungos nos pulmões e linfonodos mediastinais. A maioria dos conídios inalados chega intacto aos alvéolos pulmonares (EMMONS, 1950), estimulando uma resposta inflamatória do hospedeiro, composta de células mononucleares e macrófagos, que são inaptos para destruir o microrganismo. De maneira geral, o microrganismo cresce como um organismo multicelular no meio ambiente (forma infectante) e conídios, fragmentos de hifas e/ou outros elementos infecciosos do fungo são inalados por humanos ou outros animais. No hospedeiro, são fagocitados pelos macrófagos pulmonares e depois se convertem, intracelularmente, a leveduras capazes de replicar em macrófagos onde exista uma diminuição da capacidade microbiciada ocasionada, por exemplo, por alterações do sistema imune do hospedeiro (SZANISZLO, KANG & CABIB, 1985; JOHNSON *et al.*, 1986; REID & SCHAFFER, 1999; NOSANCHUK *et al.*, 2008a,b), vindo a ser esta a trajetória da infecção. Em hospedeiros imunocompetentes, no entanto, os macrófagos adquirem atividade fungicida e controlam a infecção. A fungemia transitória, antes do desenvolvimento da imunidade, contribui para a distribuição de granulomas calcificados no fígado e baço frequentemente observados durante a necropsia de pacientes de áreas endêmicas.

H. capsulatum pode ser considerado um dos patógenos oportunistas mais importantes para o homem (FERREIRA & BORGES, 2009). Pacientes com linfomas, transplantados renais, cardíacos e hepáticos, pacientes em uso de altas doses de corticosteróides e, particularmente, doentes com AIDS podem desenvolver quadros graves de histoplasmose disseminada, resultantes da recrudescência de infecções latentes e, menos frequentemente, de reexposições ao microrganismo em áreas hiperendêmicas (HOFF *et al.*, 1981).

→ Infecção pulmonar aguda ou histoplasmose clássica: a maioria das infecções causadas pelo *H. capsulatum* é assintomática ou subclínica; os casos sintomáticos manifestam-se comumente como infecções autolimitadas do trato respiratório. A aspiração maciça de conídios do fungo pode levar ao aparecimento de uma forma

pulmonar aguda, grave, após um período de incubação de uma a três semanas (GAUR & LICHTWARDT, 1980; HOFF *et al.*, 1981; NAIFF *et al.*, 1985).

Ainda em relação à histoplasmose clássica, a histoplasmona é um quadro raro de infecção pelo *H. capsulatum* que corresponde ao quadro de massa tumoral pulmonar, constituída de tecido colágeno e calcificações, que aumenta lenta e progressivamente de tamanho e que envolve um foco primário cicatrizado com clínica geralmente silenciosa (**Figura 5**) (NEGRONI *et al.*, 1977; BONNET *et al.*, 2002; PAPHITOU & BARNETT, 2002). Tal quadro também foi diagnosticado por PAPHITOU & BARNETT (2002) no Texas (PAPHITOU & BARNETT, 2002). Além disso, tem sido relatada a ocorrência de histoplasmona intracraniana, enfermidade rara que pode mimetizar quadros de neoplasia cujo diagnóstico diferencial é a partir da evolução das lesões cerebrais. A fibrose mediastinal corresponde a mesma resposta de hipersensibilidade da histoplasmona, no entanto, envolve massa ganglionar de espaço mediastinal (NEGRONI *et al.*, 1977; SZANISZLO, KANG & CABIB, 1985; DRUTZ, 1989).

→ Histoplasmose pulmonar crônica: em indivíduos tabagistas, com mais de 50 anos de idade, portadores de doença pulmonar crônica obstrutiva, a histoplasmose pulmonar pode progredir lentamente para uma forma crônica que acomete principalmente os lobos superiores dos pulmões (HOFF *et al.*, 1981, NAIFF *et al.*, 1985).

→ Infecções disseminadas: a infecção primária por *H. capsulatum*, independente da presença de sintomatologia, pode evoluir com disseminação do fungo para todo o organismo, particularmente para órgãos ricos em macrófagos, tais como fígado, baço, linfonodos e medula óssea; as glândulas adrenais também mostram frequente acometimento. Normalmente, com o desenvolvimento da imunidade específica anti-*Histoplasma*, a infecção nestes focos metastáticos é controlada e o diagnóstico só pode ser realizado de forma incidental, através de biópsias que demonstrem a presença de formas leveduriformes do agente (MENGES *et al.*, 1952, 1954a; AJELLO *et al.*, 1960).

Raramente, um pequeno número de indivíduos com sistema imune aparentemente normal ou aqueles com alguma forma de imunodepressão podem desenvolver histoplasmose disseminada sintomática. Várias condições de depressão imunológica celular podem conduzir à disseminação do agente. Anteriormente à epidemia de AIDS, pacientes com neoplasias hematológicas (como leucemias e linfomas), transplantados renais ou pacientes recebendo corticosteróides, além de portadores de imunodeficiências celulares primárias eram os que mais comumente desenvolviam formas sistêmicas da micose. Em indivíduos com AIDS, a histoplasmose é grave, frequentemente fatal e ocorre quando o nível de linfócitos TCD4 está abaixo de 200 células/mm³ (EMMONS, 1950; AJELLO *et al.*, 1960; CANTEROS *et al.*, 2005), onde cerca de 20% deles podem desenvolver meningoencefalite. A evolução espontânea dessas formas clínicas é para o óbito na quase totalidade dos casos (GOODWIN *et al.*, 1973, 1980a,b; WHEAT *et al.*, 2007). Em crianças, em geral com menos de um ano de idade (quando o sistema imune ainda é imaturo), a histoplasmose pode se manifestar na forma disseminada, com rápida evolução para óbito, se não diagnosticada precocemente (FOJTASEK *et al.*, 1994; HAJJEH, 1995; MOCHERLA & WHEAT, 2001).

O diagnóstico da histoplasmose baseia-se na detecção do fungo em secreções e/ou tecidos e nas reações sorológicas específicas. Para os casos de histoplasmose pulmonar aguda, a história de exposição a locais possivelmente contaminadas é peça fundamental para o diagnóstico. Na ausência deste dado epidemiológico, a sorologia pode confirmar este diagnóstico. As culturas também raramente mostram positividade na forma aguda. Na histoplasmose pulmonar crônica, as culturas de escarro, obtidas por coleta habitual ou por broncoscopia, podem demonstrar crescimento do fungo, geralmente dentro de duas semanas (FOJTASEK *et al.*, 1994; DEODHARE & SAPP, 1997; GUIMARAES *et al.*, 2004; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007).

Os exames laboratoriais frequentemente isolam *H. capsulatum* na fase miceliana e confirmam sua identificação convertendo-o para a fase leveduriforme, após incubação a 37°C. Vários testes sorológicos com diferentes sensibilidades e especificidades estão disponíveis para o diagnóstico da histoplasmose. A imunodifusão e a fixação de

complemento, utilizando a histoplasmina como antígeno, mostram positividade em cerca de 80% dos pacientes, incluindo aqueles com infecção aguda autolimitada. Reações falso-negativas podem ocorrer em pacientes imunodeprimidos com doença disseminada. A detecção de antígeno é o método sorológico mais útil para o diagnóstico da histoplasmose disseminada em pacientes com AIDS. Um antígeno polissacarídeo do fungo tem sido detectado no sangue em 85% e na urina em 95% dos indivíduos infectados; o teste pode ser aplicado também no líquido e nas secreções respiratórias. A técnica utilizada para a sua detecção é o radioimunoensaio e está hoje disponível comercialmente. Testes cutâneos utilizando a histoplasmina não são recomendados para o diagnóstico, porque um resultado positivo não distingue uma infecção passada da atual. Mesmo um resultado negativo não afasta doença ativa. Estes testes são ideais para estudos epidemiológicos em áreas endêmicas da micose (PORTER *et al.*, 1965; FOJTASEK *et al.*, 1994; DEODHARE & SAPP, 1997; GOMEZ *et al.*, 1997, GUIMARAES *et al.*, 2004; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007; VEGA *et al.*, 2007).

Existem ainda duas formas da doença, a histoplasmose africana causada por *H. capsulatum* var. *duboisii* e a histoplasmose farciminosi conhecida como Pseudofacy, causada pelo *H. capsulatum* var. *farminosum* (GABAL *et al.*, 1983, 1985; SELIM *et al.*, 1985; DELCLAUX *et al.*, 1992; GUGNANI & MUOTOE-OKAFOR, 1997; GUGNANI, 2000; KASUGA *et al.*, 2003).

A histoplasmose africana é endêmica de regiões de clima tropical úmido da África subtropical (VINCENT *et al.*, 1986), mas alguns casos têm sido descritos em outras regiões, inclusive na América do Sul (NEGRONI *et al.*, 1977). É caracterizada por doença localizada e de evolução crônica, com manifestação primária cutânea cujo aspecto morfológico varia de pápulas e nódulos a lesão ulcerovegetante. As características distinguíveis desta doença para a histoplasmose clássica são a raridade das lesões pulmonares, a prevalência das formas localizadas com envolvimento da pele, mucosa bucal, tecidos subcutâneos, articulações e osso e presença de lesões linfáticas e viscerais abdominais na forma disseminada (SZANISZLO, KANG & CABIB,

1985; DRUTZ, 1989; GUGNANI & MUOTOE-OKAFOR, 1997; GUGNANI, 2000) (Figura 5).

A histoplasmose farciminosi causa o episódio de linfagenite em eqüinos (cavalos, mulas e burros) com envolvimento patológico de ossos, abscessos de tecidos moles, lesões cutâneas e não causa doença em humanos (GABAL *et al.*, 1983, 1985; SELIM *et al.*, 1985, SZANISZLO, KANG & CABIB, 1985).

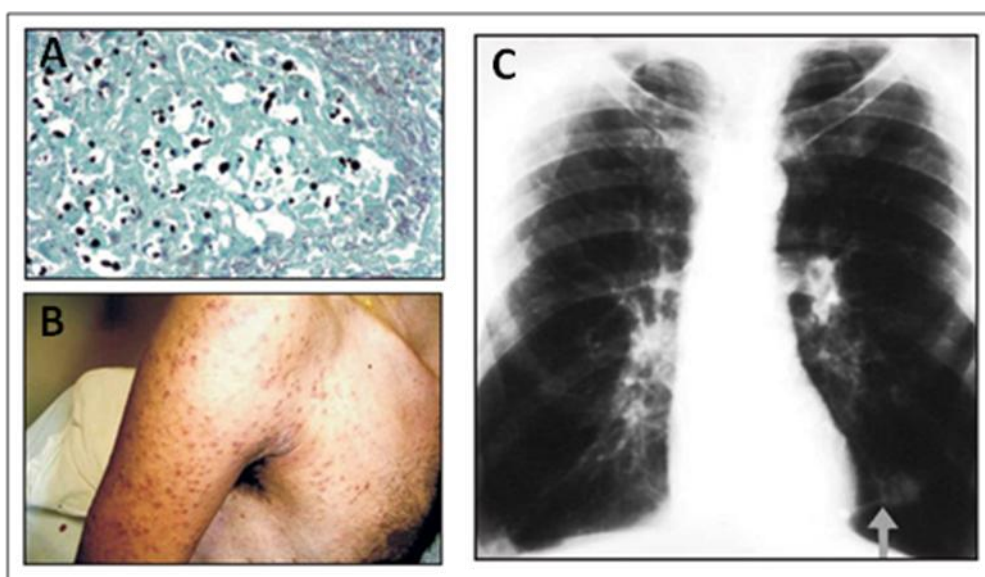


Figura 5: Histoplasmose: (A) Formas leveduriformes de *H. capsulatum* corados pela prata (Gomori-Grocott). (B) Histoplasmose cutânea disseminada em paciente HIV positivo. (C) Histoplasmona pulmonar confirmado histologicamente. A cicatrização de um infiltrado localizado pode levar ao desenvolvimento de um nódulo residual (seta), que aumenta progressivamente à medida que material fibrótico vai se depositando ao seu redor; esta lesão é denominada histoplasmoma e pode levar ao diagnóstico errôneo de neoplasia pulmonar. Fonte: (FERREIRA & BORGES, 2009).

1.11. Terapia antifúngica

A terapêutica da histoplasmose varia de acordo com a síndrome clínica e o estado imune do hospedeiro. *H. capsulatum* é sensível a diversos antifúngicos, tais

como anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e fluconazol. Historicamente, a anfotericina B tem sido o antifúngico mais efetivo para tratar esta micose, principalmente os casos disseminados. Nos últimos anos, entretanto, vários estudos têm demonstrado a eficácia dos derivados tiazólicos nesta infecção fúngica, inclusive nas formas disseminadas (WHEAT *et al.*, 2007, FERREIRA & BORGES, 2009).

Diversos estudos também demonstraram a eficácia do itraconazol, como terapia primária inicial na histoplasmose disseminada dos pacientes com AIDS. O índice de remissão com o uso deste derivado triazólico é similar ao visto com a anfotericina B (80 a 100% dos casos). A droga deve ser mantida por 1 ano, quando a dosagem deve ser diminuída para a manutenção a longo prazo. Nos pacientes HIV-negativos, não-imunodeprimidos, com as formas disseminadas crônicas da micose, sem envolvimento meníngeo, o itraconazol é a droga de escolha. Nestes doentes, a terapia deve ser mantida por cerca de seis meses a um ano. Cetoconazol oral não é recomendado para tratamento de indução ou manutenção em pacientes com AIDS e histoplasmose disseminada. O uso do fluconazol oral pode ser uma alternativa a ser considerada no tratamento de manutenção dos pacientes que falharam em absorver o itraconazol. Posaconazol e voriconazol são ativos sobre *H. capsulatum* e podem ser alternativas futuras no tratamento dessa micose (DISMUKES *et al.*, 1992, MANGINO & PAPPAS, 1995, FERREIRA & BORGES, 2009).

A introdução da terapia antiretroviral (HAART) deve ser realizada o mais precoce possível nos pacientes com AIDS avançada, com o intuito de melhorar a imunidade celular desses indivíduos. Mulheres grávidas portadoras de qualquer forma da micose devem ser tratadas com anfotericina B (desoxicolato ou lipossomal), uma vez que os triazólicos são contra-indicados em gestantes (WHEAT *et al.*, 1984, 1985; DELCLAUX *et al.*, 1992, MOCHERLA & WHEAT, 2001, WHEAT *et al.*, 2001a, 2007; FERREIRA & BORGES, 2009).

Parte III: A parede celular fúngica e resposta imune às infecções fúngicas

1.12. A parede celular fúngica e a interação com o hospedeiro

Por meio das estruturas existentes em sua superfície, os microrganismos interagem com o meio abiótico e com seus respectivos hospedeiros. Dentre estas moléculas, as adesinas são responsáveis pela aderência de fungos a diferentes estruturas hospedeiras. Sabe-se que a aderência de microrganismos patogênicos a tecidos do hospedeiro é considerada um pré-requisito para a sua disseminação e um passo essencial para o estabelecimento da infecção (LIMA *et al.*, 2001). Neste contexto, vários estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de entender melhor as moléculas envolvidas nestes processos.

A parede celular, por ser normalmente a estrutura mais externa da célula fúngica, possui várias moléculas importantes no processo de interação do fungo com componentes do ambiente e receptores do hospedeiro. Essa estrutura é de vital importância para a célula fúngica, essencialmente por conferir proteção física e osmótica. Compreendendo cerca de 20 a 30% do peso seco da célula, a parede celular se caracteriza por ser uma estrutura que confere rigidez, protegendo a célula de injúrias mecânicas, estando diretamente envolvida com a morfogênese fúngica (CABIB *et al.*, 1997; PONTON, 2008). A parede celular também funciona como barreira filtrante, impedindo a passagem de moléculas de alta massa molecular e, conseqüentemente, evitando o dano à membrana plasmática (CABIB *et al.*, 1997; PONTON, 2008). Por isso, essa estrutura desperta grande interesse em vários estudos, uma vez que essa é determinante de processos de adesão e invasão de tecidos hospedeiros, além de ser um importante alvo para agentes antifúngicos (REISS *et al.*, 1992).

A composição e o arranjo molecular da parede celular são finamente regulados e variam em resposta a uma série de condições ambientais, o que demonstra seu alto dinamismo (SMITS *et al.*, 1999; PONTON, 2008). Os componentes estruturais são principalmente polissacarídeos (80-90%) como a quitina e as glucanas, e em menor parte por proteínas, glicoproteínas e lipídeos (CABIB *et al.*, 1988). O esqueleto

estrutural é definido por uma camada de glicoproteínas, seguida por uma camada de α -glucanas (1→3) ligadas, β -D-glucanas (1→3) ligadas, β -D-glucanas (1→6) ligadas e quitina (CABIB *et al.*, 1988, 1997, 2001; ALBUQUERQUE *et al.*, 2008; CHAFFIN, 2008). Em geral, a estrutura dos polissacarídeos é conservada entre os fungos, mas a composição proteica varia muito entre as diferentes espécies (CABIB *et al.*, 1988, 1997, 2001; CHAFFIN, 2008). Encontram-se ligadas covalentemente ao esqueleto de glucanas as glicoproteínas da parede celular, que no caso da parede de *C. albicans*, contem unidades de manose em sua estrutura. As manoproteínas compreendem cerca de 40 a 50% do peso seco da parede celular deste fungo (CABIB *et al.*, 1988, NIMRICHTER *et al.*, 2005) (**Figura 6**).

Além disso, vários fatores de virulência já descritos em fungos, como os peptidopolissacarídeos, os glicoesfingolipídeos e as glucanas, são componentes da parede celular, mostrando a importância dessa estrutura para a virulência e patogênese dos fungos (PINTO *et al.*, 2001, 2002, 2004, 2005).

Em *H. capsulatum* a glucose, seguida pela manose e galactose são os principais monossacarídeos encontrados na parede celular durante as fases de micélio e levedura. Já foi descrito que a quitina é o maior componente da parede celular de *H. capsulatum* (KANETSUNA *et al.*, 1974). Há diferenças entre as ligações glicosídicas entre glucanas entre as fases micelial e leveduriforme. α - e β -glucanas apresentam diferentes funções de acordo com a fase morfológica deste fungo (DOMER, HAMILTON & HARKIN, 1967; DOMER, 1971; DOMER & HAMILTON, 1971). α -glucana é um polissacarídeo linear, contendo unidades de glucose (1→3) ligadas, enquanto β -glucana é um polissacarídeo ramificado, consistindo de uma cadeia principal de unidades de glucose (1→3) ligadas, substituída por cadeias laterais de glucose (1→6) ligadas, que variam em comprimento e distribuição, formando um complexo terciário estabilizado por ligações hidrogênio entre cadeias (KANETSUNA *et al.*, 1974). A fase leveduriforme de *H. capsulatum* apresenta na sua parede celular uma camada interna de quitina e uma camada externa fibrosa de α -1,3-glucanas (KANETSUNA *et al.*, 1974), que se sobrepõe às β -glucanas. Há uma diferença entre os arranjos fibrilares de

quitina nas paredes celulares das formas de micélio e levedura de *H. capsulatum* (KANETSUNA, 1981).

A parede celular pode ser classificada em 2 quimiotipos, quimiotipo I e quimiotipo II, baseada na concentração de α -1,3-glucanas que as (DOMER, HAMILTON & HARKIN, 1967; DOMER, 1971; DOMER & HAMILTON, 1971). A parede celular do quimiotipo II contém uma mistura de α e β -glucanas, com predominância de glucanas na configuração α . Diferentemente, o quimiotipo I é inteiramente composto por glucanas na configuração β (DAVIS *et al.*, 1977). Somado a isto, a parede celular do quimiotipo I contém mais quitina e menos glucana que aquela do quimiotipo II (DOMER, HAMILTON & HARKIN, 1967; DOMER, 1971; DOMER & HAMILTON, 1971; FERREIRA & BORGES, 2009).

Dentre as principais moléculas presentes na parede celular, os polissacarídeos e peptidopolissacarídeos são fundamentais, contribuindo para a estrutura, integridade e função das células. Já as proteínas e glicoproteínas estão expostas na parte mais externa da parede celular e estão envolvidas numa série de processos de interação das células fúngicas com o ambiente extracelular. Dessa forma, bloquear essas moléculas com anticorpos parece influenciar fortemente a interação fungo-hospedeiro, além de facilitar processos de fagocitose por células do sistema imune. Outras moléculas importantes na composição da parede celular são os glicoesfingolipídeos, responsáveis por processos de crescimento, diferenciação e morfogênese, além de contribuir para a resposta imune do hospedeiro (PINTO *et al.*, 2002, 2004).

Alguns desses glicoconjugados presentes na parede celular são utilizados em estudos taxonômicos de fungos e no diagnóstico de infecções fúngicas. PINTO e colaboradores (2001), por exemplo, isolaram um peptidopolissacarídeo antigênico da forma micelial de *P. boydii* por extração aquosa à quente, como citado anteriormente. A diferença estrutural e imunológica da estrutura encontrada em *Sporothrix schenckii* em relação à encontrada em *P. boydii*, sugere que o antígeno contendo ramnose isolado de micélio de *P. boydii* pode ser útil para o diagnóstico específico de infecções causadas por este fungo (PINTO *et al.*, 2001).

A estrutura e composição da parede celular é amplamente dinâmica, variando em resposta a uma série de fatores ambientais, permitindo processos como brotamento, crescimento celular e adaptação a estresses do ambiente (SMITS *et al.*, 1999). Estudos recentes mostraram que diversas moléculas do citosol e da membrana, como glicolipídeos, melanina, proteína do choque térmico e histonas migram para a parede celular, juntamente com proteínas secretadas, tornando esta estrutura dinâmica e imunorreativa (NIMRICHTER *et al.*, 2005).

A parede celular dos fungos é um alvo em potencial não só para as defesas naturais do hospedeiro, mas também para agentes antifúngicos que atuam bloqueando a síntese de moléculas como as glucanas, quitina e glicoproteínas, sem interferir no metabolismo da célula hospedeira (NIMRICHTER *et al.*, 2005, PONTON, 2008).

Tendo em vista a importância da parede celular, tanto para a biologia celular do fungo, quanto para as relações patógeno-hospedeiro, vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de elucidar os seus aspectos estruturais e funcionais. Dentre os componentes que vêm sendo caracterizados pode-se citar a presença de enzimas hidrolíticas (KNEIPP *et al.*, 2004, KIFFER-MOREIRA *et al.*, 2007), proteínas de choque térmico (MATTHEWS & BURNIE, 2004), glicosfingolipídeos (RODRIGUES *et al.*, 2000), melanina (NOSANCHUK & CASADEVALL, 2003a) e histonas (NOSANCHUK & CASADEVALL, 2003b).

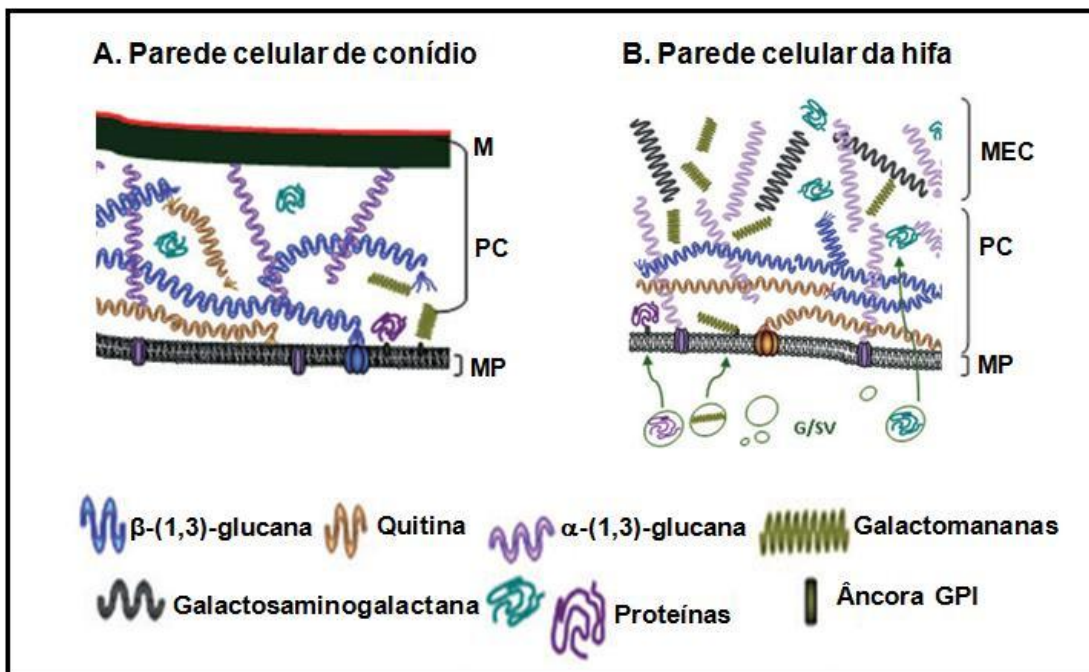


Figura 6: Esquema da parede celular de conídios (A) e hifa (B) usando *A. fumigatus* como modelo. M: melanina; PC: parede celular; MP: membrana plasmática; MEC: matriz extracelular. Fonte: LATGÉ, 2010.

1.13. Patogenicidade do complexo *Pseudallescheria/Scedosporium*

A patogenicidade de um microrganismo é definida como sendo sua capacidade de causar dano ao hospedeiro, o que define o quadro de doença. A prevenção ou a ocorrência da doença dependerá de vários aspectos da interação entre o agente causador e o hospedeiro (CASADEVALL *et al.*, 1999). O meio ambiente é o principal reservatório fúngico, por isso, o contágio através do contato entre indivíduos é menos frequente e a maioria das infecções são contraídas a partir de fontes na natureza. Todavia, algumas infecções oportunistas podem ter origem na própria microbiota (WINGARD, 1999a,b). Vários trabalhos têm mostrado que um grande número de espécies de fungos exibem como fatores responsáveis pela virulência a capacidade de crescimento à temperatura corpórea hospedeira (37°C) e em pH fisiológico, a transição morfológica, a presença de propágulos infecciosos de tamanho compatível com a deposição alveolar, a composição química da parede celular, a produção de enzimas hidrolíticas (associadas às células ou secretadas), a expressão de proteínas ligadoras de componentes de matriz extracelular, a produção de toxinas e de adesinas, e, por fim, dentre outros fatores, a expressão de polissacarídeos capsulares e pigmentos (BOUCHARA *et al.*, 1988, 1990; CABIB *et al.*, 1988, 1997; DOERING *et al.*, 1999; BITTENCOURT *et al.*, 2006).

Com relação a *P. boydii*, até o momento pouco se conhece sobre suas estruturas de superfície e possíveis fatores de virulência (SANTOS *et al.*, 2009). Entre as moléculas bem caracterizadas e envolvidas na interação do fungo com o hospedeiro, destacam-se um peptidopolissacarídeo denominado de peptidoramnanana – PRM (PINTO *et al.*, 2001, 2004, 2005), um glicoesfingolipídeo monohexosilceramida (PINTO *et al.*, 2002) e o polissacarídeo α -glucana (BITTENCOURT *et al.*, 2006).

Em 2001, foi isolado um peptidopolissacarídeo antigênico de forma miceliana de *P. boydii* por extração aquosa à quente (PINTO *et al.*, 2001). Análises da composição monossacarídica, metilação e ressonância magnética nuclear de próton e carbono-13 identificaram a presença de uma peptidoramnomanana (glicoconjugado complexo constituído por uma cadeia peptídica substituída com glicanas O- e N-ligadas) com estrutura distinta da encontrada em *S. schenckii*. A porção carboidrato consistia de uma cadeia principal de unidades de manose (1→6) ligadas e cadeias laterais de α -Ramp-(1→3)- α -Ramp ligadas (1→3) à cadeia principal (**Figura 7**). Análises de imunofluorescência revelaram que essa molécula é expressa tanto em micélio quanto em conídio. Os oligossacarídeos O-ligados foram obtidos por β -eliminação em condições redutoras alcalinas, e sendo os principais responsáveis pela antigenicidade da PRM, uma vez que a de-O-glicosilação reduz aproximadamente 80% da sua reatividade com anticorpos policlonais anti-PRM (SANTOS *et al.*, 2009). Esses dados sugerem fortemente que a PRM caracterizada em *P. boydii* possui propriedades antigênicas particulares, as quais se apresentam úteis para sua utilização com fins de realização de um diagnóstico específico das infecções causadas por este fungo (PINTO *et al.*, 2004). Além da aplicação como antígeno diagnóstico, a PRM parece ter também funções relacionadas à patogenicidade. O pré-tratamento de conídios com anticorpo anti-PRM, bem como o tratamento de células de carcinoma de laringe humana (HEp2) com a molécula de PRM solúvel levaram à uma significativa diminuição na adesão e na internalização de conídios pelas células HEp2 em relação ao controle. A PRM solúvel foi capaz de se ligar a um polipeptídeo de 25 kDa na superfície de HEp2, o que sugere um papel como molécula adesiva no processo de interação com o hospedeiro. Resultados similares foram observados em ensaios de interação com células A549 (PINTO *et al.*, 2004).

Sabe-se que a diferenciação de conídio a micélio é uma etapa essencial no ciclo de vida de *P. boydii* (SANTOS *et al.*, 2009). PINTO e colaboradores (2004) demonstraram que após 2 a 4 h de interação do fungo com células HEp2 era observada a formação de projeções similares a tubos germinativos. Esse processo foi associado à invasão e morte das células epiteliais. De modo interessante, quando os

conídios foram incubados somente com meio DMEM ou Sabouraud essas projeções são observadas somente após 6 h de incubação, o que sugere que a presença das células epiteliais contribuiu com a aceleração na formação de tubos germinativos, provavelmente por induzir mecanismos de sinalização celular que culminaram com a diferenciação morfológica (PINTO *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2009).

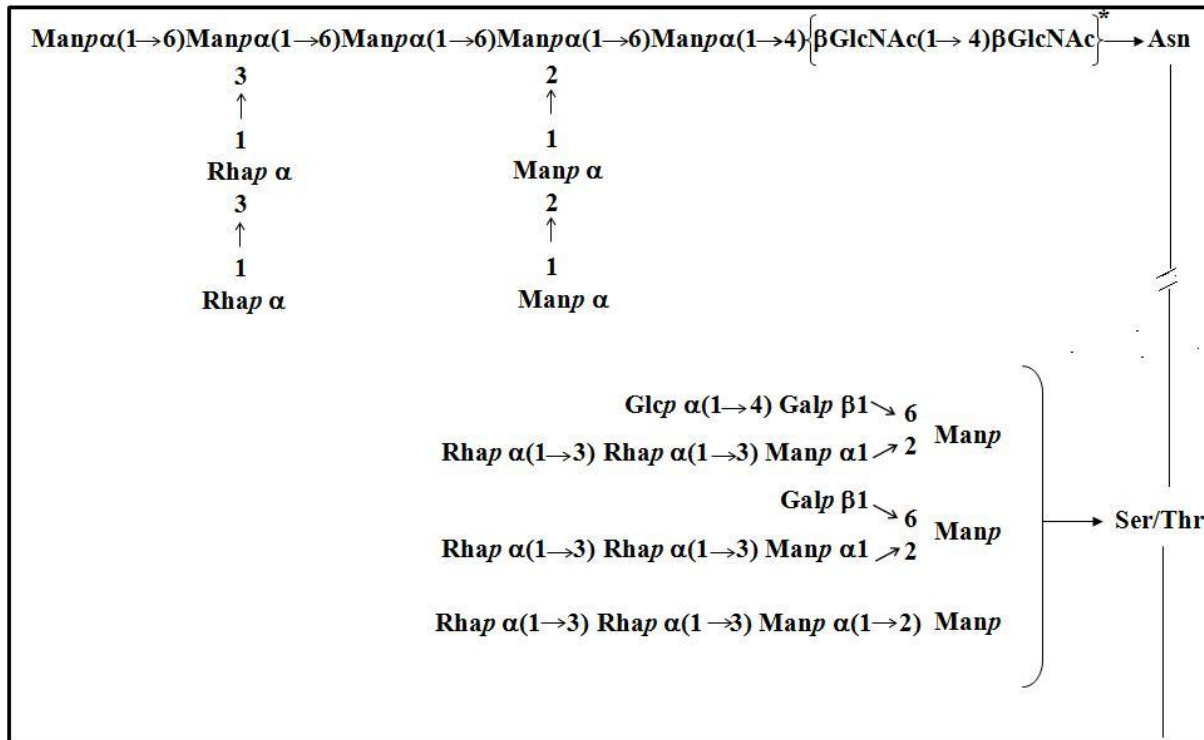


Figura 7: Caracterização parcial da estrutura proposta para PRM de *P. boydii*.

*Dissacarídeo sugerido baseado nas *N*-glicanas de *Saccharomyces cerevisiae* – (NAKAJIMA & BALLOU, 1974). Fonte: o autor, baseado em (PINTO *et al.*, 2005).

1.14. Patogenicidade de *H. capsulatum*

Hospedeiros mamíferos ficam expostos ao *H. capsulatum* quando inalam conídios e fragmentos de hifas no ambiente. A conversão da fase sapróbita micelial à fase parasítica (leveduras) é o primeiro passo na patogênese. A fagocitose dos microconídios e de pequenos fragmentos de hifa ocorre normalmente de 4 a 6 h após a

inalação, e a conversão para a fase leveduriforme se completa no período de 24 a 72 h (HEMPEL & GOODMAN, 1975).

A característica mais marcante no que concerne à patogênese de *H. capsulatum* é a capacidade deste fungo em parasitar macrófagos. *H. capsulatum* se liga a receptores da família CD18, presentes em células fagocíticas profissionais, como macrófagos pulmonares, macrófagos derivados de monócitos e polimorfos nucleares (BULLOCK AND WRIGHT, 1987; SCHNUR & NEWMAN, 1990). Uma vez no interior do fagossoma, *H. capsulatum* é capaz de se multiplicar na mesma taxa que observada em um meio de cultura líquido (HOWARD, 1964). Assim, em contraste com o papel usual de eliminar microrganismos no pulmão, os macrófagos fornecem um ambiente adequado para o crescimento deste fungo facilitando a disseminação do mesmo em outros tecidos. *H. capsulatum* consegue sobreviver no interior dos macrófagos e outras células fagocíticas pela capacidade de evitar a liberação do “burst” oxidativo presente nestas células, bem como tornar o pH do fagossoma próximo ao neutro. A ligação de C3bi nos receptores CR3 (um membro da família dos receptores CD18) leva a uma falha no estímulo da resposta oxidativa dos macrófagos e sugere-se que *H. capsulatum* possa se ligar ao receptor CR3 por um mecanismo similar ao do C3bi. Sabe-se atualmente que a Hsp 60 pode se ligar diretamente ao receptor CR3 (BULLOCK & WRIGHT, 1987)

Em adição ao dimorfismo, vários determinantes de virulência de *H. capsulatum* vêm sendo caracterizados. Alguns deles estão descritos a seguir.

RITOSSA descobriu em larvas de *Drosophila melanogaster* um gene específico ativado por choque de temperatura (RITOSSA, 1996, POCKLEY, 2001). No entanto, apenas em 1974, os primeiros produtos destes genes foram identificados e o termo proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins - Hsp) foi adotado (TISSIERES, MITCHELL & TRACY, 1974, POCKLEY, 2001). Trabalhos posteriores demonstraram que estas proteínas estão presentes, e podem ser induzidas, em todas as espécies de organismos, e que são proteínas filogeneticamente conservadas. As proteínas de choque térmico são categorizadas em várias famílias e nomeadas com base na sua massa molecular aproximada, como por exemplo, a proteína de 70 kDa que é

denominada Hsp70. Em condições fisiológicas, várias destas proteínas têm funções de chaperonas e proteases com funções intracelulares.

Hsp60 e Hsp70 induzem a secreção de citocinas inflamatórias em monócitos. Hsp60 induz secreção de IL-6 de monócitos humanos via sinalização através de CD14, uma proteína quinase (p38), sendo capaz ainda de se ligar ao TLR4, do qual CD14 é um co-receptor, induzindo a expressão de TNF- α e óxido nítrico. Isto acaba por induzir a expressão de uma gama de citocinas, dentre as quais, pode-se citar IL-12 e IL-15. Hsp70 pode agir através de uma via CD14-dependente, estimulando IL-1, IL-6 e TNF- α , bem como por vias CD14-independentes, que leva a produção de TNF- α , sugerindo que CD14 é também um co-receptor de um receptor ainda não caracterizado para Hsp70. Ambas as vias de Hsp70 são cálcio-dependentes (POCKLEY, 2001) (**Figura 8**).

A Hsp60 funciona como um ligante do receptor CR3 em macrófagos, iniciando o parasitismo intracelular deste fungo (POCKLEY, 2001). As Hsps de *H. capsulatum* são super-reguladas durante a transição micélio-conídio, e estão amplamente envolvidas no processo de enovelamento de proteínas (POCKLEY, 2001).

H. capsulatum apresenta Hsp60 em sua superfície celular. Esta molécula tem papel já determinado na resposta imune celular durante a histoplasmose e na proteção de camundongos infectados com o fungo. GUIMARÃES e colaboradores (2009) geraram anticorpos monoclonais (IgG1 e IgG2a) contra a Hsp60 de *H. capsulatum* e mostraram que anticorpos IgG1 tiveram um papel protetor na histoplasmose experimental, prolongando a sobrevivência de camundongos infectados. Somado a isto, estes anticorpos protetores foram capazes de reduzir a sobrevivência do fungo no interior do macrófago, bem como diminuir a lesão tecidual e o número de fungos nos tecidos infectados. Foi possível observar ainda um aumento nos níveis de citocinas IL-2, IL-12 e TNF- α , com decréscimo nos níveis de IL-4 e IL-10 (GUIMARAES *et al.*, 2009).

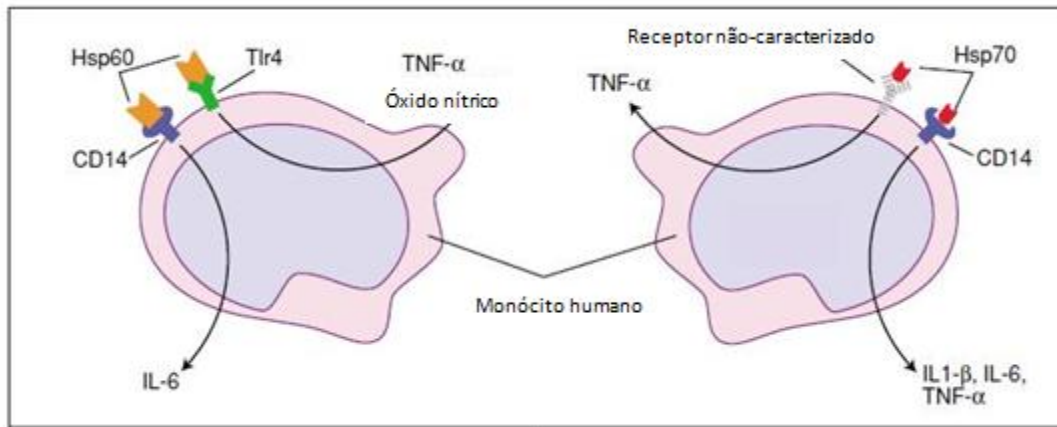


Figura 8: Representação esquemática mostrando as Hsp60 e Hsp70 ligando-se em receptores presentes em monócitos humanos, induzindo a secreção de citocinas inflamatórias pelos monócitos. Fonte: (POCKLEY, 2001).

1.15. O sistema imune *versus* infecções fúngicas

Uma vez no interior do hospedeiro, o fungo induz a ativação da resposta imune. A principal linha de defesa inata do hospedeiro consiste de polimorfonucleares circulantes e macrófagos derivados de monócitos, com destaque para os macrófagos alveolares, devido à porta de entrada do fungo pelo trato respiratório (Roilides *et al.*, 2009). Os fagócitos possuem receptores (PRRs) que reconhecem padrões moleculares (PAMPs) na superfície dos conídios e das hifas, e geram sinais moleculares para atividade pró-inflamatória e antifúngica. Receptores do tipo Toll (TLR), receptores de manose e dectina-1 apresentam um importante papel no reconhecimento desses padrões fúngicos (NETEA *et al.*, 2006a,b,c; VAN DE VEERDONK *et al.*, 2008a,b).

1.15.1. Resposta imune à pseudallescheriose

Em fungos, as α -glucanas possuem um papel, já bem caracterizado, como ligantes para receptores TLR (KEDZIERSKA, 2007) e como moléculas ativadoras da resposta imune (HOHL *et al.*, 2005). Em *P. boydii*, frações purificadas de α -glucana

foram capazes de se ligar ao complexo TLR2-CD14-MyD88 de macrófagos e células dendríticas, resultando na secreção de TNF- α e IL-12 (BITTENCOURT *et al.*, 2006). O reconhecimento da α -glucana pode ter relevância na imunomodulação durante a infecção fúngica, favorecendo a resistência do hospedeiro pela secreção de IL-12 com consequente indução de um fenótipo Th1 ou, alternativamente, contribuir para a patologia pela liberação de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, provocando injúria tecidual (BITTENCOURT *et al.*, 2006).

A imunomodulação mediada por citocinas promove uma maior eficiência da resposta imune. Em fungos filamentosos como *P. boydii*, já foi demonstrado que IL-15 aumentou significativamente o dano causado por polimorfonucleares em hifas fúngicas (WINN *et al.*, 2003). Além disso, a liberação de IFN- γ induz a resposta do tipo celular, a qual favorece o combate a esse tipo de agente infeccioso (CHAVES *et al.*, 1996a,b). Alguns agentes antifúngicos parecem exercer efeitos semelhantes a essas citocinas. Posaconazol, anfotericina B e caspofungina, por exemplo, aumentam o dano na hifa causado por polimorfonucleares (GIL-LAMAIGNERE *et al.*, 2003, LAMARIS *et al.*, 2008).

Conídios e hifas de *P. boydii* são reconhecidos pelos PRRs na membrana dos fagócitos, e um sinal é transmitido intracelularmente. Este sinal é responsável pela ativação de genes que conduzem a uma defesa hospedeira efetiva, especialmente aquela que envolve citocinas pró-inflamatórias. *P. boydii* pode ser fagocitado por monócitos e neutrófilos, estimulando o “burst” oxidativo destas células. Citocinas como IL-15, GM-CSF, G-CSF e IFN- γ foram liberadas em experimentos *in vitro* utilizando *P. boydii* como estímulo. Estudos prévios já demonstraram a susceptibilidade a infecções por fungos do complexo *Pseudallescheria-Scedosporium* em *Drosophila* deficiente no receptor do tipo Toll. Fungos deste complexo também promovem a liberação de IL-6, IL-8 e TNF- α por monócitos humanos (WINN *et al.*, 2003, 2005; WARRIS *et al.*, 2005; LAMARIS *et al.*, 2007; ROILIDES *et al.*, 2009).

1.15.2. Resposta imune à histoplasmose

Células T e fagócitos são essenciais para a defesa hospedeira contra *H. capsulatum* (ALLENDORFER, BRUNNER & DEEPE, 1999; GOMEZ *et al.*, 1998, 2001; MAYFIELD & RINE, 2007; NOSANCHUK *et al.*, 2008a,b). A imunidade protetora é caracterizada pela indução da produção de citocinas por células T, particularmente IFN- γ e TNF- α , as quais, subseqüentemente, ativam as células fagocíticas. Essa resposta promove a formação de granulomas, com células gigantes e necrose caseosa que posteriormente fibrosam e calcificam. Anticorpos específicos também são produzidos no soro dos pacientes. Esse tipo de resposta imune leva à cura da infecção primária e, neste estado, as pessoas se tornam muito resistentes às novas reinfecções, que excepcionalmente podem acontecer. Fungos viáveis podem permanecer nas áreas cicatrizadas por vários anos. A imunodepressão parece ser um fator preponderante em desencadear a reativação de uma infecção prévia (GOODWIN *et al.*, 1973, 1980a,b; FERREIRA & BORGES, 2009).

A forma clínica da histoplasmose apresentada pelos indivíduos que se infectam está na dependência da resposta imune, embora o tamanho do inóculo inalado também tenha sua importância. Formas disseminadas da micose, mostram uma resposta imune do tipo Th2, que produzem citocinas do tipo IL-4, IL-5 e IL-10, que são inibidoras da resposta protetora Th1. Neste caso, os granulomas são mal formados (ou não se formam), e há grande proliferação de macrófagos. Nos tecidos, a prova cutânea da histoplasmina é negativa, os títulos de anticorpos são elevados e o curso da doença é agudo e grave (GOODWIN *et al.*, 1973, GOODWIN *et al.*, 1980b, FERREIRA & BORGES, 2009).

A primeira linha de defesa para *H. capsulatum* são os macrófagos. No entanto, o papel dos macrófagos na histoplasmose é complexo, pelo fato de que estas células acabam por albergar o fungo, que sobrevive e replica nos fagolisossomas dos macrófagos. Ao contrário, células dendríticas podem destruir as leveduras de *H. capsulatum* ingeridas (GILDEA *et al.*, 2001), e os antígenos presentes nestas leveduras podem estimular células TCD8⁺ para, efetivamente, controlar a infecção fúngica (LIN *et al.*, 2005, NOSANCHUK *et al.*, 2008a,b).

A produção de TNF- α é induzida rapidamente após a infecção primária, e a neutralização desta molécula aumenta o número de fungos no tecido infectado e a mortalidade de camundongos infectados com *H. capsulatum* (ALLEENDOERFER *et al.*, 1998, LIN *et al.*, 2005). A inibição de TNF- α resulta na geração de células T CD4⁺CD25⁺, o que interfere com a imunidade efetiva em camundongos (DEEPE & GIBBONS, 2008). Achados clínicos comprovam que a inibição de TNF- α aumenta efetivamente o fator de risco para a reativação de histoplasmose latente em pacientes imunocomprometidos (DEEPE, 2005).

Camundongos deficientes em IFN- γ também apresentam aumento na mortalidade frente a histoplasmose experimental (CLEMONS *et al.*, 2000). Terapia com IFN- γ pode aumentar o êxito na contenção da histoplasmose murina (DEEPE, 1994) e já vem sendo utilizada com sucesso na terapêutica clínica em crianças com defeitos no receptor para IFN- γ (ZERBE & HOLLAND, 2005).

H. capsulatum induz a produção de anticorpos, o que é importante para métodos de diagnóstico da infecção (NOSANCHUK *et al.*, 2008a,b). Já vem sendo demonstrado que anticorpos podem afetar a patogênese de *H. capsulatum* em modelo animal (NOSANCHUK & CASADEVALL, 2003b). Camundongos com deficiência em células B apresentam mortalidade acelerada após reativação da histoplasmose experimental (ALLEN & DEEPE & GIBBONS, 2006; NOSANCHUK *et al.*, 2008 a,b).

O entendimento de como a resposta imune atua em infecções causadas pelos fungos do complexo *Pseudallescheria/Scedosporium*, bem como espécies fúngicas de *H. capsulatum*, é de grande importância para o esclarecimento da virulência desses fungos e para o desenvolvimento de formas mais eficientes de tratamento e controle destas infecções.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Utilizando os fungos *P. boydii* e *H. capsulatum* como modelos de estudo, nos propomos a investigar os efeitos de anticorpos monoclonais gerados contra moléculas de superfícies de ambos os fungos, em experimentos *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos referentes a *P. boydii*

2.2.1. Avaliar a reatividade de anticorpos monoclonais anti-PRM com a molécula purificada e com as formas de conídio de *P. boydii*.

2.2.2. Determinar a possível região de ligação dos anticorpos monoclonais anti-PRM com a molécula purificada.

2.2.3. Estudar a importância da molécula de PRM e de anticorpos monoclonais anti-PRM na interação de conídios *P. boydii* com células de linhagem celular de macrófagos.

2.2.4. Determinar os possíveis efeitos de conídios opsonizados com anticorpos monoclonais anti-PRM no contexto da interação com macrófagos J774.16, e suas possíveis consequências em funções efetoras de macrófagos, como a eficiência fungicida, a fusão do fagolisossoma e o “burst” oxidativo.

2.2.5. Estudar a influência destes anticorpos na germinação e na viabilidade celular fúngicas.

2.2.6. Avaliar a reatividade de anticorpos monoclonais anti-PRM com diferentes espécies fúngicas.

2.2.7. Desenvolver um modelo de pseudallescheriose murina e observar os efeitos dos anticorpos monoclonais anti-PRM no curso da infecção fúngica experimental.

2.3. Objetivos específicos referentes a *H. capsulatum*

2.3.1. Avaliar a reatividade de anticorpos monoclonais anti-proteína de 70KDa da superfície de *H. capsulatum* (anticorpo monoclonal denominado H1C) com as formas leveduriformes do fungo.

2.3.2. Estudar a importância do anticorpo H1C na interação de leveduras de *H. capsulatum* com células de linhagem celular de macrófagos.

2.3.3. Determinar os possíveis efeitos de leveduras opsonizadas com anticorpo H1C no contexto da interação com macrófagos J774.16, e suas possíveis consequências em funções efetoras de macrófagos, como a eficiência fungicida e o “burst” oxidativo.

2.3.4. Estudar a influência deste anticorpo na viabilidade de macrófagos no curso da infecção por leveduras de *H. capsulatum* previamente opsonizadas.

2.3.5. Desenvolver um modelo de histoplasmose murina e observar os efeitos do anticorpo monoclonal H1C no curso da infecção fúngica experimental.

3. Metodologia

3.1. Microrganismos e condições de cultivo

P. boydii: *P. boydii* cepa HLPB, isolado de paciente com micetoma micótico, foi gentilmente cedido pelo Dr. Bodo Wanke do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. O isolado foi confirmado como *P. boydii* pela Dra. Kathrin Tintelnot (Robert Koch-Institut, Berlin, Germany), por métodos moleculares. O sequenciamento das regiões ITS revelou que esta cepa utilizada nos estudos pertence à clade 4 (*S. apiospermum* sensu stricto), de acordo com a taxonomia proposta por (GILGADO *et al.*, 2005). A cultura foi mantida em tubos de rosca contendo 5 mL de meio batata dextrose sólido inclinado através de repiques mensais e incubação à temperatura ambiente (PINTO *et al.*, 2001). Os conídios foram obtidos em placa de Petri contendo meio batata dextrose após sete dias de cultivo à temperatura ambiente. Após este período, as suspensões de conídios foram obtidas através da raspagem das placas de Petri utilizando-se 5 mL de PBS estéril, pH 7,2. O material foi filtrado em gaze e lavado três vezes com PBS e centrifugado (3000 rpm, 10 min). O número de conídios, em cada preparação obtida, foi determinado por contagem em câmara hematocimétrica de Neubauer (PINTO *et al.*, 2001).

H. capsulatum: *H. capsulatum* G217B (ATCC, 26032) foi mantido a -80°C e 35% de glicerol. As leveduras foram crescidas em meio Ham's F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após 1 dia de crescimento as leveduras foram lavadas 3 vezes com PBS (10 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄ e 150 mM NaCl) estéril, pH 7,2, por centrifugação (3000 rpm, 10 min), seguido de contagem em câmara hematocimétrica de Neubauer.

S. apiospermum e *S. prolificans*: cepas de *S. apiospermum* e *S. prolificans* foram gentilmente cedidas pelo Dr. J. Guarro da Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina e Institut d'Estudis Avançats, Réus, Spain. O sequenciamento das regiões ITS revelou que a cepa denominada *S. apiospermum* e utilizada nos estudos pertence à clade 5 (*S. apiospermum* sensu stricto), de acordo com a taxonomia proposta por (GILGADO *et*

al., 2005). As culturas foram mantidas em tubos de rosca contendo 5 mL de meio Sabouraud-modificado (SAB-M; 2% de glucose, 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 2% de ágar). Para a obtenção de conídios, os fungos foram incubados em ágar SAB-M e após 7 dias de crescimento à temperatura ambiente, os conídios foram obtidos conforme já descrito para *P. boydii*.

C. albicans e *C. parapsilosis*: *C. albicans* SC5314 (ATCC, MYA-2876) e *C. parapsilosis* GA1 (GACSER, SALOMON & SCHAFER, 2005) foram também utilizadas no estudo as quais foram crescidas em meio YPD (1% extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica, 2% de glucose). Após 1 dia de crescimento, as leveduras foram lavadas 3 vezes com PBS estéril, pH 7,2, por centrifugação (3000 rpm, 10 min), seguido de contagem em câmara hematocimétrica de Neubauer.

A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por azul de Tripán usando câmara hematocimétrica de Neubauer. Para conídios e leveduras, este método demonstrou uma viabilidade inicial >95%, conforme confirmado por plaqueamento e contagem de UFC. As células J774.16 foram utilizadas nos experimentos somente quando viabilidade celular >90%.

3.2. Reagentes e linhagem celular

Um anticorpo anti-camundongo do tipo IgG (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL) foi usado como um controle de IgG irrelevante em todos os experimentos. Os marcadores fluorescentes 5-(e 6)-carboxi succinimidil tetrametilrodamina (NHSRho), CellTracker Red CMTPX e Faloidina-Alexa 488 foram obtidos da Molecular Probes (Carlsbad, CA). Triton X-100, isotiocianato de fluoresceína (FITC)-dextrana (massa molecular de 70.000), MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio] e paraformaldeído foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Tetrametil isotiocianato de rodamina (TRITC) foi obtido da Southern Biotechnology Associates Inc. O kit para biotinação EZ-Link sulfo-N-hydroxysulfosuccinimide foi oriundo da Pierce (Rockford, IL). A linhagem celular de macrófagos J774.16 (derivada de sarcoma de camundongo) foi crescida em DMEM

(Life Technologies, Carlsbad, CA) contendo 10% de soro fetal bovino (Gemini Bio-Products, Woodland, CA), 10% de meio sintético líquido para manutenção de hibridomas - NCTC-109 (Life Technologies), 1% de aminoácidos não-essenciais (Mediatech, Manassas, VA) e 1% de penicilina-estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37°C em 5% de CO₂. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por azul de Tripán usando câmara hematocitométrica de Neubauer.

3.3. Geração de anticorpos monoclonais anti-PRM de *P. boydii* e de anticorpos monoclonais H1C para *H. capsulatum*

Os hibridomas dos anticorpos monoclonais isotipo IgG1, denominados F10, C7 e C11 foram gentilmente cedidos pela Prof. Sandra Estrazulas Farias, do Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil.

Os hibridomas do anticorpo monoclonal isotipo IgG1, H1C contra uma proteína de 70 kDa da superfície celular de *H. capsulatum* (GOMEZ *et al.*, 1997) foram gentilmente cedidos pela Prof. Beatriz L. Gomez da Medical and Experimental Mycology Unit, Corporacion para Investigaciones Biologicas, Medellin, Colombia.

Os anticorpos foram purificados dos sobrenadantes de cultura celular usando-se uma coluna de proteína G (Pierce Biotechnology), de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas dos anticorpos foram testadas para comprovar a ausência de endotoxina com um kit comercial para a detecção de lipopolissacarídeo na amostra (*Limulus ameobocyte* assay - BioWhittaker Inc., Walkersville, MD).

3.4. ELISA indireto

PRM foi adicionada (25-50 ng de proteína em 50 µL de PBS [0,01 M; pH 7,2] por poço ou 1 x 10⁶ de conídios (*P. boydii*, *S. apiospermum* e *S. prolificans*) ou leveduras (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *H. capsulatum*) em 50 µl de PBS por poço, em placas de 96 poços (Corning, Inc., Costar polystyrene EIA/RIA plates), seguido de incubação por 1 h a 37°C e “overnight” a 4°C. Após este período as placas foram lavadas 3 vezes em tampão TBS-T (10 mM de tampão Tris-salina [TBS], 0,1% de Tween 20 [pH 7.3]) e e

postas em tampão de bloqueio (1% de BSA em PBS). As placas foram novamente lavadas e os anticorpos monoclonais foram adicionados aos poços, em uma concentração de 100 µg/mL em tampão de bloqueio, e incubados a 37°C por 1 h. Após 3 lavagens, as placas foram incubadas a 37°C por 1 h com uma IgG anti-camundongo conjugada à fosfatase alcalina (Southern Biotech, Birmingham, AL) diluída 1:1000 em tampão de bloqueio em um volume final de 100 µL por poço. Após as lavagens, a reação enzimática foi revelada com a adição de pNPP a 37°C por 30 min. As absorbâncias foram mensuradas em leitor de ELISA (Bio-Tek µQuant) a 405 nm. O mesmo ensaio foi realizado utilizando-se como antígeno leveduras de *H. capsulatum* (1×10^6 /poço, em 50 µl de PBS, e H1C como anticorpo primário na concentração de 100 µg/mL em tampão de bloqueio. Com exceção destas modificações, o ensaio foi realizado conforme já descrito acima.

3.5. Microscopia de fluorescência

As análises de imunofluorescência foram realizadas pela incubação dos conídios de *P. boydii* com os anticorpos monoclonais F10, C7 e C11 com o objetivo de acessar e avaliar o perfil de ligação dos três anticorpos. Os conídios foram lavados 3 vezes em PBS por centrifugação (3000 rpm, 10 min). O sobrenadante foi removido e os conídios foram incubados em tampão de bloqueio por 1 h a 37°C. Após esta etapa, as células foram incubadas com os três diferentes anticorpos monoclonais e com o anticorpo irrelevante em uma concentração de 100 µg/mL em tampão de bloqueio por 1 h a 37°C. As células foram lavadas em PBS e incubadas em 100 µL de IgG anti-camundongo conjugada a TRITC na diluição de 1:100 em tampão de bloqueio por 1 h a 37°C. Após 3 lavagens, as células foram resuspensas em 50 µL de uma solução de montagem (0,01 M de *N*-propilgalato diluído em PBS:glicerol (1:1, vol/vol). 10 µL desta suspensão foram aplicados em lâminas de microscopia e examinada no microscópio de fluorescência Olympus AX70 (Olympus America Inc., Center Valley, PA) usando um filtro de 620 nm filter e aumento de 40x. Análises de imunofluorescência também foram realizadas, utilizando leveduras de *H. capsulatum* para a observação do perfil de marcação do anticorpo H1C, utilizado em uma curva de concentração. A técnica

utilizada foi a mesma já previamente descrita para conídios de *P. boydii* e anticorpos anti-PRM, excetuando-se que, no caso das leveduras de *H. capsulatum*, foi utilizado Alexa 488 na diluição de 1:100 em tampão de bloqueio, ao invés de TRITC.

3.6. ELISA de competição

Os anticorpos monoclonais anti-PRM foram biotinilados usando um kit de biotinição comercial, de acordo com as instruções do fabricante (Pierce, Rockford, IL, USA). O ensaio de ELISA foi feito conforme previamente descrito, com algumas modificações. A molécula de PRM foi utilizada como antígeno, na concentração de 25 ng/poço. Após o bloqueio, uma concentração constante de anticorpo biotinilado foi incubada com uma concentração decrescente de anticorpo não biotinilado, diferente do qual foi biotinilado, em tampão de bloqueio por 1 h a 37°C. Após lavagens, avidina conjugada com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) foi adicionada aos poços, e a placa foi incubada por 1 h a 37°C. A leitura foi feita em um comprimento de onda de 405 nm, após a reação ter sido revelada com pNPP. Para comparações, como controles foram feitos ensaios para leitura em 405 nm de anticorpos biotinilados na ausência de qualquer outro anticorpo.

3.7. Caracterização do epítipo de ligação dos anticorpos monoclonais através do tratamento com endoglicosidase

Com o objetivo de remover as glicanas *N*-ligadas, 10 µg de PRM foram tratadas com 100 mU de *N*-glicosidase F - PNGase F (P0704, New England Biolabs) a 37°C por 20 h. A PRM tratada foi utilizada como antígeno na placa de ELISA na concentração de 25 ng/poço, e a reação de ELISA ocorreu como previamente descrito para ELISA indireto (THORNTON, 2009).

3.8. Caracterização do epítipo de ligação dos anticorpos monoclonais através da digestão com protease

PRM purificada (25 ng/poço) foi incubada com proteinase K (2,5 µg/mL; Sigma-Aldrich) em solução de SDS a 1% por 1 h a 4°C (THORNTON, 2009). Após as

lavagens, os anticorpos monoclonais foram aplicados na placa de 96 poços e o procedimento foi feito como previamente descrito para ELISA indireto.

3.9. Ensaios de fagocitose

3.9.1. Interação entre conídios de *P. boydii* e macrófagos, na presença de anticorpos monoclonais anti-PRM ou da molécula de PRM purificada

Macrófagos da linhagem J774.16 foram plaqueados na concentração 5×10^5 células por poço, em placa de 24 poços, e incubados “overnight” a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após 24 h em cultura, os macrófagos foram colocados para interagir com os conídios do fungo, numa proporção de 5 conídios:1 macrófago, em 500 µL de meio DMEM. A placa foi incubada por um período de 1h em estufa à 37°C em 5% CO₂. Ao final deste período, os poços foram lavados 2 vezes com DMEM e uma vez com PBS pH 7,2. As lamínulas foram então fixadas em solução de metanol a 40%. Através de microscópio óptico foi determinado o índice fagocítico, onde um mínimo de 200 macrófagos foi contado, para cada condição.

Ensaios de opsonização dos conídios com os anticorpos monoclonais anti-PRM e com a molécula purificada de PRM também foram realizados. Para a opsonização com os anticorpos monoclonais (100 µg/mL), os conídios foram pré-incubados com esses anticorpos por 1 h a 37°C e posteriormente foram adicionados aos poços com os macrófagos. O controle com uma IgG irrelevante foi adicionado ao experimento. Nos ensaios envolvendo a molécula de PRM, 100 µg/mL de PRM purificada foram colocadas para interagir previamente com os macrófagos, seguindo-se a infecção com os conídios de *P. boydii* (GUIMARAES *et al.*, 2009).

3.9.2. Fagocitose de conídios de *P. boydii* na presença de bloqueadores dos receptores de macrófagos

Outros ensaios de fagocitose foram realizados para avaliar melhor a associação entre conídios de *P. boydii* e macrófagos, através de citometria de fluxo. Células J774.16 foram incubadas com anticorpos bloqueadores anti-CD11 (anti-CD11a, anti-CD11b e

anti-CD11c), anti-CD14 e anti-CD18 (Southern Biotechnology Associates Inc.), que serão responsáveis pelo bloqueio dos receptores CD11, CD14 e CD18, respectivamente, presentes nas superfícies dos macrófagos, por 1 h a 37°C, antes da interação com os conídios de *P. boydii*. Os receptores de complemento CR3 (ou Mac-1) e CR4 (ou p150,95), presentes em superfícies de células imunes, como os macrófagos, são constituídos pelos receptores CD11b/CD18 e CD11c/CD18, respectivamente, e estão envolvidos em processos de reconhecimento de organismos opsonizados por moléculas do sistema complemento. Já o complexo CD11a/CD18 compõe o LFA-1, uma molécula de superfície presente em células como neutrófilos e macrófagos. Os conídios foram incubados em uma solução de 0,5 mg/mL de FITC em PBS a 37°C por 30 min. Os conídios foram lavados 3 vezes em PBS pH 7,2 para retirar o excesso de FITC não ligado, e incubados com os macrófagos controles e previamente incubados com os anticorpos bloqueadores de receptores de macrófagos por 1 h a 37°C, em placas de 24 poços. Ao final do tempo de interação, os poços foram lavados 3 vezes em PBS pH 7,2 para a remoção dos conídios que não foram internalizados. As amostras foram ressuspensas em 1 mL de PBS e analisadas por citometria de fluxo em equipamento FACS-Calibur™, equipado com um laser de argônio de 5 W (Coherent), 488 nm, 250 mW (Becton Dickinson, San Jose, CA). Um mínimo de 10.000 eventos foi analisado por condição (DURAUER *et al.*, 2008).

3.9.3. Interação entre leveduras de *H. capsulatum* e macrófagos, na presença de anticorpos monoclonais H1C

Ensaio de fagocitose também foram realizados para leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com H1C nas concentrações de 12,5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL, através de métodos de FACS e microscopia confocal. A microscopia confocal foi utilizada para quantificar a adesão de leveduras opsonizadas com estas diferentes concentrações de H1C em macrófagos J774.16. Leveduras de *H. capsulatum* foram marcadas com CellTracker Red CMTPX “overnight” com agitação a 30°C. Após este período, as leveduras foram exaustivamente lavadas para eliminar resíduos do marcador fluorescente. As leveduras foram então incubadas com as diferentes concentrações de

anticorpo por 1 h a 37°C. Como controles negativos, as leveduras foram incubadas pelo mesmo período com uma IgG irrelevante ou apenas em PBS. O ensaio de fagocitose ocorreu como já previamente descrito. Os macrófagos foram permeabilizados com Triton X-100 e marcados para actina com Phalloidin-Alexa 488. As amostras foram fixadas e ressuspendidas em 50 µL de uma solução de montagem (0,01 M de *N*-propilgalato diluído em PBS:glicerol (1:1, vol/vol), e visualizadas usando o microscópio confocal Leica AOBS (ALVAREZ & CASADEVALL, 2007). Os ensaios de citometria de fluxo foram realizados de acordo com a metodologia previamente descrita, para avaliar o índice fagocítico de leveduras de *H. capsulatum* previamente opsonizadas ou não com as diferentes concentrações de H1C.

3.9.4. Interação entre leveduras de *C. albicans* e macrófagos, na presença de anticorpos monoclonais anti-PRM

Ensaio de fagocitose com leveduras de *C. albicans* foram realizados como já descrito previamente para conídios de *P. boydii*. Leveduras de *C. albicans* foram previamente opsonizadas com os anticorpos monoclonais anti-PRM de *P. boydii* na concentração de 100 µg/mL, e com PBS ou uma IgG irrelevante (100 µg/mL) como controles, por 1 h a 37°C. Células de *C. albicans* foram adicionadas na proporção 5:1 (leveduras: macrófago)

3.9.5. Cálculos

Para o cálculo do índice fagocítico de todos os ensaios de fagocitose, excetuando-se os analisados por citometria de fluxo, foram realizados os seguintes cálculos:

→ % de macrófagos infectados = n° de macrófagos infectados ÷ n° total de macrófagos X100

→ Média de conídios internalizados = n° de conídios fagocitados ÷ n° de macrófagos infectados

→ Índice fagocítico = % de macrófagos infectados X média de conídios internalizados.

3.10. Funções efetoras dos macrófagos

Macrófagos da linhagem J774.16 foram plaqueados na concentração 5×10^5 células por poço, em placa de 24 poços, e incubados “overnight” a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após 24 h em cultura, os macrófagos foram colocados para interagir com os conídios do fungo numa proporção 5:1 (conídios:macrófago). Os conídios foram previamente incubados com os anticorpos monoclonais anti-PRM, bem como com uma IgG irrelevante ou PBS, como controles, por 1 h a 37°C. Os anticorpos foram utilizados na concentração de 100 µg/mL.

A placa foi incubada por um período de 2 h em estufa a 37°C em 5% CO₂. Ao final desse período os poços foram lavados 3 vezes com PBS gelado (pH 7,2), e os macrófagos foram lisados pela adição de água destilada estéril gelada, durante 30 min.

As alíquotas foram plaqueadas em meio ágar batata dextrose, por 72 h a 30°C. Após este tempo, as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas em cada amostra. O percentual de crescimento foi determinado comparando-se o número de UFC provenientes de conídios de *P. boydii* opsonizados e incubados com macrófagos e o número de UFC de conídio opsonizados com IgG irrelevante, ou sem opsonização.

Para *H. capsulatum*, o ensaio foi realizado de maneira similar a *P. boydii*, com algumas modificações. Para H1C, foram utilizadas diferentes concentrações (12,5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL de H1C) para testar as funções efetoras dos macrófagos na presença de leveduras de *H. capsulatum* previamente opsonizadas com H1C. Após a lise dos macrófagos, as alíquotas foram plaqueadas em BHI-sangue 7 dias a 37°C. Após este período, a contagem de UFC foi efetuada.

Com o objetivo de avaliar se a presença dos anticorpos monoclonais opsonizando os conídios de *P. boydii* poderiam afetar o destino do fungo no interior dos macrófagos, a fusão entre fagossomas e lisossomas foi estudada. Monocamadas de macrófagos J774.16 foram incubadas em um meio sem a presença de vermelho de fenol (Meio DMEM/F12 non-phenol-red medium – Invitrogen, Carlsbad, CA) com 0,5 mg/mL de FITC-dextrana por 4 h a 37°C em presença de 5% de CO₂. Após este

período, as placas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas 3 vezes com PBS estéril, pH 7,2, e incubadas “overnight” na presença de meio DMEM/F12. Os conídios de *P. boydii* foram incubados com 40 µg/mL de NHRho a 4°C por 1 h. Os conídios foram lavados e incubados por 1 h a 37°C com 100 µg/mL de cada anticorpo monoclonal anti-PRM e da IgG irrelevante. Um controle de conídios apenas com PBS foi feito. Após lavagens, os conídios foram ressuspensos em DMEM e adicionados às culturas de J774.16 na proporção 5:1 (conídio:macrófago), seguindo-se incubação por 1 h a 37°C na presença de 5% de CO₂. Após o tempo de interação e lavagens, as células foram fixadas em 3,75% de paraformaldeído por 20 min a temperatura ambiente. Células foram observadas em microscópio de contraste de fase acoplado à fluorescência no aumento de 400X. O número de conídios de *P. boydii* marcados com rodamina e co-localização com FITC-dextrana, gerando uma coloração alaranjada, proveniente da sobreposição da cor verde oriunda da marcação com FITC dextrana, e vermelha da marcação do conídio com rodamina, e o número total de conídios no interior dos macrófagos marcados com rodamina foram contados para cada condição, para a determinação do porcentual de fagossomos fundidos com lisossomos, o que é caracterizado pela marcação em vermelho de conídios de *P. boydii* co-localizadas com um anel verde fluorescente referente a dextrana (SHI *et al.*, 2008).

Para avaliar a capacidade dos conídios de *P. boydii* germinarem e sobreviverem em meio ácido, os conídios foram incubados por 4 h em DMEM a pH 7,2 e pH 4,0 e, após este tempo de incubação, foram contados para determinação do número de conídios apresentando tubo germinativo em formação para cada condição.

3.11. Ensaio de viabilidade de macrófagos J774.16

Com o intuito de observar como a presença de conídios de *P. boydii* e leveduras de *H. capsulatum*, na presença ou ausência de anticorpos monoclonais anti-PRM e H1C, respectivamente, poderiam afetar a viabilidade de macrófagos no curso da infecção, 1X10⁵ macrófagos J774.16 foram plaqueados. Células fúngicas, opsonizadas ou não, foram postas para interação com estes macrófagos na proporção 5:1 (fungos:macrófago). Após 2 e 4 h, a viabilidade dos macrófagos foi medida através da

adição de 50 µL de MTT (solução de 5mg/mL) em cada poço e a placa foi então incubada por 2h à 37°C. Após esse tempo, foram adicionados 100 µL de DMF em cada poço para a solubilização do precipitado formado, por 2 h a 37°C, seguida pela leitura da placa em leitor de ELISA (570 nm). Foram realizados controles com IgG irrelevantes e de células fúngicas incubadas apenas com PBS, pH 7,2. Este mesmo ensaio foi realizado com as células J774.16 apenas na presença dos anticorpos monoclonais anti-PRM e H1C, sem a adição da célula fúngica, para a exclusão de qualquer possibilidade de um efeito causado nas células imunes que não oriundo da opsonização dos fungos com os anticorpos monoclonais.

3.12. Microscopia “Time-lapse”

5×10^4 macrófagos foram postos em uma placa contendo uma lamínula coberta com poli-lisina (MatTek plates) para adesão “overnight”. O meio DMEM foi removido após este período e substituído por meio DMEM fresco contendo os conídios de *P. boydii* (na relação 5:1 conídios:macrófago). Este mesmo ensaio foi realizado com conídios previamente opsonizados com os anticorpos monoclonais F10, C7 e C11, bem como com uma IgG irrelevante (100 µg/mL). Macrófagos e conídios foram incubados por 1 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 1 h de interação, a placa foi lavada para a remoção dos conídios extracelulares e adicionou-se meio DMEM fresco. As imagens foram feitas a cada 10 min da interação durante 18 h. As imagens foram obtidas em um aumento de 10X usando o microscópio invertido Axiovert 200 M e fotografadas com a câmera AxioCamMR controlada pelo software Axio Vision 4.4 (Carl Zeiss Micro Imaging, NY). Este microscópio apresenta um compartimento isolado onde se mantém a placa da interação em ambiente com temperatura de 37°C e umidade estabilizadas, bem como atmosfera de 5% de CO₂. As animações que compuseram o filme foram criadas usando o software ImageJ software (ALVAREZ & CASADEVALL, 2007).

3.13. Ensaio de germinação e viabilidade

Conídios de *P. boydii* (1×10^5 /mL) foram incubados em placas de 24 poços na presença de meio DMEM a 37°C com 100 µg/mL de cada um dos anticorpos monoclonais anti-PRM, uma IgG irrelevante ou PBS, como controles. Nos intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h os poços foram analisados e os conídios germinados foram contados sob microscópio invertido. Um mínimo de 100 conídios por campo foi contado, e a média dos valores de 3 diferentes experimentos foi calculada. O percentual de germinação foi expresso como o número de conídios germinados pelo número total de conídios X 100 (MANAVATHU, CUTRIGHT & CHANDRASEKAR, 1999).

Após esse tempo, foram adicionados 50 µL de MTT (solução de 5 mg/mL) em cada poço e a placa foi então incubada por 2 h a 37°C. Em seguida, foram adicionados 100 µL de N,N-dimetilformamida (DMF - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em cada poço para a solubilização do precipitado formado, por 2 h a 37°C, seguida pela leitura da placa em leitor de ELISA (570 nm).

Como resultado adicional para comprovação de efeitos de anticorpos anti-PRM no crescimento fúngico, a taxa de crescimento das leveduras de *C. albicans* foi analisada em YPD líquido, pH 6,5. As leveduras foram adicionadas na concentração de 5×10^6 células/poço em placas de 24 poços, na presença de 100 µg/mL de anticorpos anti-PRM de *P. boydii* e IgG irrelevante, bem como na ausência de qualquer anticorpo. A densidade celular (DO_{600}) foi lida em um leitor de ELISA (Labsystem Multiskan MS) nos tempos de 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 h. As taxas de crescimento nos diferentes tempos foi medida pela DO_{600} e expressa como percentual de crescimento. Os ensaios foram feitos em duplicata, três vezes.

3.14. Quantificação de óxido nítrico e superóxido liberados por macrófagos

Macrófagos J774.16 (1×10^5) foram plaqueados em meio sem a presença de vermelho de fenol (Meio DMEM/F12 non-phenol-red medium – Invitrogen, Carlsbad, CA). Os conídios de *P. boydii* foram previamente incubados com os anticorpos monoclonais anti-PRM (100 µg/mL), assim como leveduras de *H. capsulatum* foram previamente incubadas com diferentes concentrações de H1C, e como controles, incubação com IgG irrelevante ou PBS, por 1 h a 37°C. Após 2 h de interação com os

macrófagos, os sobrenadantes foram coletados. Os níveis de óxido nítrico foram medidos utilizando um kit Comercial (Griess reagent kit - Promega). A atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada pela redução do MTT a formazana, medida a 570 nm (MADESH & BALASUBRAMANIAN, 1998).

3.15. Modelos experimentais de pseudallescheriose e histoplasmose murinas

Para os estudos *in vivo* com *P. boydii*, grupos de seis camundongos Balb/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, oriundos do National Cancer Institute (NCI - Frederick, MD) foram injetados intraperitonealmente com 250 µg de cada um dos três anticorpos monoclonais contra PRM, IgG irrelevante ou PBS. O anticorpo monoclonal F10 também foi utilizado nas concentrações de 100 e 500 µg/por camundongo em alguns ensaios murinos. Após 2 h da injeção intraperitoneal, os camundongos foram desafiados com $2,5 \times 10^7$ conídios de *P. boydii*, por inoculação intratraqueal. Um modelo similar de infecção intravenosa foi desenvolvido, mas neste caso o inóculo fúngico utilizado foi de $1,25 \times 10^6$ conídios de *P. boydii*. Os camundongos foram acompanhados por um período de 60 dias e a sobrevivência nestes modelos de infecção experimental foi determinada.

Para uma melhor avaliação dos efeitos dos anticorpos monoclonais anti-PRM, estudos de infecção experimental usando outro modelo fúngico experimental, como leveduras de *C. albicans*, foram realizados utilizando grupos de 5 camundongos A/J fêmeas de 6 a 8 semanas de idade (NCI - Frederick, MD). Os camundongos foram inoculados intraperitonealmente com 250 µg do anticorpo monoclonal F10, uma IgG irrelevante ou PBS, 2 h antes da infecção intravenosa com 1×10^6 de leveduras de *C. albicans*. Os animais foram sacrificados no sétimo dia de infecção e os rins foram removidos, pesados, homogenizados e plaqueados em ágar YPD, e incubados a 30°C por 48 h para a contagem do número de UFC (GUIMARAES *et al.*, 2009). Para os ensaios de infecção animal com *H. capsulatum*, grupos de 10 camundongos C57BL/6 fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, oriundos do National Cancer Institute (NCI - Frederick, MD) foram injetados intraperitonealmente com 250 µg de H1C, IgG irrelevante ou PBS. Após 2 h, os camundongos foram infectados intranasalmente com

5×10^6 (dose subletal para os ensaios de UFC) ou $1,25 \times 10^7$ (dose letal para os estudos de sobrevivência) de leveduras de *H. capsulatum*. Também foram testadas as doses de 100 e 500 µg de H1C para a dose letal de *H. capsulatum* para estudo em modelo de sobrevivência dos camundongos infectados (GUIMARAES *et al.*, 2009). Para os ensaios de análise de UFC em tecidos infectados, grupos de 3 animais foram sacrificados no terceiro e no sétimo dias de infecção e os pulmões foram removidos, pesados, homogenizados e plaqueados em ágar BHI-sangue, e incubados por sete dias a 37°C para a contagem de UFC (GUIMARAES *et al.*, 2009).

3.16. Análises estatísticas.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego CA). A análise de variância one-way foi utilizada para comparar diferença entre grupos, e comparações individuais de grupos foram feitas utilizando o teste de Boferoni (Bonferoni posttest). O teste *t* de Student foi usado para comparar o número de UFC para diferentes grupos. Um intervalo de confiança > 95% foi determinado em todos os experimentos. Os resultados dos testes de sobrevivência *in vivo* foram analisados pelo teste de Kaplan-Meyer, para determinar possíveis diferenças significativas entre os grupos.

4. Resultados

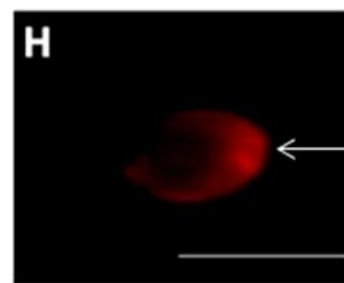
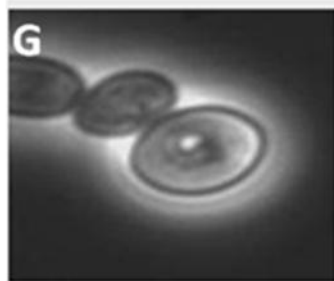
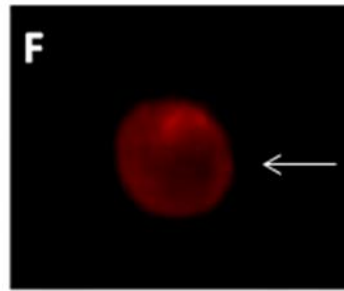
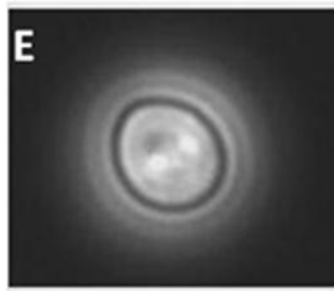
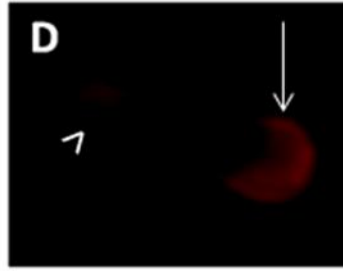
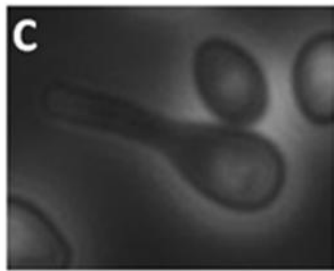
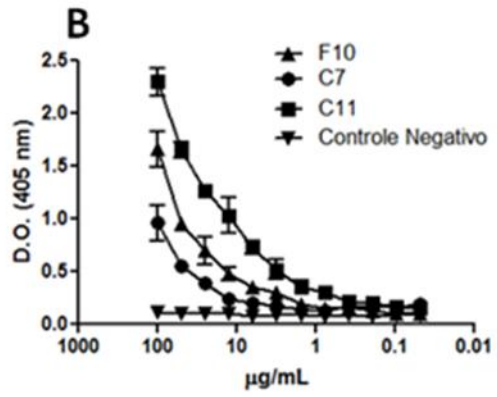
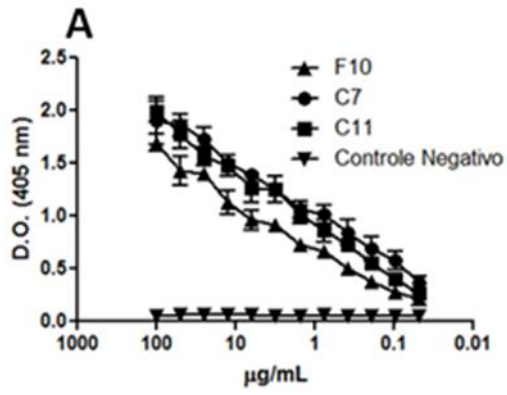
Parte I: *Pseudallescheria boydii*

4.1. Anticorpos anti-PRM se ligam a superfície celular de *P. boydii*

Através da técnica de ELISA indireto, foi possível evidenciar e quantificar a reatividade dos anticorpos monoclonais anti-PRM de *P. boydii* F10, C7 e C11 tanto com a molécula de PRM purificada, como com conídios de *P. boydii* (Figuras 12A e B). Observou-se variações no perfil de ligação dos diferentes anticorpos monoclonais anti-PRM (**Figura 9A**). Os anticorpos monoclonais reconheceram tanto a molécula nativa de PRM, bem como conídios de *P. boydii* fixados, o que demonstrou que estes anticorpos são capazes de reconhecer a estrutura de PRM na superfície de conídios de *P. boydii* (**Figuras 9A e B**).

A técnica de imunofluorescência permitiu localizar a molécula de PRM na superfície de conídios de *P. boydii* (**Figuras 9C-H**). A microscopia de fluorescência revelou diferentes perfis de marcação, de acordo com o anticorpo monoclonal anti-PRM utilizado. O anticorpo monoclonal F10 (**Figuras 9C e D**) marcou o corpo celular de conídios germinados (**seta na Figura 9D**) e a porção apical do tubo germinativo (**cabeça de seta na Figura 9D**), enquanto C7 (**Figuras 9E e F**) e C11 (**Figuras 9G e H**) marcaram o corpo celular de conídios não germinados (**setas nas Figuras 9C-H**).

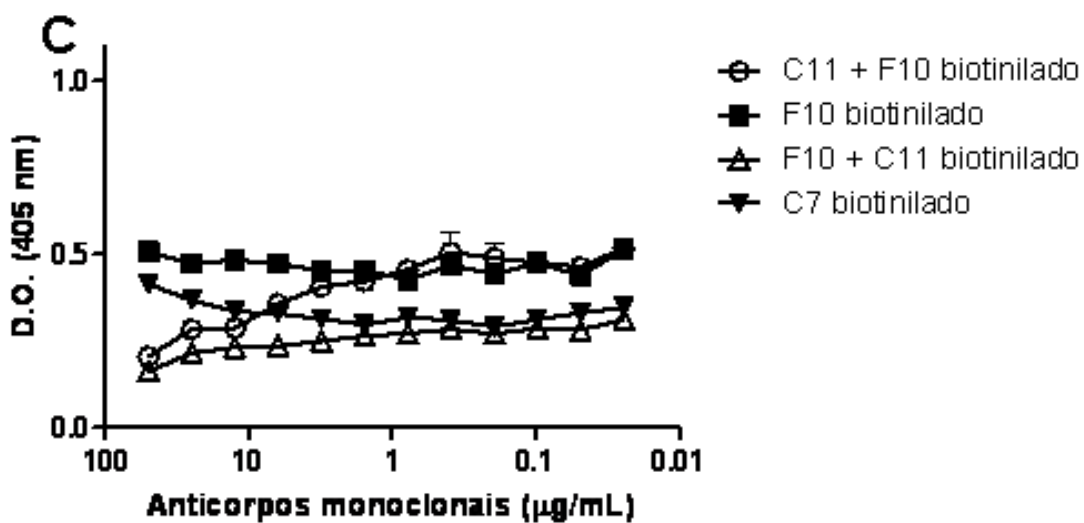
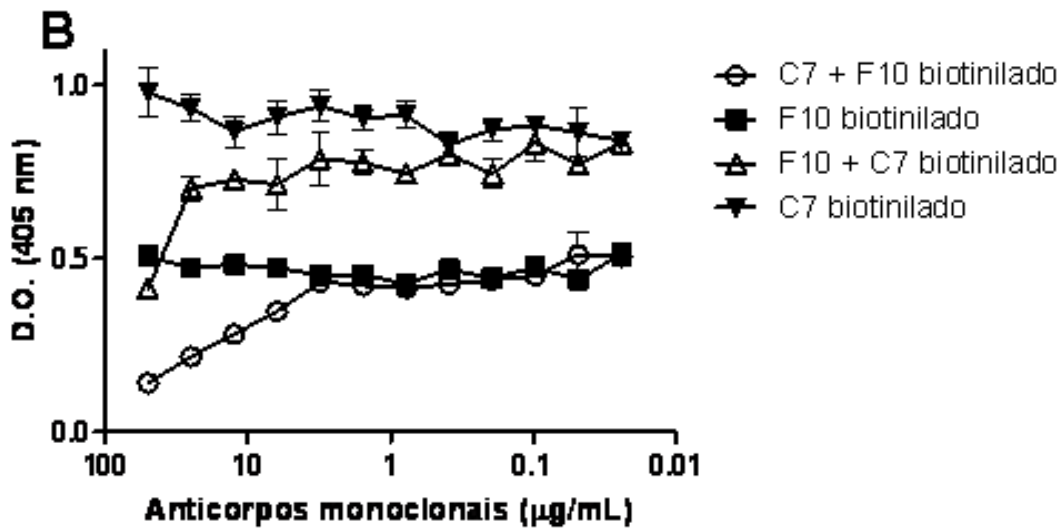
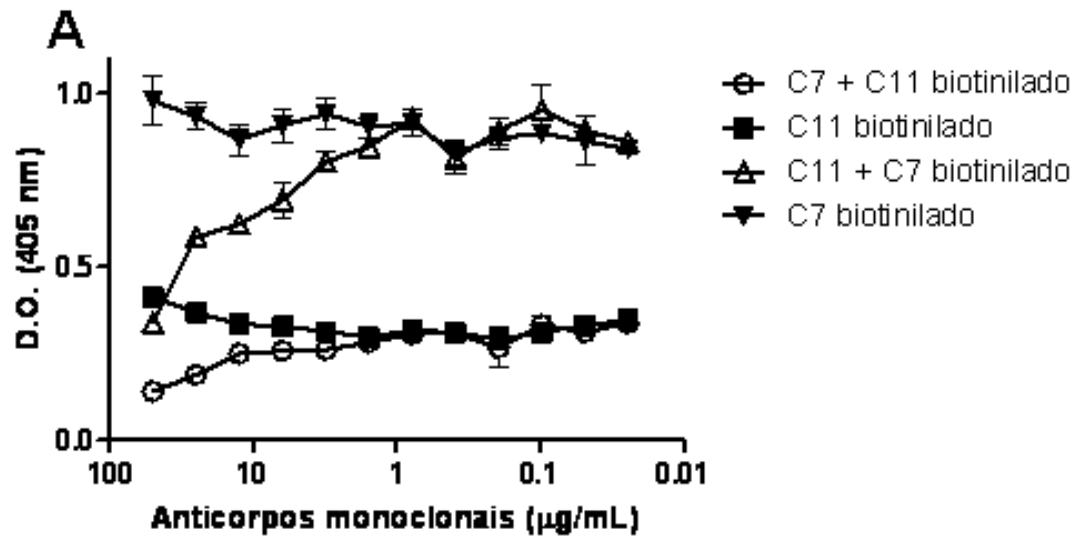
Figura 9: Anticorpos anti-PRM se ligam a superfície celular de *P. boydii*. Análises de ELISA indireto mostrando a ligação dos anticorpos monoclonais F10, C7 e C11 na molécula de PRM purificada (A) e em conídios de *P. boydii* (B). Os ensaios foram realizados em triplicada, três vezes cada. Imagens de microscopia de fluorescência e campo claro mostrando ligação dos anticorpos monoclonais F10 (C e D), C7 (E e F) e C11 (G e H) (100 µg/mL) nos conídios de *P. boydii*. Barra: 10 µm.



4.2. Anticorpos F10, C7 e C11 competem por epítomos similares

Para a determinação da ligação com a PRM de *P. boydii*, os anticorpos monoclonais anti-PRM F10, C7 e C11 foram biotinilados e os ensaios foram realizados na presença de um par de anticorpos monoclonais. Os ensaios de ELISA de competição revelaram que os três anticorpos monoclonais anti-PRM se ligaram em epítomos extremamente similares ou epítomos sobrepostos (**Figuras 10 A-C**), como demonstrado pela competição pelo antígeno, observada em todos os três pares de anticorpos usados nos diferentes experimentos (**Figuras 10 A-C**).

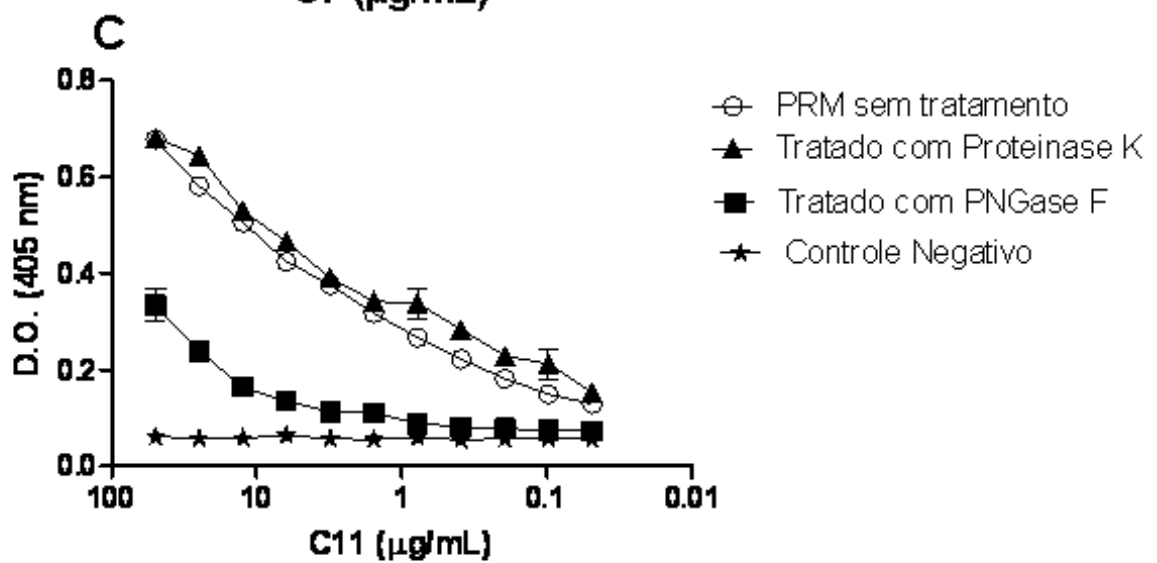
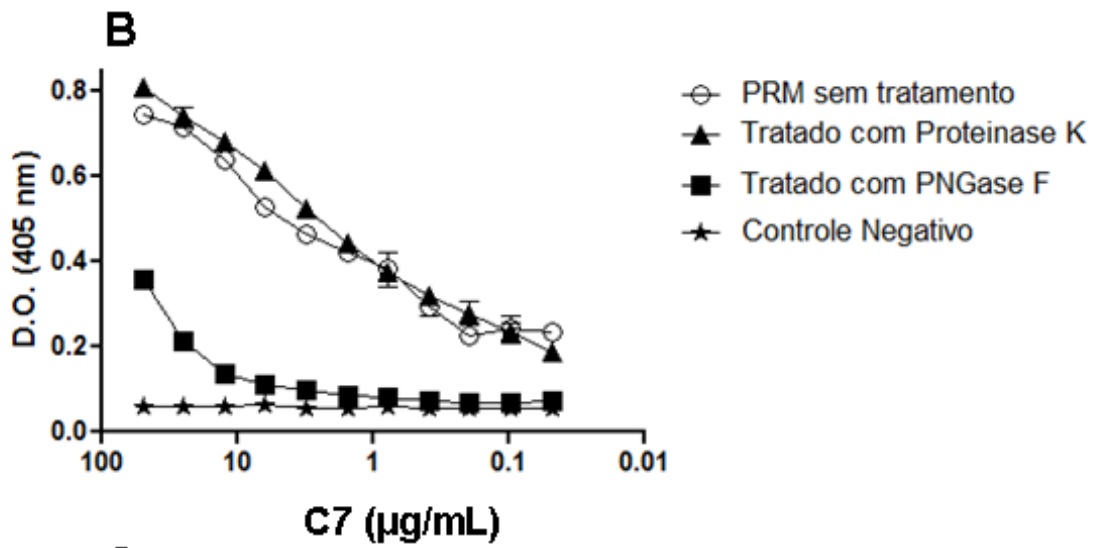
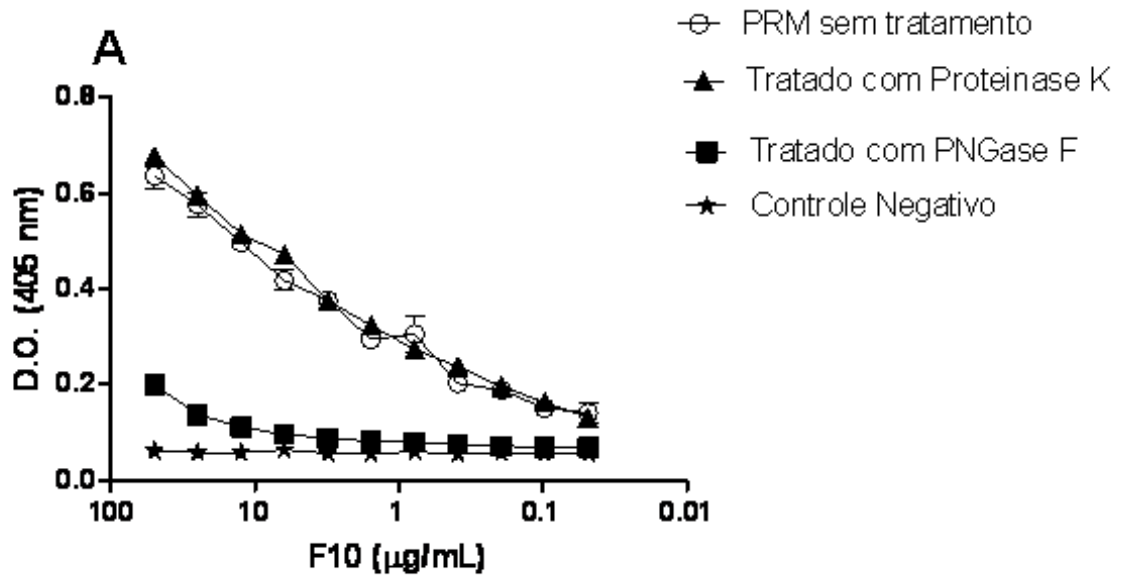
Figura 10: Anticorpos F10, C7 e C11 competem por epítomos similares ou extremamente próximos. Anticorpos monoclonais anti-PRM foram biotinizados e ensaios de ELISA de competição foram realizados. Os resultados mostraram a competição dos anticorpos monoclonais anti-PRM na molécula desta glicoproteína. Curvas representando a competição pela ligação entre os anticorpos C7 e F10 (A), C7 e C11 (B) e C11 e F10 (C).



4.3. Anticorpos monoclonais se ligam na porção carboidrato da molécula de PRM

Um ensaio de ELISA indireto foi usado para analisar qual porção da PRM era reconhecida pelos três anticorpos monoclonais anti-PRM. Para isto, a molécula purificada de PRM passou por tratamentos específicos para a remoção das porções carboidrato e proteína, respectivamente. Os valores de absorvância mostraram que, após a remoção da porção carboidrato da molécula através do tratamento com PNGase, a ligação com os anticorpos monoclonais anti-PRM diminuiu significativamente, como observado para F10 (**Figura 11A**), C7 (**Figura 11B**) e C11 (**Figura 11C**) ($P < 0,05$), indicando a importância da porção carboidrato no reconhecimento pelos anticorpos. Em contraste, não foi observada uma diferença significativa quando a porção proteica da molécula foi removida pelo tratamento com proteinase K, mostrando que os epítomos reconhecidos pelos anticorpos não eram de natureza proteica (**Figura 11A**), C7 (**Figura 11B**) e C11 (**Figura 11C**) ($P > 0,05$).

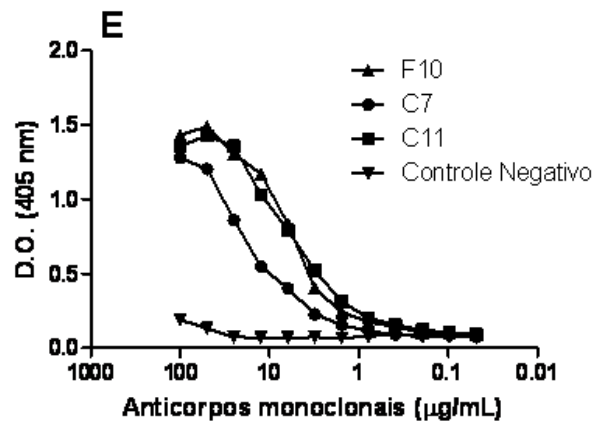
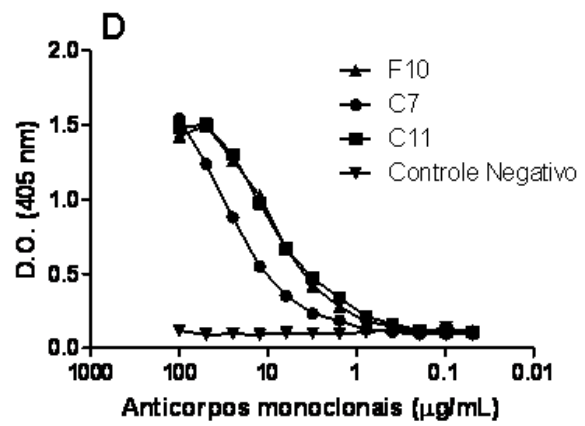
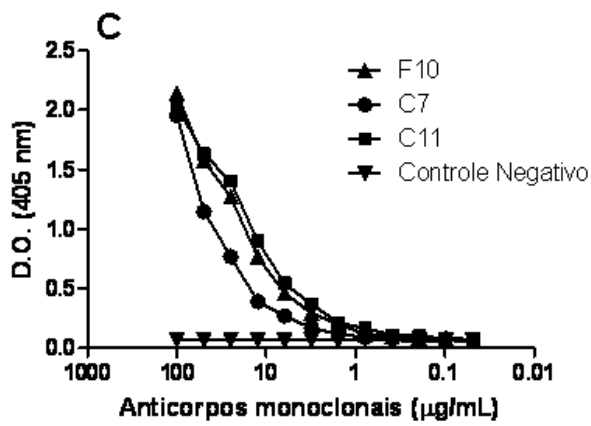
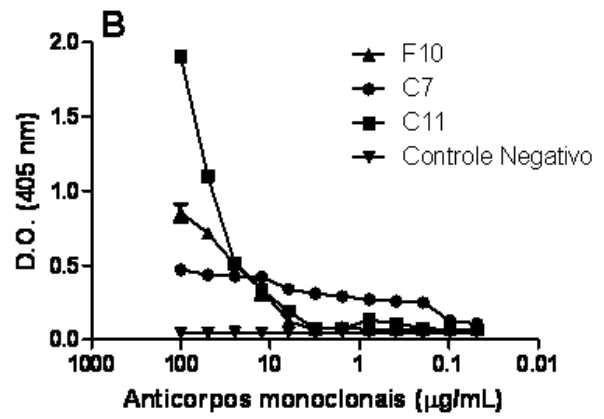
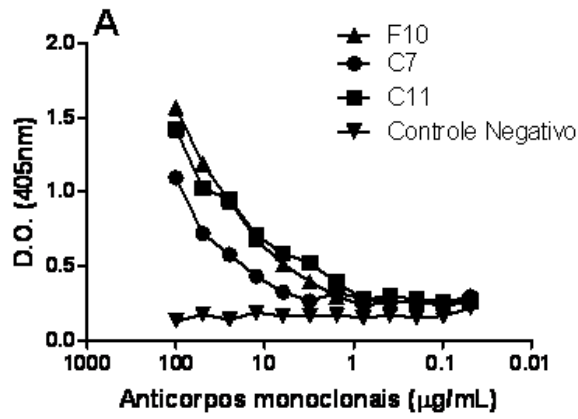
Figura 11: Anticorpos monoclonais se ligam na porção carboidrato na molécula de PRM. Os gráficos de ELISA mostram os valores de absorbância quando a molécula de PRM sofreu tratamento com uma endoglicosidase e tratamento com protease, seguidos de incubação com os monoclonais F10 (A), C7 (B) e C11 (C). Estes resultados indicaram que os anticorpos monoclonais se ligaram a porção carboidrato da molécula. Os ensaios de ELISA foram realizados em triplicata, três vezes cada.



4.4. Anticorpos monoclonais anti-PRM se ligam em diferentes espécies fúngicas

Os ensaios de ELISA indireto foram realizados usando diferentes espécies fúngicas com a finalidade de observar a possibilidade de ligação dos anticorpos monoclonais anti-PRM em fungos relacionados ou não com *P. boydii*. Foi possível observar que os três anticorpos monoclonais foram capazes de se ligar aos conídios de *S. apiospermum* (**Figura 12A**) e *S. prolificans* (**Figura 12B**), bem como em leveduras de *H. capsulatum* (**Figura 12C**), *C. albicans* (**Figura 12D**) e *C. parapsilosis* (**Figura 12E**). Com este resultado, parece haver então estruturas contendo manose na superfície celular de diferentes fungos que se mostram conservadas ao longo da evolução.

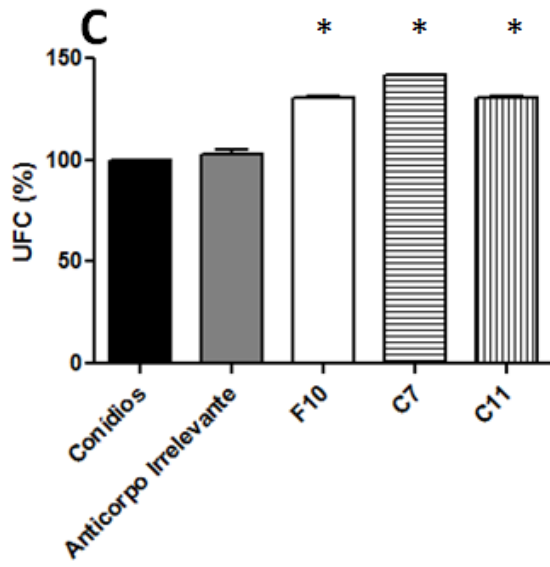
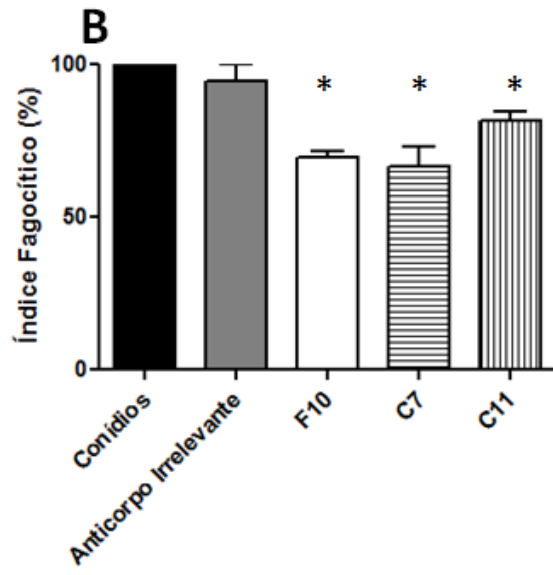
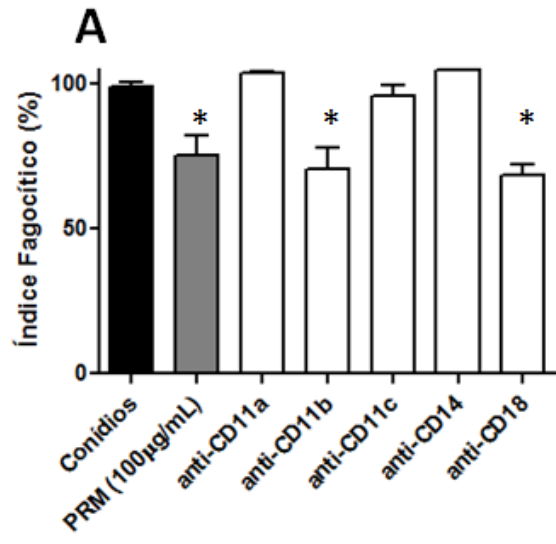
Figura 12. Anticorpos monoclonais anti-PRM se ligam em diferentes espécies fúngicas. Ensaios de ELISA mostrando a ligação e reconhecimento dos monoclonais F10, C7 e C11 em conídios de *S. apiospermum* (A) e *S. prolificans* (B), e leveduras de *H. capsulatum* (C), *C. albicans* (D) e *C. parapsilosis* (E). Estes dados demonstraram a possibilidade de estruturas conservadas entre as diferentes espécies fúngicas ao longo da evolução. Os ensaios foram realizados em triplicata, três vezes cada.



4.5. Anticorpos monoclonais podem afetar o destino intracelular de *P. boydii*

Conídios de *P. boydii* foram efetivamente fagocitados por macrófagos J774.16. A adição de PRM solúvel reduziu significativamente a fagocitose em 25% (**Figura 13A**). Para investigar o envolvimento dos receptores celulares de macrófagos na internalização de conídios, bloqueadores específicos para receptores nos macrófagos foram usados. Uma redução significativa foi observada usando os anticorpos anti-CD11b e CD18, indicando um requerimento do receptor CR3 na interação entre conídios e macrófagos (**Figura 13A**) ($P < 0,05$). A ausência de redução da fagocitose frente ao bloqueio dos demais receptores de macrófagos mostrou que o conídio de *P. boydii* não requer os receptores CR4 (CD11c/CD18), LFA-1 (CD11a/CD18) e C14 para a sua internalização em células J774.16 (**Figura 13A**). Ensaio adicional de fagocitose foram realizados opsonizando conídios com os anticorpos monoclonais anti-PRM. Os resultados mostraram que, na presença dos três anticorpos monoclonais, foi observado um importante decréscimo na fagocitose dos conídios, comparada às fagocitoses nas situações-controle (**Figura 13B**) ($P < 0,05$), o que sugere um bloqueio da fagocitose por estes anticorpos. Somado ao fato da redução da fagocitose na presença dos anticorpos monoclonais, a adição de conídios opsonizados com F10, C7 e C11 mostrou um aumento de 30 a 40% na sobrevivência no interior dos macrófagos (**Figura 13C**) ($P < 0,05$), sugerindo que, na presença dos anticorpos monoclonais anti-PRM, conídios de *P. boydii* podem resistir mais no interior da célula fagocítica, uma vez que observamos menor internalização nos macrófagos do aquela observada nas amostras-controle.

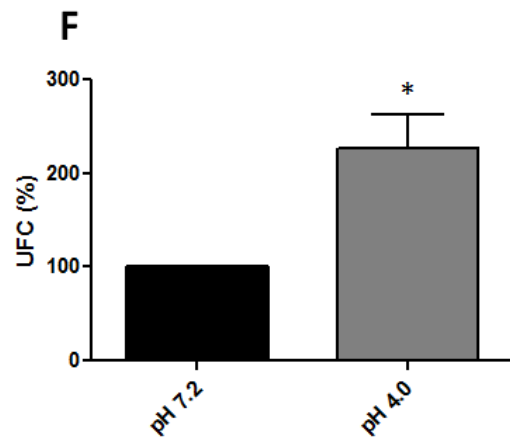
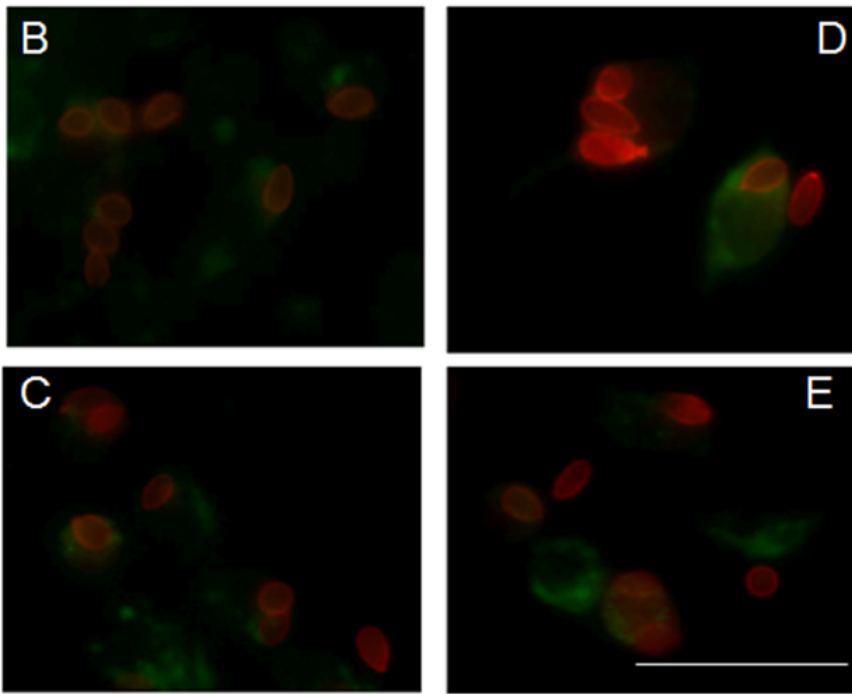
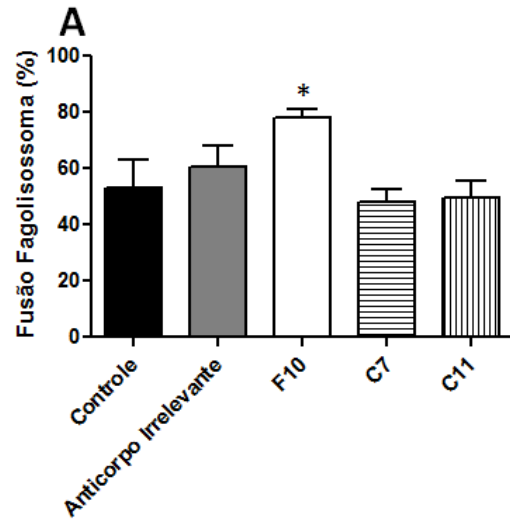
Figura 13: Anticorpos monoclonais podem afetar o destino intracelular de *P. boydii*. Efeito da PRM purificada e bloqueio dos receptores CD11 e CD18 diminuíram a fagocitose de conídios de *P. boydii*, indicando a participação da molécula de PRM na internalização pelos macrófagos, e o requerimento do receptor CR3 na interação entre conídios de *P. boydii* e macrófagos. A ausência de redução da fagocitose frente ao bloqueio dos demais receptores mostrou que o conídio de *P. boydii* não requer os receptores CR4, LFA-1 e C14 para a sua internalização em células J774.16 (A). A incubação prévia de conídios de *P. boydii* com os monoclonais F10, C7 e C11 (100 µg/mL) também culminaram na diminuição significativa da fagocitose por macrófagos J774.16 (B). Efeito dos anticorpos monoclonais anti-PRM (100 µg/mL) na sobrevivência no interior de macrófagos J774.16 (C). Em todos os gráficos, os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Cada experimento foi feito em triplicata. * $P < 0,05$ para comparação entre as amostras e os controles.



4.6. Co-localização de conídios de *P. boydii* com fagolisossomos

A fusão dos lisossomas com fagossomas foi observada pela detecção do FITC-dextrana com conídios de *P. boydii* dentro dos macrófagos, revelada pela coloração laranja, devido à sobreposição do verde oriundo da FITC-dextrana e do vermelho oriundo da marcação dos conídios de *P. boydii* com rodamina. A maior parte dos fagolisossomas contendo *P. boydii* continha conídios previamente opsonizados com o anticorpo monoclonal F10, o que demonstra que a presença do anticorpo monoclonal F10 gerou uma maior fusão entre fagossomos e lisossomos (**Figuras 14A e B**). As imagens de imunofluorescência mostram a fusão dos fagolisossomas em macrófagos pela co-localização da FITC-dextrana com a rodamina que marca a superfície celular dos conídios, previamente opsonizados ou não com os anticorpos monoclonais F10 (**Figura 14B**), C7 (**Figura 14C**) e C11 (**Figura 14D**), e com uma IgG irrelevante (**Figura 14E**). Com o objetivo de avaliar a capacidade de germinação de conídios de *P. boydii* em meio ácido, estas células foram incubadas em meio DMEM com pH 7,2 e pH 4,0 e plaqueadas em meio ágar batata dextrose após um período determinado. Em pH 4,0 foi visto um significativo aumento no número de UFC em comparação com o número obtido após 4 h de incubação em DMEM pH 7,2 (**Figura 14F**) ($P < 0,05$).

Figura 14. Co-localização de conídios de *P. boydii* com fagolisossomos. Anticorpos monoclonais foram avaliados quanto ao efeito sobre a fusão fagolisossomal com conídios de *P. boydii*. O anticorpo monoclonal F10 (100 µg/mL) aumentou a fusão destes conídios com fagolisossomas de células J774.16. Não foi observado o mesmo efeito para os anticorpos monoclonais C7 e C11 (A). As análises de imunofluorescência mostram a fusão dos fagolisossomas em macrófagos pela co-localização da FITC-dextrana com a rodamina que marca a superfície celular dos conídios, resultado em uma coloração alaranjada, resultado da sobreposição do FITC com a rodamina. Conídios de *P. boydii* (em vermelho) foram previamente opsonizados com os anticorpos monoclonais F10 (B), C7 (C) e C11 (D), e com uma IgG irrelevante (E). Germinação de conídios de *P. boydii* em meios DMEM com pH neutro e com pH ácido após 4 h (F) ($P < 0,05$). Ambos os experimentos foram realizados três vezes. Barra: 50 µm.

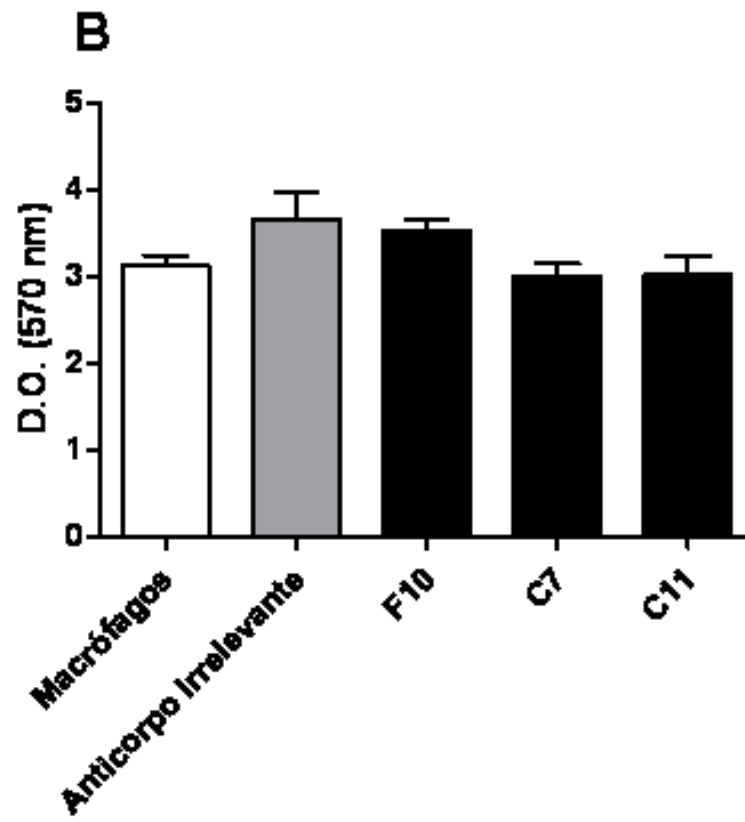
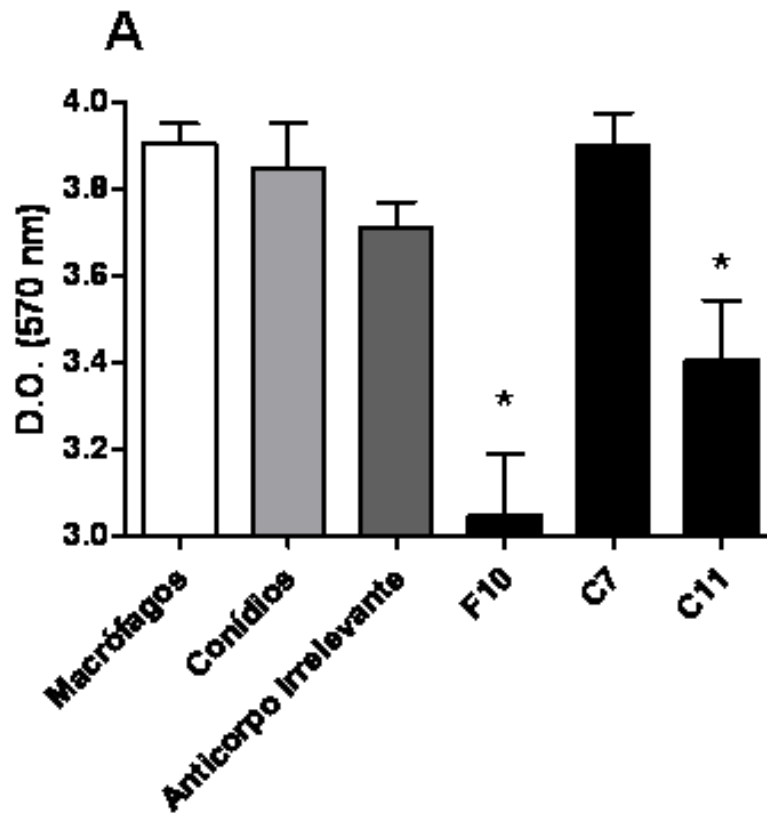


4.7. Conídios de *P. boydii* são capazes de destruir os macrófagos durante a interação com estas células, e a opsonização destes conídios afeta a viabilidade de células J774.16

Objetivando-se analisar a viabilidade de macrófagos durante a interação de conídios de *P. boydii* opsonizados com anticorpos anti-PRM, ensaios de MTT foram realizados. Foi observado que ocorre um dano significativo as células fagocíticas na presença de conídios previamente opsonizados com os anticorpos monoclonais F10 e C11, não sendo observado o mesmo efeito frente a opsonização das células fúngicas com o anticorpo monoclonal C7 (**Figura 15A**) ($P < 0,05$). Com o intuito de averiguar que este efeito era causado pela opsonização dos conídios com os anticorpos monoclonais e não apenas pela presença destes anticorpos, ensaios similares foram realizados com macrófagos J774.16 e os três anticorpos monoclonais, na ausência da célula fúngica. Nenhum efeito significativo foi observado nestes macrófagos na presença dos anticorpos monoclonais anti-PRM (**Figura 15B**) ($P > 0,05$). Estes resultados foram obtidos após 4 h de interação.

Com o objetivo de avaliar se macrófagos seriam capazes de eliminar a infecção por *P. boydii*, os conídios foram postos para a interação com as células J774.16, e esta interação foi avaliada a cada 10 min, por 18 h. Os resultados mostraram que a célula hospedeira não foi capaz de eliminar a infecção por *P. boydii*. Os conídios germinaram no interior dos macrófagos, com consequente formação das hifas, o que culminou com a destruição da célula hospedeira. (**Figura 15C – ver material suplementar contido em CD**).

Figura 15. Conídios de *P. boydii* são capazes de destruir os macrófagos durante a interação com estas células, e a opsonização destes conídios afeta a viabilidade de células J774.16. Viabilidade de macrófagos durante a interação, por 4 h, de conídios de *P. boydii* opsonizados com anticorpos anti-PRM através de ensaios de redução de MTT. Observação de um dano significativo nas células fagocíticas na presença de conídios previamente opsonizados com os anticorpos monoclonais F10 e C11, não sendo observado o mesmo efeito frente a opsonização das células fúngicas com o anticorpo monoclonal C7 (**Figura 15A**) ($P < 0,05$). Ensaios similares foram realizados com macrófagos J774.16 e os três anticorpos monoclonais, na ausência da célula fúngica. Nenhum efeito significativo foi observado nestes macrófagos na presença dos anticorpos monoclonais anti-PRM (**Figura 15B**) ($P > 0,05$). No filme realizado durante a interação de conídios de *P. boydii* com macrófagos J774.16 é possível observar que estes conídios puderam destruir os macrófagos durante o curso da infecção. As imagens foram coletadas sob a lente objetiva de 10X, a cada 10 min, durante 18 h (**Figura 15C – ver material suplementar contido em CD**).

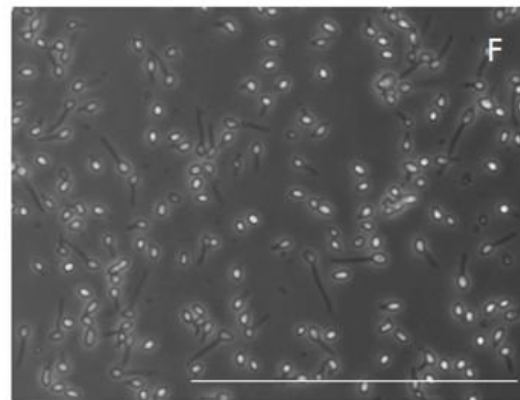
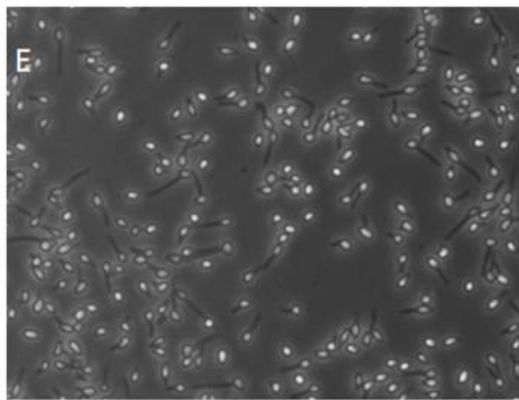
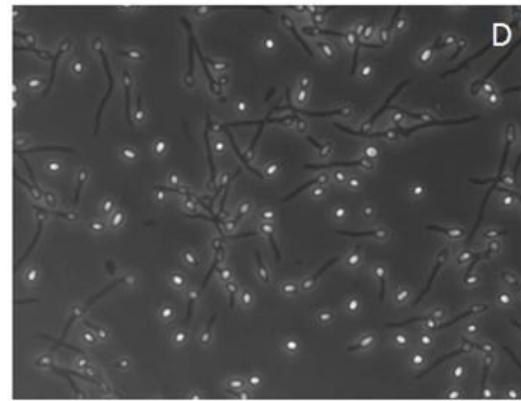
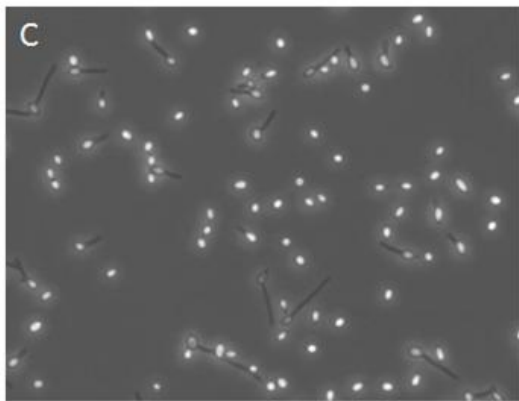
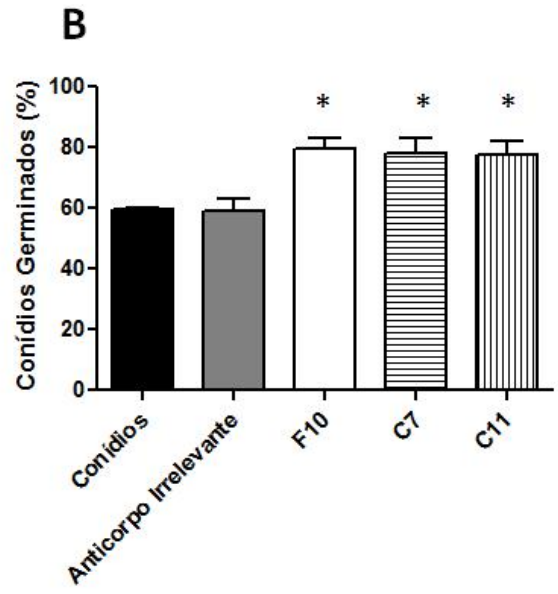
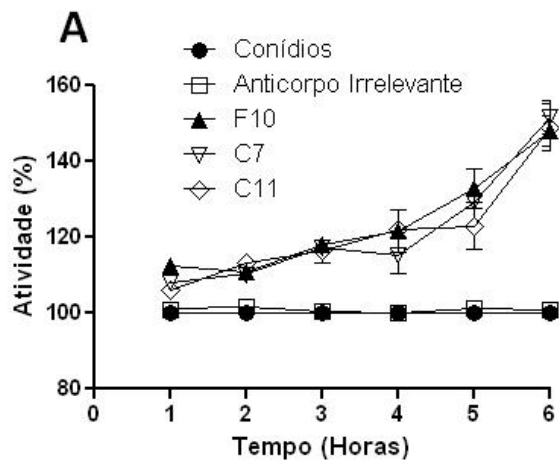


4.8. Efeitos dos anticorpos monoclonais anti-PRM no crescimento e na viabilidade de conídios de *P. boydii*

A atividade metabólica dos conídios de *P. boydii*, na presença dos três anticorpos monoclonais, foi examinada por ensaios de redução de MTT em diferentes tempos. O maior aumento na atividade foi observado com 6 h, onde este aumento foi de 48%, 49% e 51% para os anticorpos monoclonais F10, C7 e C11, respectivamente, em comparação com os controles (**Figura 16A**).

A influência dos anticorpos monoclonais F10, C7 e C11 foi analisada na germinação de conídios *in vitro*. Esta avaliação foi feita baseada na observação da formação do tubo germinativo. Após 4 h de incubação, aproximadamente de 77-80% dos conídios germinaram na presença dos três anticorpos monoclonais, comparada com uma germinação de 59% nos controles (**Figura 16B**). As imagens de microscopia em campo claro mostram a diferença de germinação de conídios de *P. boydii* na presença de um anticorpo irrelevante (**Figura 16C**), bem como na presença dos anticorpos monoclonais F10 (**Figura 16D**), C7 (**Figura 16E**) e C11 (**Figura 16F**).

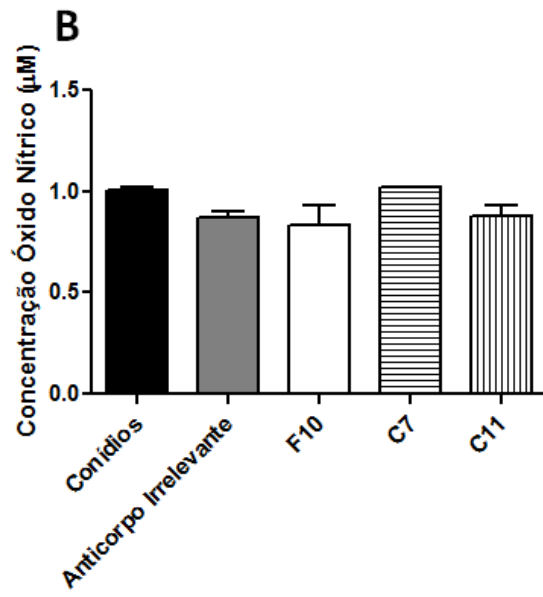
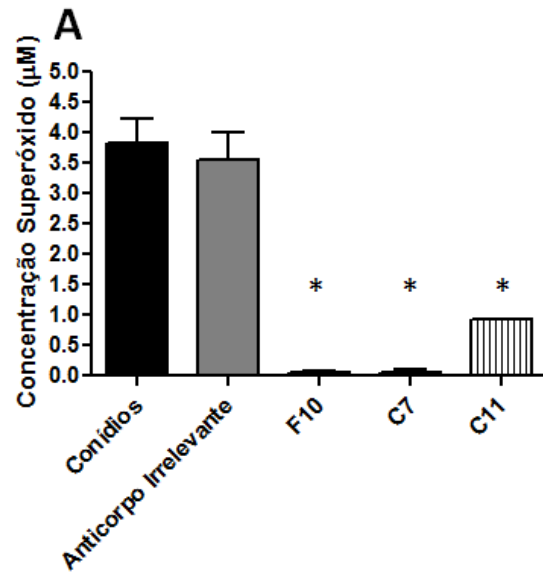
Figura 16. Efeitos dos anticorpos monoclonais anti-PRM no crescimento e na viabilidade de conídios de *P. boydii*. Viabilidade de *P. boydii* na presença de F10, C7 e C11 (100 µg/mL) foi demonstrada por ensaios de MTT após 6 h de incubação (A). Efeito dos anticorpos monoclonais F10, C7 e C11 (100 µg/mL) na morfogênese de *P. boydii* (B-F). Percentual de células com a presença de tubo germinativo após 4 horas de incubação com os anticorpos monoclonais e uma IgG irrelevante (B). A morfologia de conídios de *P. boydii* foi observada por microscopia óptica após incubação com um anticorpo irrelevante (C) e com os monoclonais F10 (D), C7 (E) e C11 (F). É possível observar um estímulo na germinação, quando na presença dos anticorpos monoclonais anti-PRM. * $P < 0,05$. Barra: 100 µm. Os experimentos foram realizados três vezes.



4.9. Impacto dos anticorpos monoclonais anti-PRM na liberação de espécies reativas de oxigênio por macrófagos J774.16

A adição de conídios de *P. boydii*, previamente opsonizados com os anticorpos monoclonais anti-PRM, ao meio de interação com os macrófagos, alterou a produção de superóxido por estas células fagocíticas. Uma diminuição significativa ocorreu na presença dos anticorpos F10, C7 e C11 em comparação com os controles ($P < 0,05$) (**Figura 17A**). Já a produção de óxido nítrico pelas células J774.16 não foi afetada pela presença ou ausência dos anticorpos monoclonais anti-PRM opsonizantes (**Figura 17B**).

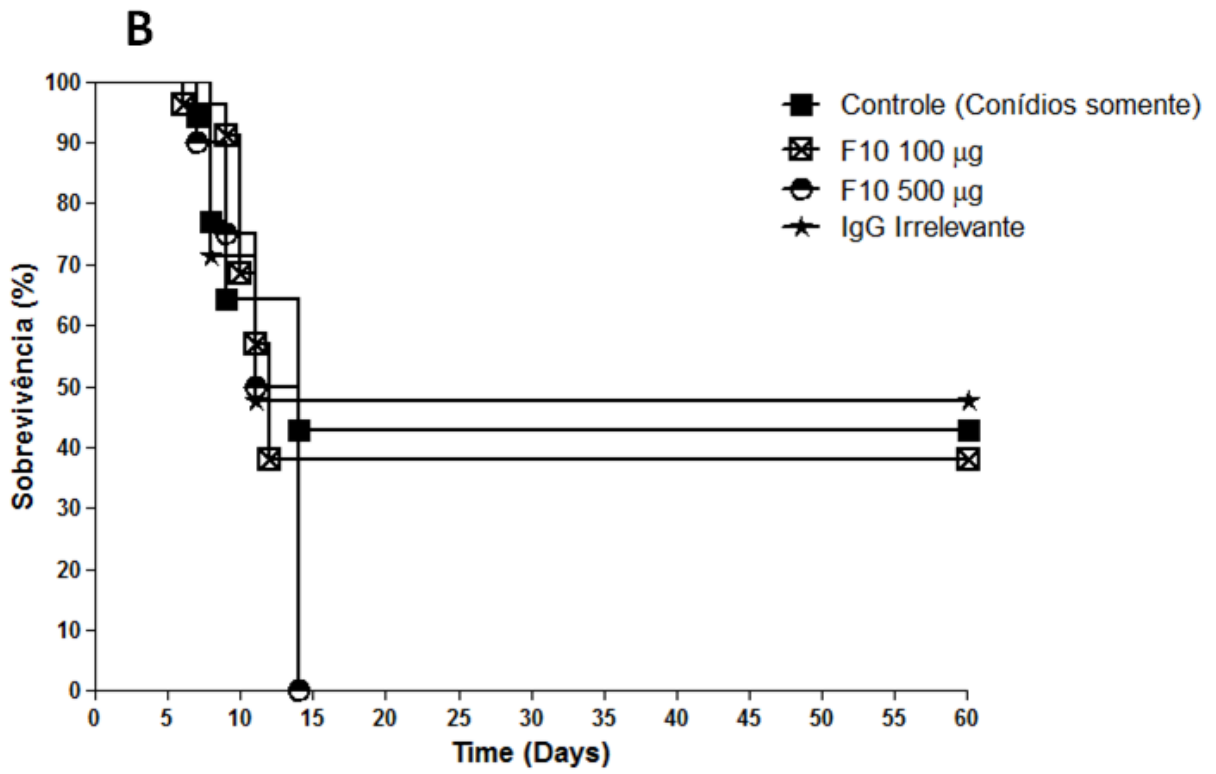
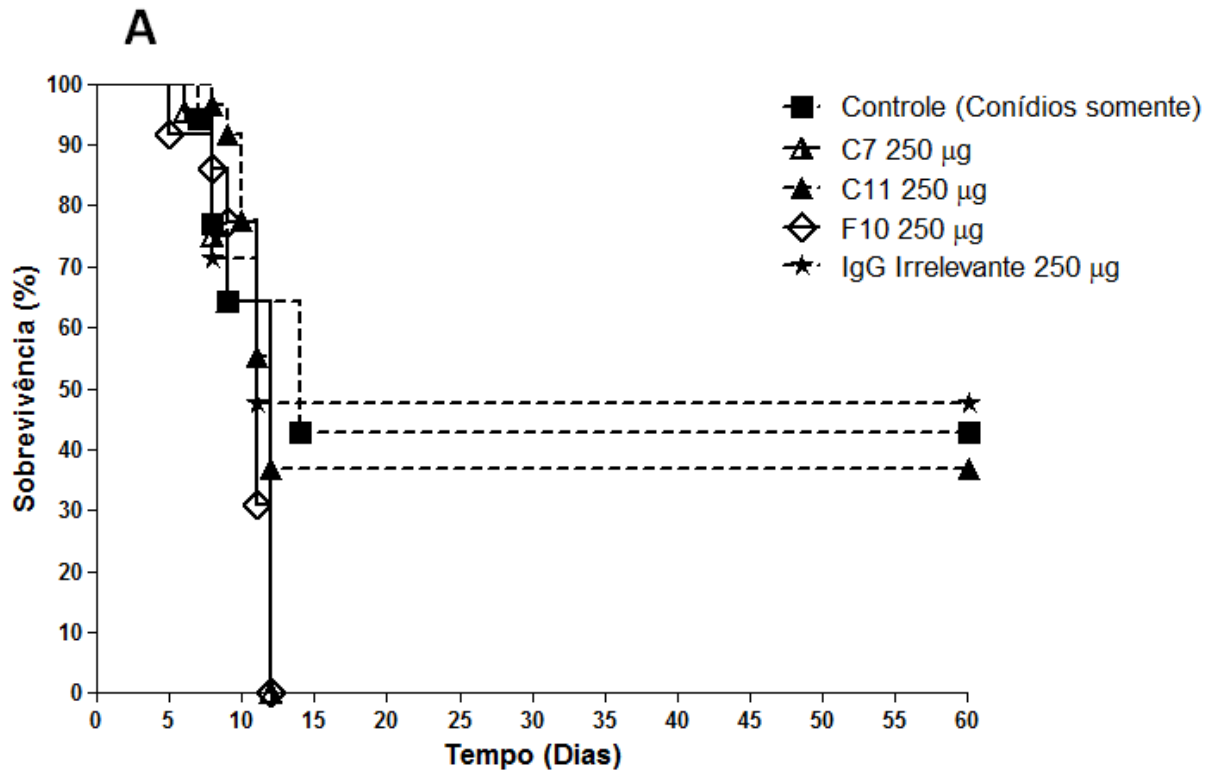
Figura 17. Impacto dos anticorpos monoclonais anti-PRM na liberação de espécies reativas de oxigênio. Opsonização de conídios de *P. boydii* com os monoclonais F10, C7 e C11 (100 µg/mL) suprimiu a liberação de superóxido por células J774.16 (* $P < 0,05$) (A). A produção de óxido nítrico por macrófagos não foi afetada pela presença ou ausência dos anticorpos monoclonais anti-PRM (B). Os experimentos foram realizados três vezes.

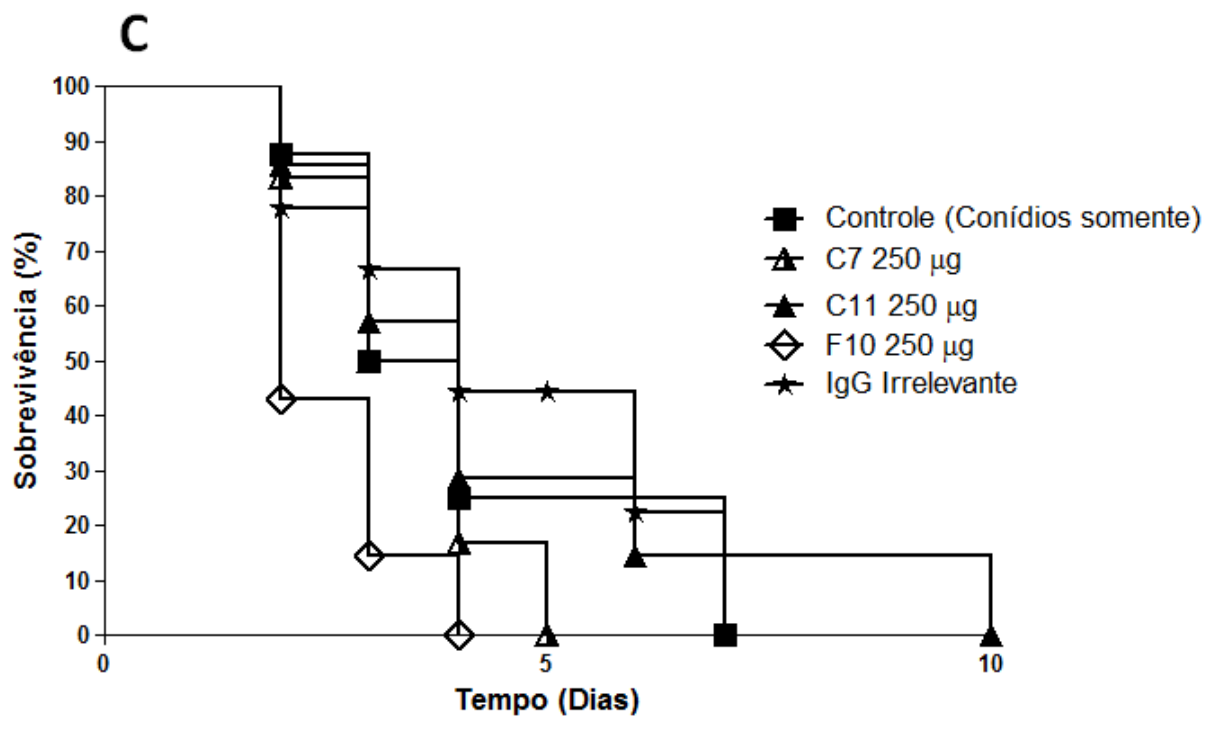


4.10. Anticorpos monoclonais anti-PRM afetam a pseudallescheriose experimental murina

Com o intuito de determinar o efeito dos anticorpos monoclonais anti-PRM na pseudallescheriose, diferentes grupos de camundongos foram tratados inicialmente com os anticorpos F10, C7 e C11, e uma IgG irrelevante, ou PBS, e em seguida desafiados com conídios de *P. boydii* administrados intravenosa ou intratraquealmente. No modelo intravenoso, a administração de 250 µg dos monoclonais F10, C7 e C11, 2 h antes da infecção, diminuiu significativamente a sobrevivência de camundongos infectados com conídios de *P. boydii*, culminando com a morte de todos os animais em torno do dia 12, para os anticorpos F10 e C7 (**Figura 18A**) ($P < 0,05$). Com o objetivo de avaliar a possibilidade de um efeito prozona, o anticorpo monoclonal F10 foi administrado aos camundongos em doses de 100 e 500 µg. Resultados similares, no que concerne à ausência de proteção, foram observados com a dose 500 µg do anticorpo monoclonal F10. A dose de 100 µg mostrou tendência a uma maior proteção, quando comparada às doses de 250 e 500 µg, porém este resultado não foi considerado estatisticamente significativo (**Figura 18B**) ($P > 0,05$). A infecção intratraqueal com conídios de *P. boydii* causou 100% de mortalidade em todas as condições testadas, mas na presença do anticorpo monoclonal F10, na concentração de 250 µg, os camundongos morreram mais rápido, quando comparado aos grupos-controle (**Figura 18C**) ($P < 0,05$). O anticorpo monoclonal C7 também mostrou uma aceleração na morte dos camundongos, bem como o anticorpo C11 mostrou tendência à proteção, mas os resultados não foram considerados estatisticamente diferentes dos encontrados nos grupos-controle (**Figura 18C**) ($P > 0,05$).

Figura 18. Anticorpos monoclonais anti-PRM afetam a pseudallescheriose. A injeção intraperitoneal com 250 µg dos monoclonais F10, C7 e C11 2 horas antes da infecção diminuiu significativamente a sobrevivência de camundongos infectados com conídios de *P. boydii* no modelo intravenoso (A) (* $P < 0,05$). Resultados similares foram obtidos com 500 µg do monoclonal F10. A dose de 100 µg mostrou tendência a uma maior proteção, quando comparada às doses de 250 e 500 µg, porém este resultado não foi considerado estatisticamente significativo (B). Infecção intratraqueal com conídios de *P. boydii* mostrou 100% de mortalidade em todas as condições testadas, mas na presença do anticorpo monoclonal F10 na concentração de 250 µg os camundongos morreram mais rápido, quando comparado aos grupos-controle. O anticorpo monoclonal C7 também mostrou uma aceleração na morte dos camundongos, bem como o anticorpo C11 mostrou tendência à proteção, mas os resultados não foram considerados estatisticamente significativos quando comparados aos grupos-controle (C) (* $P < 0,05$). Os experimentos com animais foram realizados duas vezes.

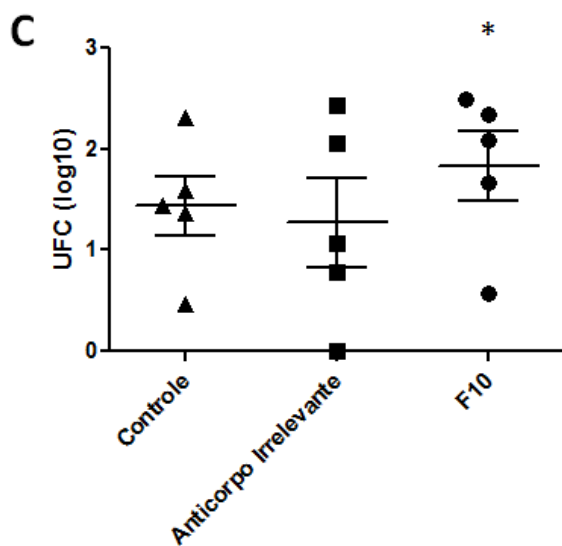
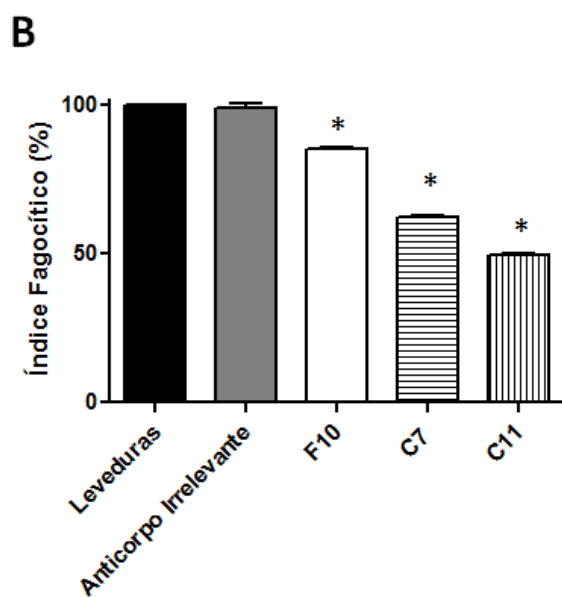
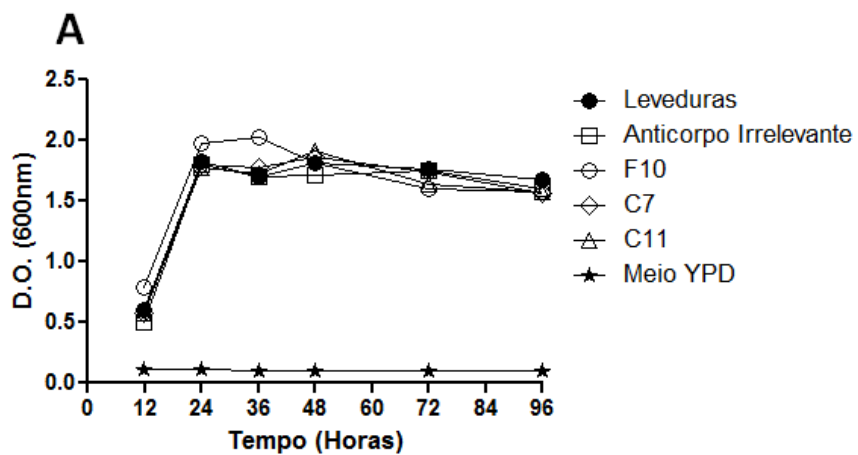




4.11. Anticorpos monoclonais anti-PRM de *P. boydii* podem afetar o crescimento, a fagocitose e a infecção experimental de *C. albicans*

O crescimento de *C. albicans* aumentou 31%, 10% e 18% nos tempos de 12, 24 e 36 h, respectivamente, na presença do anticorpo monoclonal F10, quando comparado ao crescimento obtido nos controles (**Figura 19A**) ($P < 0,05$). Os anticorpos monoclonais C7 e C11 não apresentaram efeito no crescimento de *C. albicans* (**Figura 19A**) ($P > 0,05$). Em ensaios de fagocitose, a opsonização com os anticorpos monoclonais anti-PRM de *P. boydii* diminuiu o índice fagocítico em 15%, 40% e 50% para F10, C7 e C11, respectivamente, em comparação com os controles (**Figura 19B**). Em modelo de candidíase experimental, os rins de camundongos infectados foram removidos, e o número de UFC foi determinado. Em camundongos que receberam tratamento prévio com o anticorpo monoclonal F10, o número de colônias de *C. albicans* foi significativamente maior ao daqueles que receberam apenas PBS ou IgG irrelevante (**Figura 19C**) ($P < 0,05$).

Figura 19. Anticorpos monoclonais anti-PRM de *P. boydii* podem afetar o crescimento, a fagocitose e a infecção experimental de leveduras de *C. albicans*. O crescimento de *C. albicans* aumentou significativamente na presença do monoclonal F10, quando comparado aos controles, nos tempos de 12, 24 e 36 h. Os anticorpos monoclonais C7 e C11 não apresentaram efeito significativo no crescimento de *C. albicans* (A). A fagocitose de *C. albicans* foi reduzida na presença de leveduras previamente opsonizadas com os 3 anticorpos monoclonais anti-PRM, F10, C7 e C11 (100 µg/mL) (B). Os experimentos foram realizados três vezes. (* $P < 0,05$). Número de

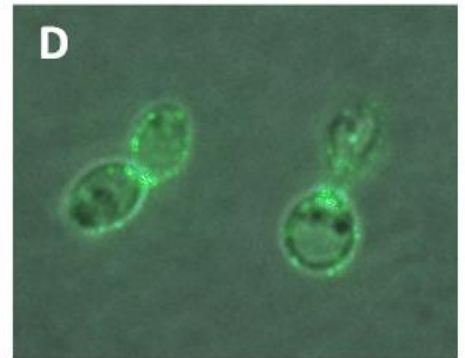
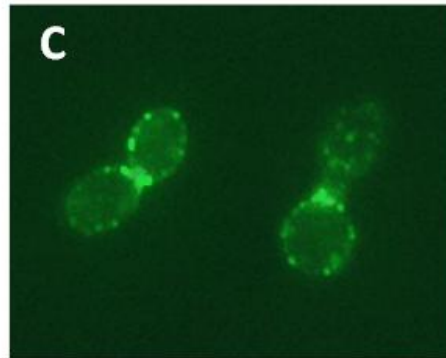
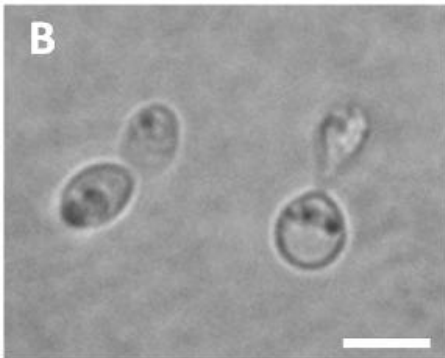
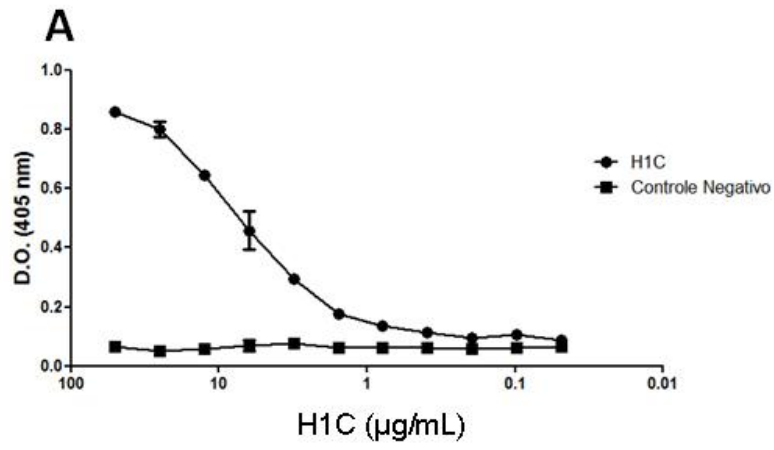


Parte II: *Histoplasma capsulatum*

4.12. Ligação do anticorpo monoclonal H1C na superfície celular de *H. capsulatum*

Ensaio de ELISA, usando como antígeno as leveduras de *H. capsulatum*, foram realizados com o intuito de observar a ligação do anticorpo monoclonal H1C em células fúngicas intactas. Foi possível observar um perfil significativo de ligação do anticorpo com as leveduras, o que ocorreu em concentrações de H1C > 1 µg/mL (**Figura 20A**). As análises de imunofluorescência (**Figura 20C**) e microscopia de campo claro (**Figura 20D**) demonstraram que H1C reagiu difusamente sobre a superfície celular fúngica, apresentando regiões da superfície celular fúngica onde o anticorpo H1C apresentou uma marcação mais pontual (**Figura 20C e D**).

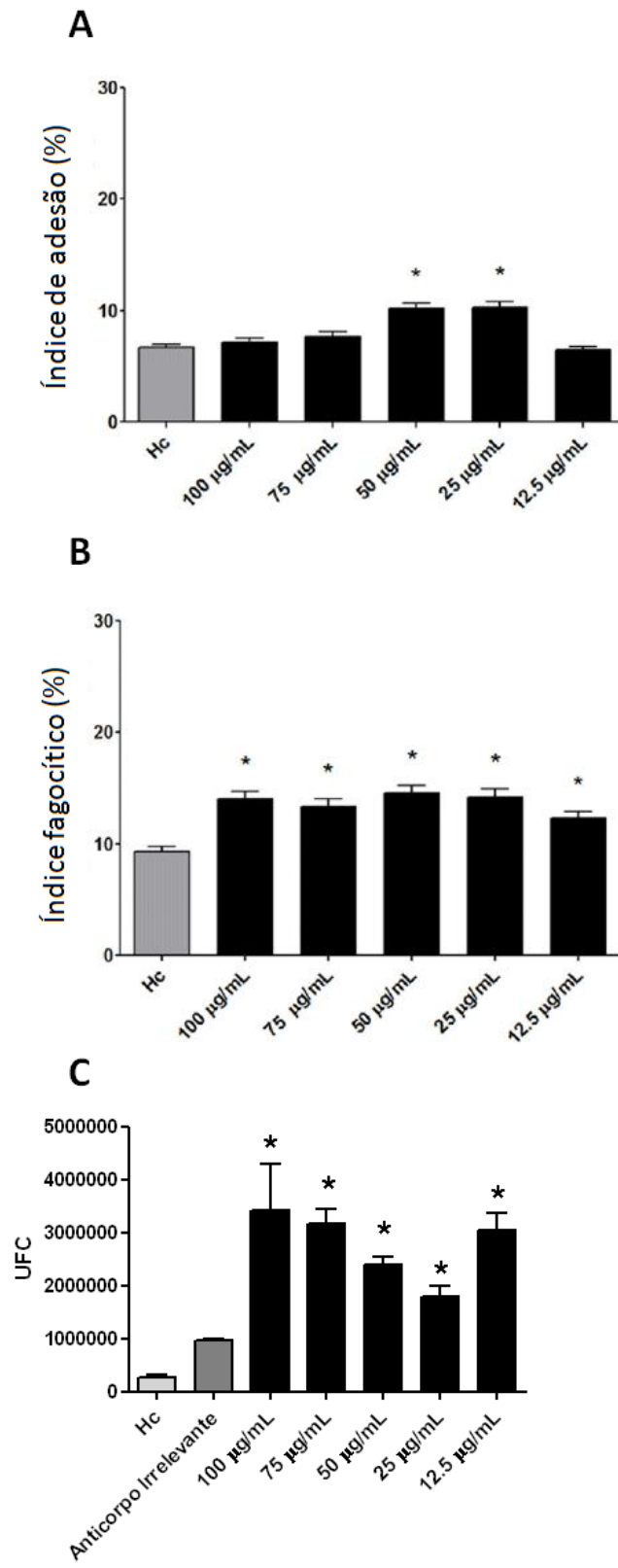
Figura 20. Anticorpo monoclonal contra uma proteína de 70KDa da superfície celular de *H. capsulatum* (H1C). ELISA com leveduras de *H. capsulatum* mostraram reatividade de H1C com células fúngicas intactas, a partir da concentração de 1 µg/mL (A). Análises de imunofluorescência (B) e campo claro (C) demonstraram que H1C reagiu difusamente sobre a superfície celular fúngica. Em (D) vemos a sobreposição de ambas as imagens (A e B). Os experimentos foram repetidos três vezes.



4.13. O anticorpo monoclonal H1C pode alterar as interações macrófago-*H. capsulatum*

Os ensaios de fagocitose foram analisados por microscopia confocal e citometria de fluxo. Foi possível observar que o anticorpo H1C aumentou a adesão das leveduras de *H. capsulatum* com os macrófagos, opsonizadas previamente com o anticorpo monoclonal H1C, nas concentrações de 25 e 50 µg/mL deste anticorpo (**Figura 21A**), enquanto a fagocitose teve seus índices aumentados em todas as concentrações usadas de H1C (12,5 a 100 µg/mL) (**Figura 21B**) ($P<0,05$). Nos ensaios de viabilidade fúngica no interior do macrófago foi possível determinar que H1C aumentou significativamente a sobrevivência intracelular destas leveduras em células J774.16 (**Figura 21C**) ($P<0,05$).

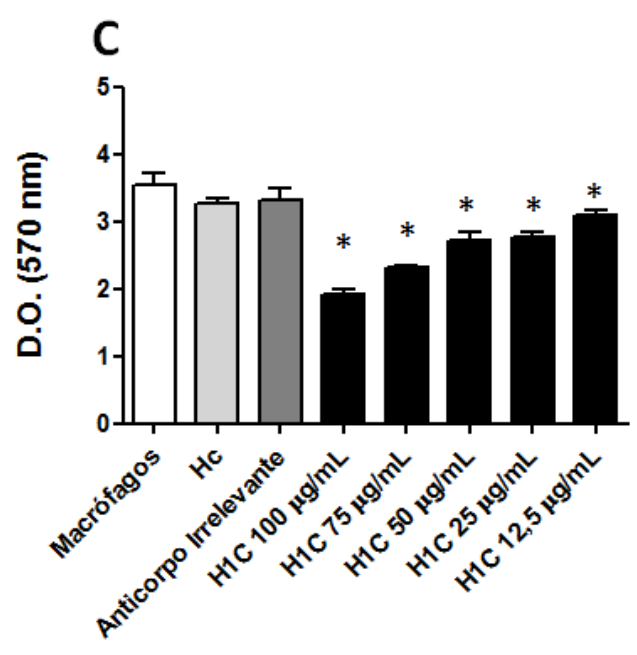
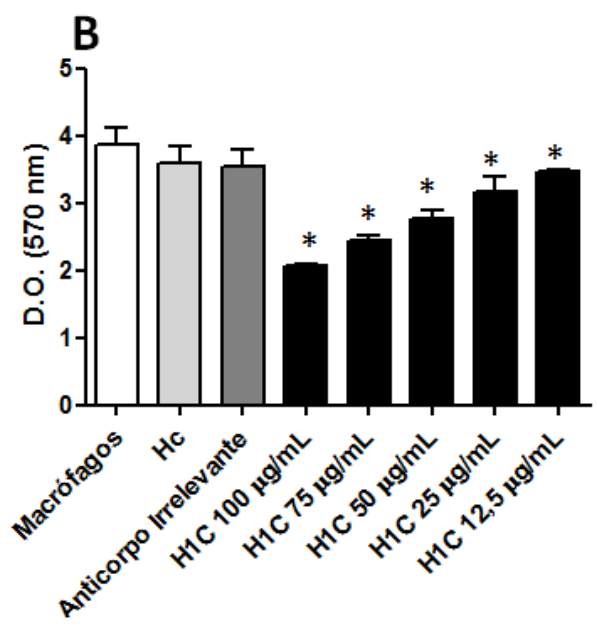
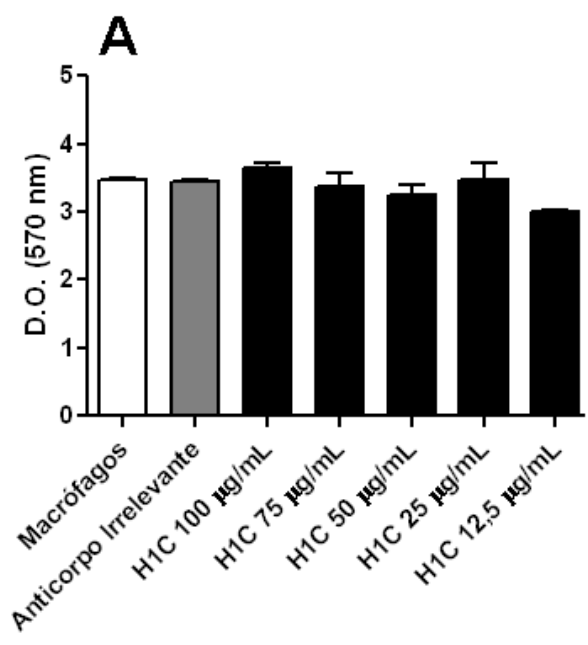
Figura 21. H1C pode alterar as interações macrófago-*H. capsulatum*. H1C altera a associação entre células J774.14 e leveduras. Os efeitos da opsonização de leveduras de *H. capsulatum* com H1C foi analisado em ensaios de adesão (A) e fagocitose (B). A adesão aumentou significativamente nas concentrações de 25 e 50 µg/mL de H1C. Já o aumento da fagocitose foi observado em todas as concentrações de H1C testadas (12,5 a 100 µg/mL) (A e B). A opsonização com H1C nas concentrações de 12,5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL aumentou significativamente a sobrevivência intracelular destas leveduras (C). O símbolo Hc significa leveduras de *H. capsulatum* sem opsonização com anticorpos, e na presença de macrófagos. Em todos os gráficos, os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Cada experimento foi feito em triplicata. * $P < 0,05$ para comparação entre as amostras e os controles.



4.14. Efeito do anticorpo monoclonal H1C na viabilidade de macrófagos

Com o intuito de averiguar a possibilidade de efeitos do anticorpo monoclonal H1C sob macrófagos J774.16, ensaios de redução de MTT foram realizados para avaliar a viabilidade da célula fagocítica apenas na presença do anticorpo monoclonal H1C, na ausência da célula fúngica, após 4 h de incubação. Nenhum efeito significativo foi observado nestes macrófagos na presença de H1C, usando concentrações de 12,5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL (**Figura 22A**) ($P>0,05$). A viabilidade das células J774.16 após a exposição de leveduras de *H. capsulatum*, previamente opsonizadas ou não com diferentes concentrações do anticorpo monoclonal H1C, foi medida por ensaios similares, após 2 (**Figura 22B**) e 4 (**Figura 22C**) h de interação. Em concentrações acima de 12,5 µg/mL do anticorpo monoclonal H1C, na presença de leveduras, foi observado um aumento na toxicidade dose-dependente em macrófagos J774.16 ($P<0,05$). Como controle, este mesmo teste foi realizado apenas na presença do anticorpo H1C, sem as leveduras de *H. capsulatum*, e apenas o anticorpo monoclonal não apresentou qualquer efeito sobre os macrófagos.

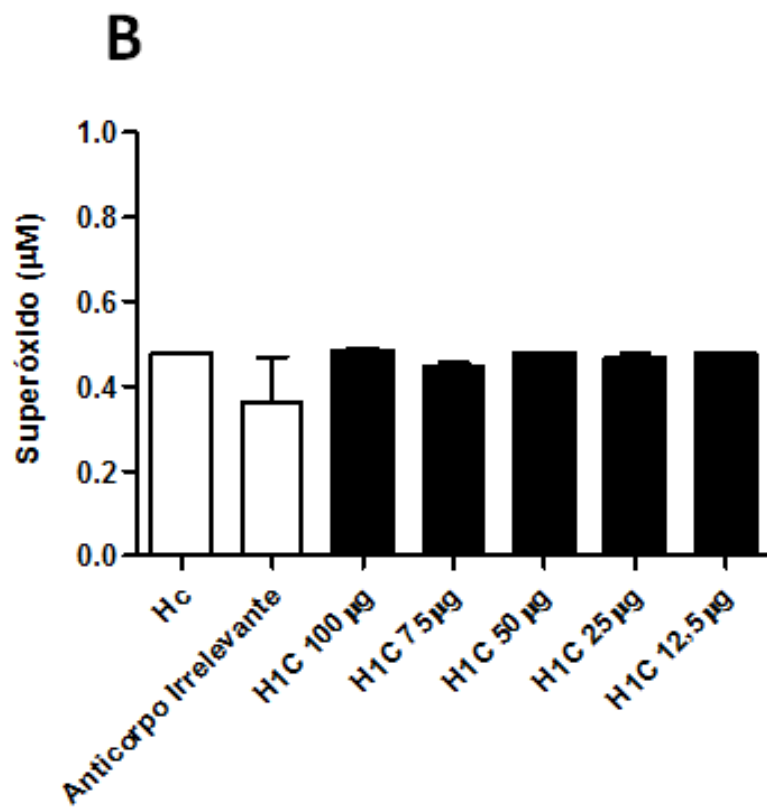
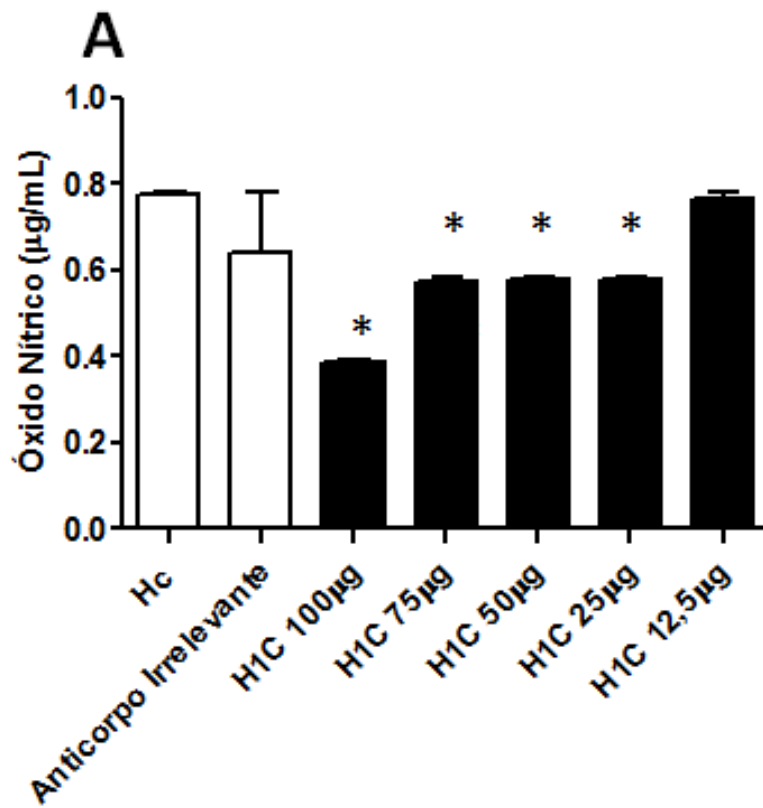
Figura 22. Efeito de H1C na viabilidade de macrófagos. Ensaios de redução de MTT foram realizados para avaliar a viabilidade da célula fagocítica apenas na presença do anticorpo monoclonal H1C, na ausência da célula fúngica. Nenhum efeito significativo foi observado nestes macrófagos na presença de H1C, usando concentrações de 12,5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL (A) ($P > 0,05$). Os resultados de toxicidade em macrófagos foram realizados por 2 (B) e 4 (C) horas de interação com leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com H1C. Resultados em triplicata, e os dados expressam a média de três experimentos diferentes.



4.15. Efeito dos anticorpos monoclonais anti-PRM na liberação de espécies reativas de oxigênio

Após comprovação do aumento da viabilidade de leveduras de *H. capsulatum*, foi examinada a produção de óxido nítrico e superóxido pelas células J774.16 em co-cultura com as leveduras expostas a diferentes concentrações do anticorpo monoclonal H1C, bem como expostas a uma IgG irrelevante ou ao PBS. A opsonização por H1C de leveduras levou a um decréscimo da liberação de óxido nítrico por estas células imunes, em concentrações de H1C ≥ 25 $\mu\text{g/mL}$, medido após 2 h de co-cultura (**Figura 23A**) ($P < 0,05$). Em contraste, não foi observada nenhuma diferença significativa na liberação dos radicais superóxido pelos macrófagos, em nenhuma das concentrações de H1C testada (**Figura 23B**) ($P > 0,05$).

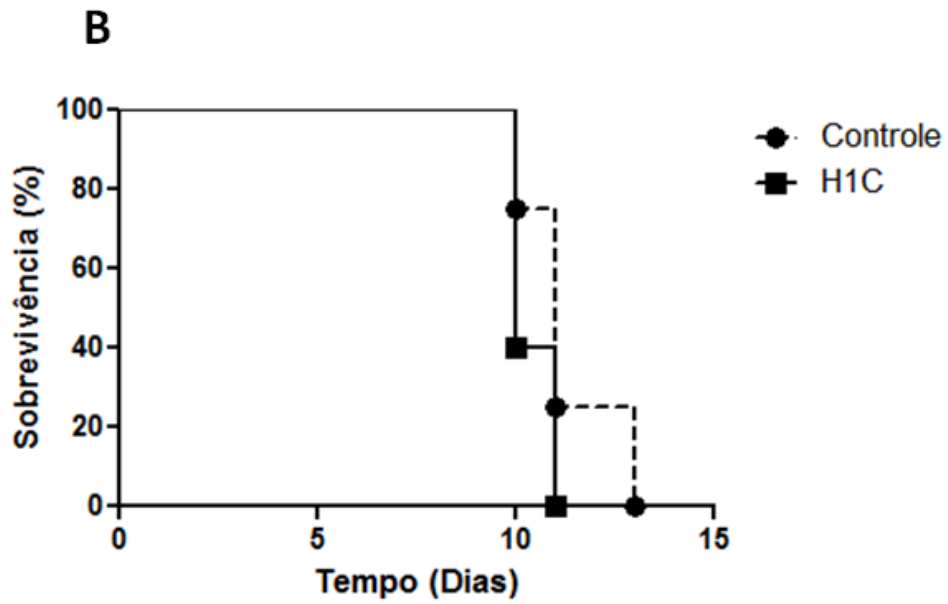
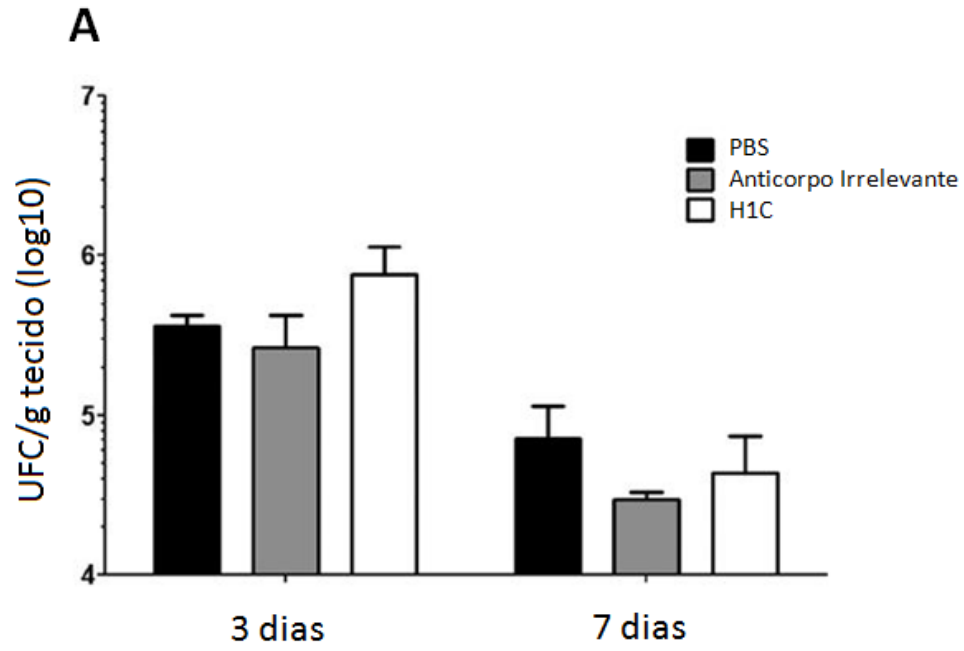
Figura 23. Impacto dos anticorpos monoclonais anti-PRM na liberação de espécies reativas de oxigênio. Opsonização de leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com o monoclonal H1C suprimiu a liberação de óxido nítrico por células J774.16 em concentrações de H1C $\geq 25 \mu\text{g/mL}$, medido após 2 h de co-cultura (A) (* $P < 0,05$). A produção de superóxido por macrófagos não foi afetada pela presença ou ausência dos anticorpos monoclonais anti-PRM (B). Os experimentos foram realizados em triplicata, duas vezes cada.



4.16. Anticorpo monoclonal H1C e histoplasmose experimental murina

O anticorpo monoclonal H1C (250 μ g) foi administrado intraperitonealmente em camundongos C57BL/6 2 h antes da inoculação das formas de levedura de *H. capsulatum*. Controles usando IgG irrelevante e PBS foram realizados. Os estudos de recuperação de UFC de tecidos pulmonares infectados mostraram uma tendência ao aumento de UFC recuperadas de tecidos de camundongos tratados com H1C após 3 dias de infecção, porém os resultados das UFC obtidas destes tecidos após 3 e 7 dias de infecção não foram estatisticamente significativos (**Figura 24A**) ($P>0,05$). Quanto aos estudos de letalidade, mais uma vez observou-se uma tendência a uma menor sobrevivência nos camundongos previamente tratados com o anticorpo monoclonal H1C, porém as análises estatísticas não indicaram diferenças significativas quando comparados aos resultados dos grupos-controle, uma vez que nos animais tratados os óbitos ocorreram no dia 10 ± 1 , enquanto no grupo controle os óbitos foram observados no dia 11 ± 1 após o desafio com *H. capsulatum* (**Figura 24B**) ($P>0,05$).

Figura 24. H1C e histoplasmose experimental murina. Pré-tratamento com injeções intraperitoneais com 100 µg de H1C não alterou a infecção e recuperação de unidades formadoras de colônias (UFC) em tecidos pulmonares infectados (A), assim como não prolongou a sobrevivência de camundongos infectados com dose letal de *H. capsulatum* (B). Os estudos de recuperação de UFC foram realizados com três camundongos por grupo para cada dia de análise (dia 3 e dia 7). Os estudos de sobrevivência foram realizados utilizando grupos de 10 camundongos, em dois ensaios independentes.



5. Discussão

Com o surgimento de quadros que levam à imunossupressão, como a AIDS e tratamentos que utilizam quimioterapia, as infecções fúngicas têm se expandido por todo o mundo, ganhando importância na clínica e, conseqüentemente, nas pesquisas (STEINBACH *et al.*, 2003a). Inúmeros estudos foram e têm sido realizados de forma a buscar um maior entendimento dessas infecções e do processo de patogênese desses fungos emergentes, dentre os quais se destaca os fungos do complexo *Scedosporium/Pseudallescheria* (CORTEZ *et al.*, 2008), bem como a espécie *H. capsulatum* e suas variantes (HOLBROOK & RAPPLEYE, 2008).

Recentemente, vários estudos vêm sendo realizados para o maior conhecimento dos fatores de virulência que permitem aos fungos infectarem, se adaptarem e colonizarem o hospedeiro humano. No complexo *Pseudallescheria/Scedosporium*, algumas moléculas de superfície, como glucanas, glicoproteínas e glicolípídeos, além de enzimas proteolíticas já foram descritas, assim como a sua importância para a célula fúngica (SANTOS *et al.*, 2009).

Sabe-se que a superfície fúngica é rica em glicoconjugados, em especial os que contêm em sua composição unidades de manose, que são moléculas importantes para a interação com o hospedeiro (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006a,b). Sabe-se também que diversos fungos são capazes de aderir e invadir células epiteliais e que este mecanismo pode ser essencial no curso da infecção pelos microrganismos (PINTO *et al.*, 2004). Todavia, a complexidade das interações que ocorrem entre fungos patogênicos e seus hospedeiros nos sugerem que estes microrganismos apresentam um grande número de mecanismos de aderência (KARKOWSKA-KULETA, RAPALA-KOZIK & KOZIK, 2009, RAPALA-KOZIK *et al.*, 2009).

A relevância do presente estudo mostra-se diretamente associada com o crescente número de casos de pacientes imunocomprometidos e com a falha no tratamento destes pacientes. Este quadro claramente facilita a infecção do hospedeiro por espécies previamente tidas como não patogênicas, como alguns fungos

filamentosos e leveduriformes (VAN BURIK & MAGEE, 2001), o que demonstra a importância da procura de novos alvos terapêuticos bem como de novos compostos com ação antifúngica. O número de relatos de infecção oportunista por *P. boydii* tem aumentado consideravelmente, o que é associado ao difícil tratamento, principalmente explicado pela resistência do fungo a antifúngicos clássicos, como a anfotericina B. Para histoplasmose, classicamente, a infecção vem sendo tratada com anfotericina B, por longos períodos. Atualmente, esta droga é usada para casos de infecção severa e apenas por algumas semanas, seguida por uma terapia com azóis. O itraconazol é normalmente a droga de escolha para seguir a terapia com anfotericina B e para o tratamento de casos de histoplasmose com classificações de leve a moderado. Dessa forma, estudos que visem à descoberta de substâncias capazes de inibir processos vitais associados à biologia celular bem como à interação de fungos com células hospedeiras, podem revelar compostos promissores a serem utilizados numa futura quimioterapia para o tratamento de infecções clínicas.

Neste contexto específico, *P. boydii* aparece como um patógeno humano emergente com uma expressão importante, bem como *H. capsulatum* se apresenta como a espécie fúngica responsável pelo maior número de acometimentos sobre doenças pulmonares fúngicas (VAN BURIK & MAGEE, 2001, HOLBROOK & RAPPLEYE, 2008). Um grande número de estudos vem mostrando que uma grande gama de drogas antifúngicas, dentre elas, anfotericina B, nistatina, nistatina lipossomal, itraconazol, flucitosina, fluconazol, terbinafrina e cetoconazol, apresentam um baixo grau de atividade contra fungos presentes no complexo *Scedosporium/Pseudallescheria* (HENNEQUIN, 1996; DEL POETA, SCHELL & PERFECT, 1997; RADFORD, JOHNSON & WARNOCK, 1997; ESPINEL-INGROFF, 1998a,b; MCGINNIS *et al.*, 1998; OHNSON *et al.*, 1998; PFALLER *et al.*, 1998; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 1999; UCHIDA; CARRILLO & GUARRO, 2001, MELETIADIS *et al.*, 2002; MINASSIAN *et al.*, 2003; ODABASI *et al.*, 2004; GUARRO *et al.*, 2006). Os novos compostos triazólicos, como voriconazol (CARRILLO & GUARRO, 2001, MELETIADIS *et al.*, 2002) e ravuconazol (CARRILLO & GUARRO, 2001, GONZALEZ *et al.*, 2005) se mostram promissores, enquanto posoconazol apresenta

um espectro de atividade variável (MELETIADIS *et al.*, 2002, CARRILLO & GUARRO, 2001). Já as drogas que fazem parte do grupo das equinocandinas apresentam baixa atividade.

A implementação de terapias baseadas no uso de anticorpos ainda permanece empírica e necessitando de maiores estudos, uma vez que fatores que influenciam a eficácia destas terapias ainda são pouco entendidos e a ativação de vias inflamatórias pode ter um efeito deletério para o organismo hospedeiro (WEISER *et al.*, 1996; SAVOY *et al.*, 1997; LENDVAI *et al.*, 2000, HALL, DIACONU & PEARLMAN, 2001). Baseado nisto, este trabalho decidiu investigar se anticorpos monoclonais poderiam proteger contra dois tipos de infecções fúngicas, e como estes anticorpos poderiam influenciar a biologia e a patogenicidade dos fungos utilizados no estudo.

Os anticorpos monoclonais anti-PRM reconheceram componentes na superfície de conídios de *P. boydii*. A análise por fluorescência permitiu imunolocalizar a PRM em toda a superfície celular de conídios de *P. boydii*, e mostrou uma diferença significativa no reconhecimento da PRM pelo anticorpo monoclonal F10, demonstrando um perfil diferenciado de marcação, uma vez que se ligou também a região mais apical da formação do tubo germinativo, e não somente ao corpo celular do fungo, demonstrando então a presença da molécula de PRM nesta região em formação para o futuro desenvolvimento em hifas. Além disso, o reconhecimento de diferentes espécies fúngicas pelos anticorpos monoclonais anti-PRM de *P. boydii* evidenciou a existência de epítomos comuns reconhecidos por estes anticorpos entre fungos relacionados ou não com *P. boydii*, como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *H. capsulatum*, *S. apiospermum* e *S. prolificans*. *S. apiospermum* e *S. prolificans* possuem uma peptidoramanomana em suas superfícies apresentando pequenas diferenças estruturais quando comparadas à molécula de PRM de *P. boydii* (BARRETO-BERGTER *et al.*, 2008). Estudos estruturais na PRM de *P. boydii* já demonstraram que unidades manosil α (1→2)-ligadas estão localizadas nas cadeias laterais que apresentam α -manosil ou α -ramnosil como terminais não-redutores (LIMA *et al.*, 2001), provavelmente localizadas em glicanas N-ligadas (PINTO *et al.*, 2005). De forma semelhante, anticorpos

monoclonais H1C foram capazes de se ligar na superfície de leveduras de *H. capsulatum*, o que demonstrou um perfil significativo de ligação do anticorpo com estas leveduras, inclusive em concentrações acima de 1 µg/mL do anticorpo H1C. Ainda, a marcação de H1C mostrou a capacidade de ligação deste anticorpo por todo o corpo celular da levedura de *H. capsulatum*, com possíveis regiões onde esta proteína de 70 kDa se apresenta concentrada na superfície celular, observado pelo perfil de marcação pontual encontrado.

Para *P. boydii* e os anticorpos anti-PRM foi demonstrado ainda que a porção carboidrato da molécula de PRM era essencial para o reconhecimento dos anticorpos F10, C7 e C11, uma vez que o tratamento com PNGase-F, que permitiu a remoção de glicanas *N*-ligadas, reduziu significativamente a ligação da PRM com os anticorpos monoclonais. Somado a isto, os três anticorpos monoclonais anti-PRM reconheceram epítomos similares ou sobrepostos, como observado em ensaios de ELISA de competição.

Alterações na superfície celular de conídios em repouso (conídios “resting”), durante o processo de inchaço (“swelling”) e germinação podem interferir no reconhecimento de anticorpos monoclonais. Em *P. boydii*, estudos com glucosilceramidas mostraram que estas moléculas são detectáveis na superfície do micélio e da pseudohifa, mas não nas formas conidiais, sugerindo assim uma expressão diferenciada deste glicoconjugado, de acordo com a fase morfológica do fungo (PINTO *et al.*, 2002). Anticorpos gerados contra glucosilceramidas podem afetar a transição conídio-micélio em *P. boydii*, bem como a diferenciação celular de *C. albicans* (PINTO *et al.*, 2002, TAVARES *et al.*, 2008). No fungo *Fonsecaea pedrosoi*, observou-se uma expressão diferenciada de sialoglicoconjugados e da atividade da sialidase de acordo com o estágio morfológico fúngico, mostrando a presença destas moléculas em conídios e em micélio, mas não em células escleróticas deste fungo, sugerindo que a expressão de ácido siálico em *F. pedrosoi* varia de acordo com a transição morfológica (ALVIANO *et al.*, 2004). Algumas cepas virulentas de *H. capsulatum* possuem α -(1,3)-glucanas na parede celular de leveduras, estando

ausentes nas formas miceliais (HOLBROOK & RAPPLEYE, 2008). Este polissacarídeo está presente na fase leveduriforme de outros dois patógenos fúngicos dimórficos, *Paracoccidioides brasiliensis* (SAN-BLAS & VERNET, 1977) e *Blastomyces dermatitidis* (HOGAN & KLEIN, 1994). Nestas duas espécies, algumas variantes fúngicas podem perder, espontaneamente, as α -(1,3)-glucanas, o que culmina também com a perda de virulência. A estrutura da PRM em *P. boydii*, bem como proteínas presentes em *H. capsulatum*, podem ter expressões diferentes de acordo com a fase morfológica em que se encontram os fungos em questão. Assim, para o caso de *P. boydii* e os anticorpos monoclonais anti-PRM, a possibilidade de expressão diferenciada de acordo com o estágio morfológico estudado (conídios em repouso - “resting”, conídios inchados - “swollen”, hifas), poderia explicar a diferença de marcação observada para cada anticorpo monoclonal anti-PRM usado. Estes anticorpos foram gerados usando células totais de *P. boydii*, incluindo fungos em diferentes estágios morfológicos.

A resposta imune celular tem sido relatada como sendo a principal forma de combate do hospedeiro às infecções fúngicas (ROILIDES *et al.*, 2009). No presente estudo, decidiu-se investigar o envolvimento da molécula de PRM na fagocitose por macrófagos J774.16. Os resultados demonstraram que os anticorpos gerados contra a PRM reduziram a internalização de conídios de *P. boydii* e leveduras de *C. albicans*, opsonizados pelos anticorpos monoclonais anti-PRM. Para evidenciar a importância e a eficácia da resposta imune celular no combate às infecções fúngicas e a participação dos anticorpos monoclonais neste processo, foi avaliada a eficiência dos macrófagos em eliminar estes conídios. A opsonização dos conídios levou a um aumento da sobrevivência no interior das células fagocíticas. Estudos anteriores usando células HEp2 mostraram que, quando conídios de *P. boydii* foram previamente incubados com anticorpos policlonais anti-PRM, os processos de adesão e endocitose foram inibidos de uma maneira dose-dependente (PINTO *et al.*, 2004). Assim, estes resultados sugeriram a participação ativa deste fungo no processo de interação, uma vez que as células HEp2 são consideradas células fagocíticas não-profissionais. Já resultados obtidos durante a interação de *H. capsulatum* com macrófagos J774.16 mostraram que o anticorpo H1C aumentou a associação das leveduras de *H. capsulatum* com os

macrófagos, sendo que nos ensaios de adesão este aumento ocorreu nas concentrações de 25 e 50 µg/mL de H1C, enquanto que os resultados de fagocitose mostraram um aumento do índice fagocítico em todas as concentrações de H1C testadas. Resultados similares aos de *P. boydii* e anticorpos anti-PRM no que concerne à sobrevivência fúngica intracelular foi constatado para *H. capsulatum* e H1C. Foi visto que em todas as concentrações deste anticorpo, as leveduras tiveram um aumento no índice de sobrevivência no interior ácido dos macrófagos. Estudos prévios com *H. capsulatum* e anticorpos monoclonais anti-Hsp60 mostraram que, na presença destes anticorpos também era observado um aumento no índice fagocítico por células J774.16 (GUIMARAES *et al.*, 2009). No entanto, resultados prévios com anticorpos monoclonais protetores anti-glucuronoxilomanana (GXM), um polissacarídeo capsular de *C. neoformans*, não mostram ser estes anticorpos mediadores efetivos na fagocitose criptocócica (BEENHOUWER *et al.*, 2007). Da mesma forma que estudos prévios já demonstraram a dependência do receptor CR3 para internalização de *H. capsulatum* por células imunes (BULLOCK & WRIGHT, 1987; POCKLEY, 2001), conídios de *P. boydii* mostraram a mesma dependência, uma vez que resultados obtidos no presente trabalho demonstraram uma diminuição significativa na fagocitose quando houve o bloqueio dos receptores CD11b e CD18 por anticorpos específicos.

A presença do anticorpo monoclonal F10 opsonizando os conídios de *P. boydii* aumentou a sobrevivência intracelular e também a fusão fagolisossomal, o que é frequentemente associado com um aumento na morte de microrganismos no interior destas estruturas ácidas (WASYLNKA & MOORE, 2003). Conídios de *P. boydii*, na presença ou ausência de opsonização por anticorpos monoclonais anti-PRM, foram capazes de crescer e destruir macrófagos durante o curso da infecção. Ainda foi observado que condições ácidas parecem atuar como um fator que estimula o crescimento pra este fungo. Uma explicação possível para este benefício no crescimento é que enzimas proteolíticas de *P. boydii*, como metalopeptidases, requerem um pH ácido para a atividade, e estas peptidases são enzimas-chave envolvidas no metabolismo microbiano e virulência (PEREIRA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009). Fungos patogênicos apresentam diversos mecanismos para a evasão da

degradação fagocítica. Fagossomos contendo *H. capsulatum* apresentam incapacidade na acidificação, mesmo mantendo a competência na fusão com lisossomos (EISSENBERG, GODMAN & SCHLESINGER, 1993). *A. fumigatus* consegue sobreviver e germinar nos fagossomos acídicos, e os conídios que apresentam tubos germinativos em formação podem escapar do fagossomo para formar hifas extracelulares, em um mecanismo que envolve lise da célula hospedeira (WASYLNKA & MOORE, 2003), um mecanismo similar com o observado para *P. boydii* neste trabalho. A germinação no interior dos fagolisossomos e eventual escape com destruição da célula hospedeira também já foi observado em *C. albicans* (KAPOSZTA *et al.*, 1999). A formação do tubo germinativo pode levar à liberação de *C. albicans* dos macrófagos e o grau de germinação é regulado pelo pH lisossomal (KAPOSZTA *et al.*, 1999). Em contraste com os resultados obtidos para o anticorpo monoclonal F10, os monoclonais C7 e C11 não foram capazes de aumentar de maneira significativa a fusão de fagossomos com lisossomos, o que pode estar relacionado com as diferentes propriedades de ligação previamente observadas entre os três anticorpos monoclonais anti-PRM. *H. capsulatum*, quando na presença de H1C, é capaz de afetar a viabilidade de macrófagos J774.16, em maiores proporções, e este aumento na toxicidade se mostrou dose-dependente.

O efeito de um anticorpo monoclonal depende de diversos fatores, incluindo o antígeno alvo e sua função, a densidade da superfície celular e características intrínsecas do anticorpo monoclonal, o que inclui especificidade, avidéz e isotipo (CASADEVALL & PIROFSKI, 1999; CASADEVALL *et al.*, 2002; CASADEVALL, DADACHOVA & PIROFSKI, 2004). Quando o esporo fúngico germina e produz a hifa, ocorre deposição e acúmulo de novas substâncias formadas na parede celular da hifa em crescimento, para que esta se alongue (GRIMM *et al.*, 2005). A prevenção de várias infecções fúngicas requer o controle tanto da germinação de esporos quanto do crescimento da hifa. Vários estudos já mostraram a capacidade de anticorpos monoclonais anti-glicoconjugados de superfície celular fúngica em afetar a diferenciação de diversos fungos, incluindo *C. albicans*, *P. boydii* e *Colletotrichum gloesporioides* (PINTO *et al.*, 2002, DA SILVA *et al.*, 2004). A presença dos anticorpos

monoclonais F10, C7 e C11 aumentou a germinação conidial, quando comparado aos controles, indicando que estes anticorpos podem acelerar a modificação da estrutura da parede celular. O aumento da atividade metabólica mostrado pelos ensaios de redução de MTT em *P. boydii* e *C. albicans* expostos aos anticorpos monoclonais é consistente com o aumento de processos celulares requeridos para a morfogênese.

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem causar impacto no crescimento fúngico. A ação dos macrófagos em eliminar patógenos invasores ocorre pela liberação de substâncias que participam da ativação do processo de digestão desses conídios no interior dos macrófagos (ROILIDES *et al.*, 2009). Macrófagos broncoalveolares ativados e neutrófilos podem matar *H. capsulatum* por mecanismos dependentes de peróxido de hidrogênio e produtos das vias de óxido nítrico sintase, enquanto efeitos fungistáticos dependem quase exclusivamente dos produtos das vias de óxido nítrico sintase (BRUMMER & STEVENS, 1995). Na criptococose, a superóxido dismutase é de extrema importância, uma vez que esta enzima pode interferir na virulência fúngica por afetar o crescimento do fungo no interior de macrófagos (COX *et al.*, 2003). A liberação de óxido nítrico é um importante fator para o ataque oxidativo dirigido contra diferentes patógenos (ROSSI *et al.*, 1999; RIVERA *et al.*, 2002). Sendo assim, o presente trabalho decidiu investigar o perfil da produção de superóxido e óxido nítrico durante a infecção de *P. boydii* e *H. capsulatum* nos macrófagos, quando estas células fúngicas foram opsonizadas com anticorpos monoclonais anti-PRM e anticorpo monoclonal H1C, respectivamente. Para *P. boydii*, a opsonização de conídios com os monoclonais F10, C7 e C11 levou a um decréscimo na produção de superóxido, enquanto os níveis de óxido nítrico não apresentaram diferenças significativas em relação aos controles sem opsonização. Para *H. capsulatum*, a opsonização destas leveduras indicou um efeito dose-dependente do anticorpo H1C em reduzir a produção de óxido nítrico e favorecer o fungo em detrimento das células imunes, enquanto que os níveis de superóxido não foram alterados pela presença das leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com diferentes concentrações de H1C, quando comparados aos níveis de produção vistos nos controles.

Anticorpos monoclonais já foram mostrados com efeito protetor em diversas infecções fúngicas, incluindo candidíase, criptococose, aspergilose e pneumocistose (CASADEVALL, 1995, CASADEVALL & PIROFSKI, 2007). Em *H. capsulatum*, estudos prévios demonstraram que imunoglobulinas, como IgM, IgG2a, e IgG1 contra histona 2B (H2B) e Hsp60, protegeram contra a histoplasmose experimental. Na literatura também já foram descritos anticorpos monoclonais envolvidos na potencialização da doença fúngica sistêmica, como os anticorpos 7B6 (IgG2b contra Hsp60) para *H. capsulatum* (GUIMARAES *et al.*, 2009) e 13F1 (IgM contra cápsula polissacarídica) para *C. neoformans* (MUKHERJEE *et al.*, 1995, TABORDA & CASADEVALL, 2001). No atual trabalho foi observado que os anticorpos F10, C7 e C11 foram capazes de aumentar a doença em modelos murinos intratraqueal e intravenoso de infecção. Não foi possível recuperar unidades formadoras de colônias em tecidos pulmonares infectados, após 7 e 10 dias de infecção com *P. boydii*, na presença de anticorpos monoclonais anti-PRM. Porém, experimentos com *C. albicans* mostraram que houve uma maior recuperação de células fúngicas em rins de camundongos após 7 dias de infecção quando estes animais foram previamente tratados com o anticorpo monoclonal F10. Ainda como resultados obtidos para *C. albicans*, foi possível observar um aumento no crescimento fúngico, bem como um bloqueio na fagocitose por macrófagos J774.16, quando estas leveduras foram incubadas com os monoclonais F10, C7 e C11. No modelo intranasal de infecção por *H. capsulatum* em camundongos previamente tratados com H1C, observou-se que este anticorpo monoclonal não é eficiente na proteção dos animais frente a um modelo letal de histoplasmose. Quanto à recuperação de leveduras de tecidos pulmonares após 3 e 7 dias de infecção, foi possível notar uma tendência a uma maior recuperação de fungos quando os camundongos receberam H1C intraperitonealmente, previamente à infecção por *H. capsulatum*, mas estes resultados não mostraram significância estatística quando analisados.

Apesar da crescente importância de *P. boydii* como agente de micoses sistêmicas graves, existem poucos grupos estudando os vários aspectos da bioquímica e biologia celular neste fungo, o que limita expressivamente o conhecimento sobre

mecanismos de patogenicidade e alternativas terapêuticas (SANTOS *et al.*, 2009). Sabe-se, entretanto, que *P. boydii* é um fungo altamente resistente à maioria dos antifúngicos atualmente utilizados na clínica médica (CORTEZ *et al.*, 2008). O fungo dimórfico *H. capsulatum* é o maior responsável pelas doenças respiratórias fúngicas, infectando aproximadamente 500.000 indivíduos a cada ano (GOODWIN & DES PREZ, 1978, FERREIRA & BORGES, 2009). Este fungo pode causar uma grande gama de doenças, mas pacientes com AIDS (GOODWIN, LOYD & DES PREZ, 1981) ou pacientes que fazem uso de imunomoduladores, como inibidores de TNF- α (DEEPE, 2005, 2007; DEEPE & GIBBONS, 2006) apresentam, em geral, uma infecção disseminada letal. Sendo assim, a caracterização de moléculas com potencial envolvimento na patogênese podem ser alternativas interessantes para o desenho de novos compostos com potencial ação antifúngica (SANTOS *et al.*, 2009).

O entendimento da expressão, função e regulação do grupo total de moléculas em um sistema celular é um grande desafio. No caso de patógenos, o conhecimento do conjunto de glicoconjugados expressos poderia fornecer importantes informações sobre mecanismos de colonização, interações com o hospedeiro, patogênese e também novos alvos para agentes antifúngicos.

Assim, todos os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que anticorpos monoclonais se apresentam como não-protetores ou potencializadores das doenças, em modelos de pseudallescheriose e histoplasiose experimentais murinas. Foi possível observar que os anticorpos monoclonais afetaram a fagocitose fúngica, e acabaram por contribuir com a sobrevivência de *P. boydii* e *H. capsulatum* no interior ácido dos macrófagos, interferindo inclusive com funções efetoras importantes destas células imunes no contexto da defesa hospedeira contra organismos invasores. Em conclusão, os anticorpos monoclonais apresentaram vantagens para os fungos durante as interações patógeno-hospedeiro. De uma maneira geral, glicoconjugados e proteínas presentes na superfície celular fúngica podem ter grande impacto no que diz respeito à patobiologia fúngica. Estudos adicionais são necessários para um melhor entendimento do comportamento antagonista de anticorpos monoclonais em doenças fúngicas e explorar as respostas para estas importantes estruturas celulares.

6. Conclusão

- No presente trabalho foram estudadas moléculas presentes na superfície celular fúngica, e suas respectivas importâncias para a célula do microrganismo, bem como em mecanismos de interação com a célula hospedeira e no desenvolvimento da doença fúngica.
- Foram desenvolvidos anticorpos monoclonais contra tais moléculas de superfície, que foram utilizados como ferramentas para um maior entendimento da patobiologia destas infecções.
- Este trabalho mostrou moléculas de superfície fúngica com participação na virulência e na patobiologia fúngica, e que os anticorpos monoclonais se mostraram não protetores ou ainda foram capazes de potencializar a infecção fúngica.
- Resultados obtidos com os anticorpos monoclonais contra *P. boydii* e *H. capsulatum* encontrados nesta tese não excluem a possibilidade de anticorpos protetores serem gerados, possivelmente enfocando um diferente isotipo ou um diferente epítipo das moléculas em questão.
- Todos estes resultados demonstram toda a complexidade que envolve as interações patógeno-anticorpo e patógeno-hospedeiro.

7. Referências Bibliográficas

- AJELLO, L.; BRICENO MAAZ, T.; CAMPINS, H. & MOORE, J.C. **Isolation of *Histoplasma capsulatum* from an oil bird (*Steatornis caripensis*) cave in Venezuela.** Mycopathologia, 12, 199-206, 1960.
- ALBUQUERQUE, P.C.; NAKAYASU, E.S.; RODRIGUES, M.L.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; ALMEIDA, I.C. & NOSANCHUK, J.D. **Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes.** Cell. Microbiol., 10, 1695-1710, 2008.
- ALLEN, H.L. & DEEPE, G.S. **B cells and CD4-CD8- T cells are key regulators of the severity of reactivation histoplasmosis.** J. Immunol., 177, 1763-1771, 2006.
- ALLENDORFER, R.; BRUNNER, G.D. & DEEPE, G.S. **Complex requirements for nascent and memory immunity in pulmonary histoplasmosis.** J. Immunol., 162, 7389-7396, 1999.
- ALMEIDA-PAES, R.; PIMENTA, M.A.; PIZZINI, C.V.; MONTEIRO, P.C.; PERALTA, J.M.; NOSANCHUK, J.D. & ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. **Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection.** Clin. Vaccine. Immunol., 14, 244-249, 2007.
- ALVAREZ, M.; LOPEZ PONGA, B.; RAYON, C.; GARCIA GALA, J.; ROSON PORTO, M.C.; GONZALEZ, M.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V. & RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. **Nosocomial outbreak caused by *Scedosporium prolificans (inflatum)*: four fatal cases in leukemic patients.** J. Clin. Microbiol., 33, 3290-3295, 1995.
- ALVAREZ, M. & CASADEVALL, A. **Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages.** BMC Immunol., 8, 16, 2007.
- ALVIANO, D.S., RODRIGUES, M.L., ALMEIDA, C.A., SANTOS, A.L., COUCEIRO, J.N., SOARES, R.M.; TRAVASSOS, L.R. & ALVIANO, C.S. **Differential expression**

- of sialylglycoconjugates and sialidase activity in distinct morphological stages of *Fonsecaea pedrosoi*. Arch. Microbiol., 181, 278-286, 2004.
- APRIL, T.M.; ABBOTT, S.P.; FOGHT, J.M. & CURRAH, R.S. **Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microascaceae)**. Can. J. Microbiol.; 44, 270-278, 1998.
- BARRETO-BERGTER, E.; SASSAKI, G.L.; WAGNER, R.; SOUZA, L.M.; SOUZA, M.V.; PINTO, M.R.; DA SILVA, M.I. & GORIN, P.A. **The opportunistic fungal pathogen *Scedosporium prolificans*: carbohydrate epitopes of its glycoproteins**. Int. J. Biol. Macromol., 42, 93-102, 2008.
- BEENHOUWER, D.O.; YOO, E.M.; LAI, C.W.; ROCHA, M.A. & MORRISON, S.L. **Human immunoglobulin G2 (IgG2) and IgG4, but not IgG1 or IgG3, protect mice against *Cryptococcus neoformans* infection**. Infect. Immun., 75, 1424-1435, 2007.
- BENHAM, R.W. & GEORG, L.K. ***Allescheria boydii*, causative agent in a case of meningitis**. J. Invest. Dermatol., 10, 99-110, 1948.
- BHALLY, H.S.; SHIELDS, C.; LIN, S.Y. & MERZ, W.G. **Otitis caused by *Scedosporium apiospermum* in an immunocompetent child**. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol., 68, 975-978, 2004.
- BITTENCOURT, V.C.; FIGUEIREDO, R.T.; DA SILVA, R.B.; MOURAO-SA, D.S.; FERNANDEZ, P.L.; SASSAKI, G.L.; MULLOY, B.; BOZZA, M.T. & BARRETO-BERGTER, E. **An alpha-glucan of *Pseudallescheria boydii* is involved in fungal phagocytosis and Toll-like receptor activation**. J. Biol. Chem., 281, 22614-22623, 2006.
- BONNET, D.; NGUYEN, G.; DE PINA, J.J.; MARTET, G.; MILTGEN, J.; CUGUILLIERE, A.; VERROT, D.; LONJON, T.; CIVATTE, M. & MORILLON, M. **American pulmonary histoplasmosis. Prospective study with 232 soldiers after a 2-year assignment in Guiana**. Med. Trop. (Mars), 62, 33-38, 2002.
- BOUCHARA, J.P., BOUALI, A., TRONCHIN, G., ROBERT, R., CHABASSE, D. AND SENET, J.M. (1988). **Binding of fibrinogen to the pathogenic *Aspergillus* species**. J Med Vet Mycol 26, 327-334, 1988.

- BOUCHARA, J.P.; TRONCHIN, G.; ANNAIX, V.; ROBERT, R. & SENET, J.M. **Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes.** Infect. Immun., 58, 48-54, 1990.
- BOUCHARA, J.P.; HORRE, R. & DE HOOG, S. ***Pseudallescheria* and *Scedosporium*: emerging opportunists.** Med. Mycol., 47, 341-342, 2009.
- BRUMMER, E. & STEVENS, D.A. **Antifungal mechanisms of activated murine bronchoalveolar or peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*.** Clin. Exp. Immunol., 102, 65-70, 1995.
- BULLOCK, W.E. & WRIGHT, S.D. **Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95, in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages.** J. Exp. Med., 165, 195-210, 1987.
- BUZINA, W.; FEIERL, G.; HAAS, D.; REINTHALER, F.F.; HOLL, A.; KLEINERT, R.; REICHENPFADER, B.; ROLL, P. & MARTH, E. **Lethal brain abscess due to the fungus *Scedosporium apiospermum* (teleomorph *Pseudallescheria boydii*) after a near-drowning incident: case report and review of the literature.** Med. Mycol., 44, 473-477, 2006.
- CABIB, E.; BOWERS, B.; SBURLATI, A. & SILVERMAN, S.J. **Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure.** Microbiol. Sci., 5, 370-375, 1988.
- CABIB, E., DRGON, T., DRGONOVA, J., FORD, R.A. AND KOLLAR, R. **The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis.** Biochem. Soc. Trans., 25, 200-204.
- CABIB, E.; ROH, D.H.; SCHMIDT, M.; CROTTI, L.B. & VARMA, A. **The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis.** J. Biol. Chem., 276, 19679-19682, 2001.
- CAMPBELL, C.C. & BERLINER, M.D. **Virulence differences in mice of type A and B *Histoplasma capsulatum* yeasts grown in continuous light and total darkness.** Infect. Immun., 8, 677-678, 1973.
- CANTEROS, C.E.; IACHINI, R.H.; RIVAS, M.C.; VACCARO, O.; MADARIAGA, J.; GALARZA, R.; SNAIDERMAN, L.; MARTÍNEZ, M.; PALADINO, M.; CICUTTIN, G.; VARELA, E.; ALCOBA, E.; ZUIANI, F.; SAHAZA, J.H.; TAYLOR, M.L. &

- DAVEL, G. [First isolation of *Histoplasma capsulatum* from the urban bat *Eumops bonariensis*]. Rev. Argent. Microbiol., 37, 46-56, 2005.
- CARRILLO, A.J. & GUARRO, J. **In vitro activities of four novel triazoles against *Scedosporium* spp.** Antimicrob. Agents. Chemother., 45, 2151-2153, 2001.
- CARTER, D.A.; BURT, A.; TAYLOR, J.W.; KOENIG, G.L.; DECHAIR, B.M. & WHITE, T.J. **A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetic studies of *Histoplasma capsulatum*.** Electrophoresis, 18, 1047-1053, 1997.
- CASADEVALL, A. **Antibody immunity and invasive fungal infections.** Infect. Immun., 63, 4211-4218, 1995.
- CASADEVALL, A. **Passive antibody therapies: progress and continuing challenges.** Clin. Immunol., 93, 5-15, 1999.
- CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L.A. **Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity.** Infect. Immun., 67, 3703-3713, 1999.
- CASADEVALL, A. **Passive antibody administration (immediate immunity) as a specific defense against biological weapons.** Emerg. Infect. Dis., 8, 833-841, 2002.
- CASADEVALL, A.; DADACHOVA, E. & PIROFSKI, L.A. **Passive antibody therapy for infectious diseases.** Nat. Rev. Microbiol., 2, 695-703, 2004.
- CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L.A. **Antibody-mediated protection through cross-reactivity introduces a fungal heresy into immunological dogma.** Infect. Immun., 75, 5074-5078, 2007.
- CHAFFIN, W.L. ***Candida albicans* cell wall proteins.** Microbiol. Mol. Biol. Rev., 72, 495-544, 2008.
- CHAVEIRO, M.A.; VIEIRA, R.; CARDOSO, J. & AFONSO, A. **Cutaneous infection due to *Scedosporium apiospermum* in an immunosuppressed patient.** J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., 17, 47-49, 2003.
- CHAVES, M.M.; NOVATO-SILVA, E.; GOMEZ, M.V.; LIMA-E-SILVA, F.C. & NOGUEIRA-MACHADO, J.A. **Effect of gamma interferon and interleukin 10**

- on phosphoinositol turnover by human neutrophils *in vitro*.** Braz. J. Med. Biol. Res., 29, 1389-1392, 1996a.
- CHAVES, M.M.; SILVESTRINI, A.A.; SILVA-TEIXEIRA, D.N. & NOGUEIRA-MACHADO, J.A. **Effect *in vitro* of gamma interferon and interleukin-10 on generation of oxidizing species by human granulocytes.** Inflamm. Res., 45, 313-315, 1996b.
- CLEMONS, K.V.; DARBONNE, W.C.; CURNUTTE, J.T.; SOBEL, R.A. & STEVENS, D.A. **Experimental histoplasmosis in mice treated with anti-murine interferon-gamma antibody and in interferon-gamma gene knockout mice.** Microbes. Infect., 2, 997-1001, 2000.
- COCKSHOTT, W.P. & LUCAS, A.O. (1964a). **Histoplasmosis *Duboisii*.** Q. J. Med., 33, 223-238.
- COCKSHOTT, W.P. & LUCAS, A.O. **Radiological Findings in *Histoplasma Duboisii* Infections.** Br. J. Radiol., 37, 653-660, 1964b.
- CORTEZ, K.J.; ROILIDES, E.; QUIROZ-TELLES, F.; MELETIADIS, J.; ANTACHOPOULOS, C.; KNUDSEN, T.; BUCHANAN, W.; MILANOVICH, J.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.; RINALDI, M.G.; SHEA, Y.R.; ZAOUTIS, T.; KOTTILIL, S. & WALSH, T.J. **Infections caused by *Scedosporium spp.*** Clin. Microbiol. Rev., 21, 157-197, 2008.
- COX, G.M.; HARRISON, T.S.; MCDADE, H.C.; TABORDA, C.P.; HEINRICH, G.; CASADEVALL, A. & PERFECT, J.R. **Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages.** Infect. Immun., 71, 173-180, 2003.
- CUENCA-ESTRELLA, M.; DIAZ-GUERRA, T.M.; MELLADO, E.; MONZON, A. & RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. **Comparative *in vitro* activity of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* species from Spain.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 18, 432-435, 1999.
- DA SILVA, A.F.; RODRIGUES, M.L.; FARIAS, S.E.; ALMEIDA, I.C.; PINTO, M.R. & BARRETO-BERGTER, E. **Glucosylceramides in *Colletotrichum***

- gloeosporioides* are involved in the differentiation of conidia into mycelial cells.** FEBS Lett., 561, 137-143, 2004.
- DE HOOG, G.S.; MARVIN-SIKKEMA, F.D.; LAHPOOR, G.A.; GOTTSCHALL, J.C.; PRINS, R.A. & GUEHO, E. **Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*.** Mycoses, 37, 71-78, 1994.
- DEEPE, G.S. **Role of CD8+ T cells in host resistance to systemic infection with *Histoplasma capsulatum* in mice.** J. Immunol., 152, 3491-3500, 1994.
- DEEPE, G.S. **Modulation of infection with *Histoplasma capsulatum* by inhibition of tumor necrosis factor-alpha activity.** Clin. Infect. Dis., 41 Suppl 3, S204-207, 2005.
- DEEPE, G.S. & GIBBONS, R.S. **T cells require tumor necrosis factor-alpha to provide protective immunity in mice infected with *Histoplasma capsulatum*.** J. Infect. Dis., 193, 322-330, 2006.
- DEEPE, G.S. **Tumor necrosis factor-alpha and host resistance to the pathogenic fungus, *Histoplasma capsulatum*.** J. Investig. Dermatol. Symp. Proc., 12, 34-37, 2007.
- DEEPE, G.S. & GIBBONS, R.S. **TNF-alpha antagonism generates a population of antigen-specific CD4+CD25+ T cells that inhibit protective immunity in murine histoplasmosis.** J. Immunol., 180, 1088-1097, 2008.
- DEFONTAINE, A.; ZOUHAIR, R.; CIMON, B.; CARRERE, J.; BAILLY, E.; SYMOENS, F.; DIOURI, M.; HALLET, J.N. & BOUCHARA, J.P. **Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis.** J. Clin. Microbiol., 40, 2108-2114, 2002.
- DEL POETA, M.; SCHELL, W.A. & PERFECT, J.R. ***In vitro* antifungal activity of pneumocandin L-743,872 against a variety of clinically important molds.** Antimicrob. Agents Chemother., 41, 1835-1836, 1997.
- DELCLAUX, C.; SCHUTZ, R.; CALZOLARI, M.; BALLOUL, E. & ZANGO, B. **[Generalized histoplasmosis due to *Histoplasma duboisii* with mediastino-**

- pulmonary infection. Cure after 15 months of treatment with ketoconazole].**
Rev. Mal. Respir., 9, 559-560, 1992.
- DEODHARE, S. & SAPP, M. **Adrenal histoplasmosis: diagnosis by fine-needle aspiration biopsy.** Diagn. Cytopathol., 17, 42-44, 1997.
- DISMUKES, W.E.; BRADSHAW, R.W.; JR., CLOUD, G.C.; KAUFFMAN, C.A.; CHAPMAN, S.W.; GEORGE, R.B.; STEVENS, D.A.; GIRARD, W.M.; SAAG, M.S. & BOWLES-PATTON, C. **Itraconazole therapy for blastomycosis and histoplasmosis.** NIAID Mycoses Study Group. Am. J. Med., 93, 489-497, 1992.
- DOERING, T.L.; NOSANCHUK, J.D.; ROBERTS, W.K. & CASADEVALL, A. **Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins.** Med. Mycol., 37, 175-181, 1999.
- DOMER, J.E.; HAMILTON, J.G. & HARKIN, J.C. **Comparative study of the cell walls of the yeastlike and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*.** J. Bacteriol., 94, 466-474, 1967.
- DOMER, J.E. **Monosaccharide and chitin content of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*.** J. Bacteriol., 107, 870-877, 1971.
- DOMER, J.E. & HAMILTON, J.G. **The readily extracted lipids of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*.** Biochim. Biophys. Acta, 231, 465-478, 1971.
- DRUTZ, D.J. **Systemic fungal infections: diagnosis and treatment II.** Preface. Infect. Dis. Clin. North. Am. 3, ix-xiii, 1989.
- DURAUER, A.; BERGER, E.; ZANDIAN, M.; MERSICH, C.; SCHUSTER, M.; LOIBNER, H. & JUNGBAUER, A. **Yeast cell surface display system for determination of humoral response to active immunization with a monoclonal antibody against EpCAM.** J. Biochem. Biophys. Methods, 70, 1109-1115, 2008.
- EISSENBERG, L.G.; GOLDMAN, W.E. & SCHLESINGER, P.H. ***Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes.** J. Exp. Med., 177, 1605-1611, 1993.

- EMMONS, C.W. Histoplasmosis: **Animal Reservoirs and Other Sources in Nature of Pathogenic Fungus, *Histoplasma***. Am. J. Public Health Nations Health, 40, 436-440, 1950.
- ESPINEL-INGROFF, A. **Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts**. J. Clin. Microbiol., 36, 2950-2956, 1998a.
- ESPINEL-INGROFF, A. ***In vitro* activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens**. J. Clin. Microbiol., 36, 198-202, 1998b.
- FENELON, G. **[Tremor. Diagnostic orientation]**. Rev. Prat., 49, 1435-1439, 1999.
- FERREIRA, M.S. & BORGES, A.S. **[Histoplasmosis]**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 42, 192-198, 2009.
- FOJTASEK, M.F.; KLEIMAN, M.B.; CONNOLLY-STRINGFIELD, P.; BLAIR, R. & WHEAT, L.J. **The *Histoplasma capsulatum* antigen assay in disseminated histoplasmosis in children**. Pediatr. Infect. Dis. J., 13, 801-805, 1994.
- GABAL, M.A.; HASSAN, F.K.; SIAD, A.A. & KARIM, K.A. **Study of equine histoplasmosis farciminosi and characterization of *Histoplasma farciminosum***. Sabouraudia, 21, 121-127, 1983.
- GABAL, M.A. & MOHAMMED, K.A. **Use of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of equine *Histoplasmosis farciminosi* (epizootic lymphangitis)**. Mycopathologia, 91, 35-37, 1985.
- GACSER, A.; SALOMON, S. & SCHAFER, W. **Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker**. FEMS Microbiol. Lett., 245, 117-121, 2005.
- GAUR, P.K. & LICHTWARDT, R.W. **Comparative study of a new *Chrysosporium* species with *Histoplasma capsulatum***. Sabouraudia, 18, 105-114, 1980.
- GIL-LAMAIGNERE, C.; ROILIDES, E.; LYMAN, C.A.; SIMITSOPOULOU, M.; STERGIOPOULOU, T.; MALOUKOU, A. & WALSH, T.J. **Human phagocytic**

- cell responses to *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*): variable susceptibility to oxidative injury. *Infect. Immun.*, 71, 6472-6478, 2003.
- GILDEA, L.A.; MORRIS, R.E. & NEWMAN, S.L. ***Histoplasma capsulatum* yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells.** *J. Immunol.*, 166, 1049-1056, 2001.
- GILGADO, F.; CANO, J.; GENE, J. & GUARRO, J. **Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species.** *J. Clin. Microbiol.*, 43, 4930-4942, 2005.
- GILGADO, F.; CANO, J.; GENE, J., SUTTON, D.A. & GUARRO, J. **Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*.** *J. Clin. Microbiol.*, 46, 766-771, 2008.
- GILGADO, F.; CANO, J.; GENE, J.; SERENA, C. & GUARRO, J. **Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex.** *Med. Mycol.*, 47, 371-374, 2009.
- GILGADO, F.; GENE, J.; CANO, J. & GUARRO, J. **Heterothallism in *Scedosporium apiospermum* and description of its teleomorph *Pseudallescheria apiosperma* sp. nov.** *Med. Mycol.*, 48, 122-128, 2010.
- GINTER, G.; PETUTSCHNIG, B.; PIERER, G.; SOYER, H.P.; REISCHLE, S.; KERN, T. & DE HOOG, S. **Case report. Atypical cutaneous pseudallescheriosis refractory to antifungal agents.** *Mycoses*, 42, 507-511, 1999.
- GLATMAN-FREEDMAN, A. & CASADEVALL, A. **Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*.** *Clin. Microbiol. Rev.*, 11, 514-532, 1998.
- GOMEZ, B.L.; FIGUEROA, J.I.; HAMILTON, A.J.; ORTIZ, B.L.; ROBLEDO, M.A.; RESTREPO, A. & HAY, R.J. **Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis.** *J. Clin. Microbiol.*, 35, 2618-2622, 1997.

- GOMEZ, F.J.; CAIN, J.A.; GIBBONS, R.; ALLENDOERFER, R. & DEEPE, G.S. **Vbeta4(+)** T cells promote clearance of infection in murine pulmonary histoplasmosis. *J. Clin. Invest.*, 102, 984-995, 1998.
- GOMEZ, F.J.; WOODWARD, E.O.; PILCHER-ROBERTS, R.; GIBBONS, R.S. & DEEPE, G.S. **Vbeta 6+ and V beta 4+ T cells exert cooperative activity in clearance of secondary infection with *Histoplasma capsulatum***. *J. Immunol.*, 166, 2855-2862, 2001.
- GONZALEZ, G.M.; FOTHERGILL, A.W.; SUTTON, D.A.; RINALDI, M.G. & LOEBENBERG, D. ***In vitro* activities of new and established triazoles against opportunistic filamentous and dimorphic fungi**. *Med. Mycol.*, 43, 281-284, 2005.
- GOODWIN, R.A. & DES PREZ, R.M. **Pathogenesis and clinical spectrum of histoplasmosis**. *South Med. J.*, 66, 13-25, 1973.
- GOODWIN, R.A. & DES PREZ, R.M. **State of the art: histoplasmosis**. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 117, 929-956, 1978.
- GOODWIN, R.A. & ALCORN, G.L. **Histoplasmosis with symptomatic lymphadenopathy**. *Chest*, 77, 213-215, 1980a.
- GOODWIN, R.A.; SHAPIRO, J.L.; THURMAN, G.H.; THURMAN, S.S. & DES PREZ, R.M. **Disseminated histoplasmosis: clinical and pathologic correlations**. *Medicine (Baltimore)*, 59, 1-33, 1980b.
- GOODWIN, R.A.; LOYD, J.E. & DES PREZ, R.M. **Histoplasmosis in normal hosts**. *Medicine (Baltimore)*, 60, 231-266, 1981.
- GRENOUILLET, F.; BOTTEREL, F.; CROUZET, J.; LAROSA, F.; HICHERI, Y.; FOREL, J.M.; HELIAS, P.; RANQUE, S. & DELHAES, L. ***Scedosporium prolificans*: an emerging pathogen in France?** *Med. Mycol.*, 47, 343-350, 2009.
- GRIMM, L.H.; KELLY, S.; KRULL, R. & HEMPEL, D.C. **Morphology and productivity of filamentous fungi**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69, 375-384, 2005.
- GUARRO, J.; KANTARCIOGLU, A.S.; HORRE, R.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; CUENCA ESTRELLA, M.; BERENQUER, J. & DE HOOG, G.S. ***Scedosporium***

- apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist.** Med. Mycol., 44, 295-327, 2006.
- GUGNANI, H.C. & MUOTOE-OKAFOR, F. (1997). **African histoplasmosis: a review.** Rev Iberoam Micol 14, 155-159.
- GUGNANI, H.C. **Histoplasmosis in Africa: a review.** Indian J. Chest. Dis. Allied. Sci., 42, 271-277, 2000.
- GUIMARAES, A.J.; PIZZINI, C.V.; DE MATOS GUEDES, H.L.; ALBUQUERQUE, P.C.; PERALTA, J.M.; HAMILTON, A.J. & ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. **ELISA for early diagnosis of histoplasmosis.** J. Med. Microbiol. 53, 509-514, 2004.
- GUIMARAES, A.J.; FRASES, S.; GOMEZ, F.J.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. & NOSANCHUK, J.D. **Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*.** Infect. Immun., 77, 1357-1367, 2009.
- HAJJEH, R.A. **Disseminated histoplasmosis in persons infected with human immunodeficiency virus.** Clin. Infect. Dis., 21 Suppl 1, S108-110, 1995.
- HALL, L.R.; DIACONU, E. & PEARLMAN, E. **A dominant role for Fc gamma receptors in antibody-dependent corneal inflammation.** J. Immunol., 167, 919-925, 2001.
- HARUN, A.; PERDOMO, H.; GILGADO, F.; CHEN, S.C.; CANO, J.; GUARRO, J. & MEYER, W. **Genotyping of *Scedosporium* species: a review of molecular approaches.** Med Mycol 47, 406-414, 2009.
- HEMPEL, H. & GOODMAN, N.L. **Rapid conversion of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* and *sporothrix schenckii* in tissue culture.** J. Clin. Microbiol., 1, 420-424, 1975.
- HENNEQUIN, C. **[Epidemiology of invasive mycoses. Experience of a university hospital center in Paris].** Rev. Med. Interne, 17, 754-760, 1996.
- HOFF, G.L. & BIGLER, W.J. **The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review.** J. Wildl. Dis., 17, 191-196, 1981.

- HOGAN, L.H. & KLEIN, B.S. **Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence.** Infect. Immun., 62, 3543-3546, 1994.
- HOHL, T.M.; VAN EPPS, H.L.; RIVERA, A.; MORGAN, L.A.; CHEN, P.L.; FELDMESSER, M. & PAMER, E.G. ***Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display.** PLoS Pathog., 1, e30, 2005.
- HOLBROOK, E.D. & RAPPLEYE, C.A. ***Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch.** Curr. Opin. Microbiol., 11, 318-324, 2008.
- HOWARD, D.H. **Intracellular Behavior of *Histoplasma Capsulatum*.** J. Bacteriol., 87, 33-38, 1964.
- ISSAKAINEN, J.; JALAVA, J.; EEROLA, E. & CAMPBELL, C.K. **Relatedness of *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and *Graphium* pro parte based on SSU rDNA sequences.** J. Med. Vet. Mycol., 35, 389-398, 1997.
- ISSAKAINEN, J.; JALAVA, J.; HYVONEN, J.; SAHLBERG, N.; PIRNES, T. & CAMPBELL, C.K. **Relationships of *Scopulariopsis* based on LSU rDNA sequences.** Med. Mycol., 41, 31-42, 2003.
- JOHNSON, P.C.; SAROSI, G.A.; SEPTIMUS, E.J. & SATTERWHITE, T.K. **Progressive disseminated histoplasmosis in patients with the acquired immune deficiency syndrome: a report of 12 cases and a literature review.** Semin. Respir. Infect., 1, 1-8, 1986.
- JOHNSON, E.M.; SZEKELY, A. & WARNOCK, D.W. ***In vitro* activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi.** J. Antimicrob. Chemother., 42, 741-745, 1998.
- KALTSEIS, J.; RAINER, J. & DE HOOG, G.S. **Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples.** Med. Mycol., 47, 398-405, 2009.
- KANAFANI, Z.A.; COMAIR, Y. & KANJ, S.S. ***Pseudallescheria boydii* cranial osteomyelitis and subdural empyema successfully treated with**

- voriconazole: a case report and literature review.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 23, 836-840, 2004.
- KANETSUNA, F.; CARBONELL, L.M.; GIL, F. & AZUMA, I. **Chemical and ultrastructural studies on the cell walls of the yeastlike and mycelial forms of *Histoplasma capsulatum*.** Mycopathol. Mycol. Appl., 54, 1-13, 1974.
- KANETSUNA, F. **Ultrastructural studies on the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*.** Sabouraudia, 19, 275-28, 1981.
- KAPOSZTA, R.; MARODI, L.; HOLLINSHEAD, M.; GORDON, S. & DA SILVA, R.P. **Rapid recruitment of late endosomes and lysosomes in mouse macrophages ingesting *Candida albicans*.** J. Cell. Sci., 112 (Pt 19), 3237-3248, 1999.
- KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M. & KOZIK, A. **Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*.** Acta Biochim. Pol., 56, 211-224, 2009.
- KASUGA, T.; WHITE, T.J.; KOENIG, G.; MCEWEN, J.; RESTREPO, A.; CASTANEDA, E.; **Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*.** Mol. Ecol., 12, 3383-3401, 2003.
- KEATH, E.J.; SPITZER, E.D.; PAINTER, A.A.; TRAVIS, S.J.; KOBAYASHI, G.S. & MEDOFF, G. **DNA probe for the identification of *Histoplasma capsulatum*.** J. Clin. Microbiol., 27, 2369-2372, 1989.
- KEDZIERSKA, A. **(1 → 3)-beta-D-glucan--a new marker for the early serodiagnosis of deep-seated fungal infections in humans.** Pol. J. Microbiol., 56, 3-9, 2007.
- KERSULYTE, D.; WOODS, J.P.; KEATH, E.J.; GOLDMAN, W.E. & BERG, D.E. **Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers.** J. Bacteriol., 174, 7075-7079, 1992.
- KIFFER-MOREIRA, T.; PINHEIRO, A.A.; PINTO, M.R.; ESTEVES, F.F.; SOUTO-PADRON, T.; BARRETO-BERGTER, E. & MEYER-FERNANDES, J.R. **Mycelial**

- forms of *Pseudallescheria boydii* present ectophosphatase activities.** Arch. Microbiol., 188, 159-166, 2007.
- KIMURA, M. & MCGINNIS, M.R. **Fontana-Masson--stained tissue from culture-proven mycoses.** Arch. Pathol. Lab. Med., 122, 1107-1111, 1998.
- KNEIPP, L.F.; RODRIGUES, M.L.; HOLLANDINO, C.; ESTEVES, F.F.; SOUTO-PADRON, T.; ALVIANO, C.S.; TRAVASSOS, L.R. & MEYER-FERNANDES, J.R. **Ectophosphatase activity in conidial forms of *Fonsecaea pedrosoi* is modulated by exogenous phosphate and influences fungal adhesion to mammalian cells.** Microbiology, 150, 3355-3362, 2004.
- KWON-CHUNG, K.J.; VARMA, A.; EDMAN, J.C. & BENNETT, J.E. **Selection of *ura5* and *ura3* mutants from the two varieties of *Cryptococcus neoformans* on 5-fluoroorotic acid medium.** J. Med. Vet. Mycol., 30, 61-69, 1992.
- LAMARIS, G.A.; CHAMILOS, G.; LEWIS, R.E. & KONTOYIANNIS, D.P. **Virulence studies of *Scedosporium* and *Fusarium* species in *Drosophila melanogaster*.** J. Infect. Dis., 196, 1860-1864, 2007.
- LAMARIS, G.A.; CHAMILOS, G.; LEWIS, R.E.; SAFDAR, A.; RAAD, I.I. & KONTOYIANNIS, D.P. ***Scedosporium* infection in a tertiary care cancer center: a review of 25 cases from 1989-2006.** Clin. Infect. Dis., 43, 1580-1584, 2006.
- LAMARIS, G.A.; LEWIS, R.E.; CHAMILOS, G.; MAY, G.S.; SAFDAR, A.; WALSH, T.J.; RAAD, I.I. & KONTOYIANNIS, D.P. **Caspofungin-mediated beta-glucan unmasking and enhancement of human polymorphonuclear neutrophil activity against *Aspergillus* and non-*Aspergillus* hyphae.** J. Infect. Dis., 198, 186-192, 2008.
- LATGÉ, J.P. **Tasting the fungal cell wall.** Cell. Microbiol. 12, 863-72, 2010.
- LENDVAI, N.; QU, X.W.; HSUEH, W. & CASADEVALL, A. **Mechanism for the isotype dependence of antibody-mediated toxicity in *Cryptococcus neoformans*-infected mice.** J. Immunol., 164, 4367-4374, 2000.
- LIMA, O.C.; FIGUEIREDO, C.C.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; MORANDI, V. & LOPES BEZERRA, L.M. **Involvement of fungal cell wall**

- components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin.** Infect. Immun., 69, 6874-6880, 2001.
- LIN, J.S.; YANG, C.W.; WANG, D.W. & WU-HSIEH, B.A. **Dendritic cells cross-present exogenous fungal antigens to stimulate a protective CD8 T cell response in infection by *Histoplasma capsulatum*.** J. Immunol., 174, 6282-6291, 2005.
- LOPES, J.D.; MOURA-CAMPOS, M.C.; VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; DE-SOUZA, W. & CAMARGO, Z.P. **Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*.** Braz. J. Med. Biol. Res., 27, 2309-2313, 1994.
- MACHADO, C.M.; MARTINS, M.A.; HEINS-VACCARI, E.M.; LACAZ CDA, S.; MACEDO, M.C.; CASTELLI, J.B.; MEDEIROS, R.S.; SILVA, R.L. & DULLEY, F.L. ***Scedosporium apiospermum* sinusitis after bone marrow transplantation: report of a case.** Ver. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 40, 321-323, 1998.
- MADESH, M. & BALASUBRAMANIAN, K.A. **Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide.** Indian J. Biochem. Biophys., 35, 184-188, 1998.
- MANAVATHU, E.K.; CUTRIGHT, J. & CHANDRASEKAR, P.H. **Comparative study of susceptibilities of germinated and ungerminated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents.** J. Clin. Microbiol., 37, 858-861, 1999.
- MANGINO, J.E. & PAPPAS, P.G. **Itraconazole for the treatment of histoplasmosis and blastomycosis.** Int. J. Antimicrob. Agents., 5, 219-225, 1995.
- MAYFIELD, J.A. & RINE, J. **The genetic basis of variation in susceptibility to infection with *Histoplasma capsulatum* in the mouse.** Genes Immun., 8, 468-474, 2007.
- MCGINNIS, M.R.; PASARELL, L.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.W.; COOPER, C.R.; & RINALDI, M.G. ***In vitro* activity of voriconazole against selected fungi.** Med. Mycol., 36, 239-242, 1998.

- MELETIADIS, J.; MEIS, J.F.; MOUTON, J.W.; RODRIQUEZ-TUDELA, J.L.; DONNELLY, J.P. & VERWEIJ, P.E. ***In vitro* activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates.** Antimicrob. Agents Chemother., 46, 62-68, 2002.
- MENGES, R.W.; L'FURCOLOW, M. & RUHE, J.S. **Experimental histoplasmosis in a dog.** Public Health Rep., 65, 628-631, 1950.
- MENGES, R.W. **Canine histoplasmosis.** J. Am. Vet. Med. Assoc., 119, 411-415, 1951.
- MENGES, R.W.; FURCOLOW, M.L.; LARSH, H.W. & HINTON, A. **Laboratory studies on histoplasmosis. I. The effect of humidity and temperature on the growth of *Histoplasma capsulatum*.** J. Infect. Dis. 90, 67-70, 1952.
- MENGES, R.W.; FURCOLOW, M.L. & HABERMANN, R.T. **An outbreak of histoplasmosis involving animals and man.** Am. J. Vet. Res., 15, 520-524, 1954a.
- MENGES, R.W.; FURCOLOW, M.L. & HINTON, A. **The role of animals in the epidemiology of histoplasmosis.** Am. J. Hyg., 59, 113-118, 1954b.
- MENGES, R.W.; MC, C.J. & AUSHERMAN, R.J. **Canine histoplasmosis and blastomycosis in Lexington, Kentucky.** J. Am. Vet. Med. Assoc., 124, 202-207, 1954c.
- MENGES, R.W. **Histoplasmin sensitivity in animals.** Cornell Vet., 44, 21-31, 1954d.
- MENGES, R.W. **Short-Tailed Shrew: New Host for *Histoplasma capsulatum*.** Vet. Med, Small, Anim, Clin., 60, 851-852, 1965.
- MENGES, R.W.; FURCOLOW, M.L.; HABERMANN, R.T. & WEEKS, R.J. **Epidemiologic studies on histoplasmosis in wildlife.** Environ. Res. 1, 129-144, 1967a.
- MENGES, R.W.; FURCOLOW, M.L.; SELBY, L.A.; HABERMANN, R.T. & SMITH, C.D. **Ecologic studies of histoplasmosis.** Am. J. Epidemiol., 85, 108-119, 1967b.
- MENGES, R.W. & HABERMANN, R.T. **Experimental avian histoplasmosis.** Am. J. Vet. Res., 16, 314-320, 1955.

- MILLER, M.A.; GREENBERGER, P.A.; AMERIAN, R.; TOOGOOD, J.H.; NOSKIN, G.A.; ROBERTS, M. & PATTERSON, R. **Allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Pseudallescheria boydii***. Am. Rev. Respir. Dis., 148, 810-812, 1993.
- MINASSIAN, B.; HUCZKO, E.; WASHO, T.; BONNER, D. & FUNG-TOMC, J. **In vitro activity of ravuconazole against Zygomycetes, *Scedosporium* and *Fusarium* isolates**. Clin. Microbiol. Infect., 9, 1250-1252, 2003.
- MOCHERLA, S. & WHEAT, L.J. **Treatment of histoplasmosis**. Semin. Respir. Infect., 16, 141-148, 2001.
- MONTEJO, M.; MUNIZ, M.L.; ZARRAGA, S.; AGUIRREBENGOA, K.; AMENABAR, J.J.; LOPEZ-SORIA, L. & GONZALEZ, R. **Case Reports. Infection due to *Scedosporium apiospermum* in renal transplant recipients: a report of two cases and literature review of central nervous system and cutaneous infections by *Pseudallescheria boydii/Sc. apiospermum***. Mycoses, 45, 418-427, 2002.
- MUKHERJEE, J.; NUSSBAUM, G.; SCHARFF, M.D. & CASADEVALL, A. **Protective and nonprotective monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* originating from one B cell**. J. Exp. Med., 181, 405-409, 1995.
- MUNIZ, M.M.; PIZZINI, C.V.; PERALTA, J.M.; REISS, E. & ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. **Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay**. J. Clin. Microbiol., 39, 4487-4494, 2001.
- NAIFF, R.D.; MOK, W.Y. & NAIFF, M.F. **Distribution of *Histoplasma capsulatum* in Amazonian wildlife**. Mycopathologia, 89, 165-168, 1985.
- NAKAJIMA, T. & BALLOU, C.E. **Characterization of the carbohydrate fragments obtained from *Saccharomyces cerevisiae* mannan by alkaline degradation**. J. Biol. Chem., 249, 7679-7684, 1974.
- NEGRONI, R.; RUBINSTEIN, P.; HERRMANN, A. & GIMENEZ, A. **Results of miconazole therapy in twenty-eight patients with paracoccidioidomycosis**

- (South American blastomycosis).** Proc. R. Soc. Med., 70 Suppl 1, 24-28, 1977.
- NESKY, M.A.; MCDUGAL, E.C. & PEACOCK JR, J.E. ***Pseudallescheria boydii* brain abscess successfully treated with voriconazole and surgical drainage: case report and literature review of central nervous system pseudallescheriasis.** Clin. Infect. Dis., 31, 673-677, 2000.
- NETEA, M.G.; FERWERDA, G.; VAN DER GRAAF, C.A.; VAN DER MEER, J.W. & KULLBERG, B.J. **Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors.** Curr. Pharm. Des., 12, 4195-4201, 2006a.
- NETEA, M.G.; GOW, N.A.; MUNRO, C.A.; BATES, S.; COLLINS, C.; FERWERDA, G.; HOBSON, R.P.; BERTRAM, G.; HUGHES, H.B.; JANSEN, T.; JACOBS, L.; BUURMAN, E.T.; GIJZEN, K.; WILLIAMS, D.L.; TORENSMA, R.; MCKINNON, A.; MACCALLUM, D.M.; ODDS, F.C.; VAN DER MEER, J.W.; BROWN, A.J. & KULLBERG, B.J. **Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors.** J. Clin. Invest., 116, 1642-1650, 2006b.
- NETEA, M.G.; VAN DER MEER, J.W. & KULLBERG, B.J. **Both TLR2 and TLR4 are involved in the recognition of *Candida albicans*. Reply to "TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae" by Gil and Gozalbo, Microbes and Infection, 8 (2006) 2823-2824. Microbes Infect., 8, 2821-2822; author reply 2823-2824, 2006c.**
- NETEA, M.G.; VAN DE VEERDONK, F.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J.W. & KULLBERG, B.J. **Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis.** FEMS Immunol. Med. Microbiol., 52, 118-123, 2008.
- NIMRICHTER, L.; CERQUEIRA, M.D.; LEITAO, E.A.; MIRANDA, K.; NAKAYASU, E.S.; ALMEIDA, S.R.; ALMEIDA, I.C.; ALVIANO, C.S.; BARRETO-BERGTER, E. & RODRIGUES, M.L. **Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides.** Infect. Immun., 73, 7860-7868, 2005.

- NOSANCHUK, J.D. & CASADEVALL, A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. *Microbiology*, 149, 1945-1951, 2003a.
- NOSANCHUK, J.D.; STEENBERGEN, J.N.; SHI, L.; DEEPE, G.S., JR; AND CASADEVALL, A. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J. Clin. Invest.*, 112, 1164-1175, 2003b.
- NOSANCHUK, J.D. & GACSER, A. *Histoplasma capsulatum* at the host-pathogen interface. *Microbes Infect.*, 10, 973-977, 2008.
- O'BRYAN, T.A.; BROWNE, F.A. & SCHONDER, J.F. *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*) endocarditis. *J. Infect.*, 44, 189-192, 2002.
- ODABASI, Z.; PAETZNICK, V.L.; RODRIGUEZ, J.R.; CHEN, E. & OSTROSKY-ZEICHNER, L. *In vitro* activity of anidulafungin against selected clinically important mold isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 1912-1915, 2004.
- PAPHITOU, N.I. & BARNETT, B.J. Solitary parietal lobe histoplasmosis mimicking a brain tumor. *Scand. J. Infect. Dis.*, 34, 229-232, 2002.
- PEREIRA, M.M.; SILVA, B.A.; PINTO, M.R.; BARRETO-BERGTER, E. & DOS SANTOS, A.L. Proteins and peptidases from conidia and mycelia of *Scedosporium apiospermum* strain HLPB. *Mycopathologia*, 167, 25-30, 2009.
- PERROTTA, D.; ABRANTES, R.; CANTEROS, C.; RODERO, L. & DAVEL, G. [Molecular characterization of autochthonous clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* using RAPD-PCR]. *Ver. Argent. Microbiol.*, 33, 160-166, 2001.
- PFALLER, M.A.; MARCO, F.; MESSER, S.A. & JONES, R.N. *In vitro* activity of two echinocandin derivatives, LY303366 and MK-0991 (L-743,792), against clinical isolates of *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, and other filamentous fungi. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 30, 251-255, 1998.
- PIHET, M.; BOURGEOIS, H.; MAZIERE, J.Y.; BERLIOZ-ARTHAUD, A.; BOUCHARA, J.P. & CHABASSE, D. Isolation of *Trichophyton concentricum* from chronic cutaneous lesions in patients from the Solomon Islands. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 102, 389-393, 2008.

- PIHET, M.; CARRERE, J.; CIMON, B.; CHABASSE, D.; DELHAES, L.; SYMOENS, F. & BOUCHARA, J.P. **Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review.** *Med. Mycol.*, 47, 387-397, 2009.
- PINTO, M.R.; MULLOY, B.; HAIDO, R.M.; TRAVASSOS, L.R. & BARRETO BERGTER, E. **A peptidorhamnomannan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potential diagnostic antigen of this emerging human pathogen.** *Microbiology*, 147, 1499-1506, 2001.
- PINTO, M.R.; RODRIGUES, M.L.; TRAVASSOS, L.R.; HAIDO, R.M.; WAIT, R. & BARRETO-BERGTER, E. **Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation.** *Glycobiology*, 12, 251-260, 2002.
- PINTO, M.R.; DE SA, A.C.; LIMONGI, C.L.; ROZENTAL, S.; SANTOS, A.L. & BARRETO-BERGTER, E. **Involvement of peptidorhamnomannan in the interaction of *Pseudallescheria boydii* and HEp2 cells.** *Microbes Infect.*, 6, 1259-1267, 2004.
- PINTO, M.R.; GORIN, P.A.; WAIT, R.; MULLOY, B. & BARRETO-BERGTER, E. **Structures of the O-linked oligosaccharides of a complex glycoconjugate from *Pseudallescheria boydii*.** *Glycobiology*, 15, 895-904, 2005.
- POCKLEY, A.G. **Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents?** *Expert Rev. Mol. Med.*, 3, 1-21, 2001.
- PONTON, J. **[The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin].** *Rev. Iberoam. Micol.*, 25, 78-82, 2008.
- POONWAN, N.; IMAI, T.; MEKHA, N.; YAZAWA, K.; MIKAMI, Y.; ANDO, A. & NAGATA, Y. **Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from clinical specimens in thailand by a PCR-based random amplified polymorphic DNA method.** *J. Clin. Microbiol.*, 36, 3073-3076, 1998.
- PORTER, B.M.; COMFORT, B.K.; MENGES, R.W.; HABERMANN, R.T. & SMITH, C.D. **Correlation of Fluorescent Antibody, Histopathology, and Culture on**

- Tissues from 372 Animals Examined for Histoplasmosis and Blastomycosis.** J. Bacteriol., 89, 748-751, 1965.
- POZA, G.; MONTOYA, J.; REDONDO, C.; RUIZ, J.; VILA, N.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; CERÓN, A. & SIMARRO, E. **Meningitis caused by *Pseudallescheria boydii* treated with voriconazole.** Clin Infect Dis 30, 981-982, 2000.
- RADFORD, S.A.; JOHNSON, E.M. & WARNOCK, D.W. ***In vitro* studies of activity of voriconazole (UK-109,496), a new triazole antifungal agent, against emerging and less-common mold pathogens.** Antimicrob. Agents Chemother., 41, 841-843, 1997.
- RAINER, J. & DE HOOG, G.S. **Molecular taxonomy and ecology of *Pseudallescheria*, *Petriella* and *Scedosporium prolificans* (Microascaceae) containing opportunistic agents on humans.** Mycol. Res., 110, 151-160, 2006.
- RAPALA-KOZIK, M., GOLDA, A. AND KUJDA, M. **Enzymes that control the thiamine diphosphate pool in plant tissues. Properties of thiamine pyrophosphokinase and thiamine-(di)phosphate phosphatase purified from *Zea mays* seedlings.** Plant Physiol. Biochem., 47, 237-242, 2009.
- REES, J.R.; PINNER, R.W.; HAJJEH, R.A.; BRANDT, M.E. & REINGOLD, A.L. **The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay area, 1992-1993: results of population-based laboratory active surveillance.** Clin. Infect. Dis., 27, 1138-1147, 1998.
- REID, T.M. & SCHAFFER, M.P. **Direct detection of *Histoplasma capsulatum* in soil suspensions by two-stage PCR.** Mol. Cell Probes, 13, 269-273, 1999.
- REISS, E.; HEARN, V.M.; POULAIN, D. & SHEPHERD, M.G. **Structure and function of the fungal cell wall.** J. Med. Vet. Mycol., 30 Suppl 1, 143-156, 1992.
- RITOSSA, F. **Discovery of the heat shock response.** Cell Stress Chaperones, 1, 97-98, 1996.
- RIVERA, J.; MUKHERJEE, J.; WEISS, L.M. & CASADEVALL, A. **Antibody efficacy in murine pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection: a role for nitric oxide.** J. Immunol., 168, 3419-3427, 2002.

- RODRIGUES, M.L.; TRAVASSOS, L.R.; MIRANDA, K.R.; FRANZEN, A.J.; ROZENTAL, S.; DE SOUZA, W.; ALVIANO, C.S. & BARRETO-BERGTER, E. **Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth.** Infect. Immun., 68, 7049-7060, 2000.
- ROILIDES, E.; SIMITSOPOULOU, M.; KATRAGKOU, A. & WALSH, T.J. **Host immune response against *Scedosporium* species.** Med. Mycol., 47, 433-440, 2009.
- ROSSI, G.R.; CERVI, L.A.; GARCIA, M.M.; CHIAPELLO, L.S.; SASTRE, D.A. & MASI, D.T. **Involvement of nitric oxide in protecting mechanism during experimental cryptococcosis.** Clin. Immunol., 90, 256-265, 1999.
- RUBIN, H.; FURCOLOW, M.L.; YATES, J.L. & BRASHER, C.A. **The course and prognosis of histoplasmosis.** Am. J. Med., 27, 278-288, 1959.
- RUCHEL, R. & WILICHOWSKI, E.. **Cerebral *Pseudallescheria* mycosis after near-drowning.** Mycoses, 38, 473-475, 1995.
- RUIZ-HERRERA, J.; ELORZA, M.V.; VALENTIN, E. & SENTANDREU, R. **Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity.** FEMS Yeast Res., 6, 14-29, 2006a.
- RUIZ-HERRERA, J.; XOCONOSTLE-CAZARES, B.; REYNAGA-PENA, C.G.; LEON-RAMIREZ, C. & CARABEZ-TREJO, A. **Immunolocalization of chitin synthases in the phytopathogenic dimorphic fungus *Ustilago maydis*.** FEMS Yeast Res., 6, 999-1009, 2006b.
- SAFDAR, A.; PAPADOPOULOS, E.B. & YOUNG, J.W. **Breakthrough *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*) brain abscess during therapy for invasive pulmonary aspergillosis following high-risk allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Scedosporiasis and recent advances in antifungal therapy.** Transpl. Infect. Dis., 4, 212-217, 2002.
- SAN-BLAS, G. & VERNET, D. **Induction of the synthesis of cell wall alpha-1,3-glucan in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum.** Infect. Immun., 15, 897-902, 1977.

- SANO, A. & MIYAJI, M. [**Canine histoplasmosis in Japan**]. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi, 44, 239-243, 2003.
- SANTOS, A.L.; BITTENCOURT, V.C.; PINTO, M.R.; SILVA, B.A. & BARRETO-BERGTER, E. **Biochemical characterization of potential virulence markers in the human fungal pathogen *Pseudallescheria boydii***. Med. Mycol., 47, 375-386, 2009.
- SAROSI, G.A. & DAVIES, S.F. **Blastomycosis**. Compr. Ther., 12, 31-37, 1986a.
- SAROSI, G.A.; DAVIES, S.F. & PHILLIPS, J.R. **Self-limited blastomycosis: a report of 39 cases**. Semin. Respir. Infect., 1, 40-44, 1986b.
- SAVOY, A.C.; LUPAN, D.M.; MANALO, P.B.; ROBERTS, J.S.; SCHLAGETER, A.M.; WEINHOLD, L.C. & KOZEL, T.R. **Acute lethal toxicity following passive immunization for treatment of murine cryptococcosis**. Infect. Immun., 65, 1800-1807, 1997.
- SCHNUR, R.A. & NEWMAN, S.L. **The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils. Evidence for intracellular trapping of superoxide anion**. J. Immunol., 144, 4765-4772, 1990.
- SELIM, S.A.; SOLIMAN, R.; OSMAN, K.; PADHYE, A.A. & AJELLO, L. **Studies on histoplasmosis farciminosi (epizootic lymphangitis) in Egypt. Isolation of *Histoplasma farciminosum* from cases of histoplasmosis farciminosi in horses and its morphological characteristics**. Eur. J. Epidemiol., 1, 84-89, 1985.
- SEVERO, L.C.; OLIVEIRA F DE, M. & LONDERO, A.T. **Subcutaneous scedosporiosis. Report of two cases and review of the literature**. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 39, 227-230, 1997.
- SEVERO, L.C.; PORTO N DA, S. & LONDERO, A.T. **Pulmonary scedosporiosis**. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 40, 241-243, 1998.
- SEVERO, L.C.; OLIVEIRA F DE, M. & IRION, K. **Respiratory tract intracavitary colonization due to *Scedosporium apiospermum*: report of four cases**. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 46, 43-46, 2004.

- SHI, L.; ALBUQUERQUE, P.C.; LAZAR-MOLNAR, E.; WANG, X.; SANTAMBROGIO, L.; GACSER, A. & NOSANCHUK, J.D. **A monoclonal antibody to *Histoplasma capsulatum* alters the intracellular fate of the fungus in murine macrophages.** Eukaryot. Cell., 7, 1109-1117, 2008.
- SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; BORGES-MALTA, M.E.; LEITE-MAFFEI, C.M. & RAMIREZ, L.E. ***Histoplasma capsulatum* isolated from *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) in the State of Minas Gerais, Brazil.** Ver. Iberoam. Micol., 18, 180-182, 2001.
- SILVA, B.A.; SOUZA-GONCALVES, A.L.; PINTO, M.R.; BARRETO-BERGTER, E. & SANTOS, A.L. **Metallopeptidase inhibitors arrest vital biological processes in the fungal pathogen *Scedosporium apiospermum*.** Mycoses, In press, 2009.
- SMITS, G.J.; KAPTEYN, J.C.; VAN DEN ENDE, H. & KLIS, F.M. **Cell wall dynamics in yeast.** Curr. Opin. Microbiol., 2, 348-352, 1999.
- SPITZER, E.D.; LASKER, B.A.; TRAVIS, S.J.; KOBAYASHI, G.S. & MEDOFF, G. **Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*.** Infect. Immun., 57, 1409-1412, 1989.
- STEINBACH, W.J. & PERFECT, J.R. ***Scedosporium* species infections and treatments.** J. Chemother., 15 Suppl 2, 16-27, 2003a.
- STEINBACH, W.J.; SCHELL, W.A.; MILLER, J.L. & PERFECT, J.R. ***Scedosporium prolificans* osteomyelitis in an immunocompetent child treated with voriconazole and caspofungin, as well as locally applied polyhexamethylene biguanide.** J. Clin. Microbiol., 41, 3981-3985, 2003b.
- SZANISZLO, P.J.; KANG, M.S. & CABIB, E. **Stimulation of beta(1-3)glucan synthetase of various fungi by nucleoside triphosphates: generalized regulatory mechanism for cell wall biosynthesis.** J. Bacteriol., 161, 1188-1194, 1985.
- TABORDA, C.P. & CASADEVALL, A. **Immunoglobulin M efficacy against *Cryptococcus neoformans*: mechanism, dose dependence, and prozone-**

- like effects in passive protection experiments.** J. Immunol., 166, 2100-2107, 2001.
- TAVARES, P.M.; THEVISSSEN, K.; CAMMUE, B.P.; FRANCOIS, I.E.; BARRETO-BERGTER, E.; TABORDA, C.P.; MARQUES, A.F.; RODRIGUES, M.L. & NIMRICHTER, L. ***In vitro* activity of the antifungal plant defensin RsAFP2 against *Candida* isolates and its *in vivo* efficacy in prophylactic murine models of candidiasis.** Antimicrob. Agents. Chemother., 52, 4522-4525, 2008.
- TAYLOR, R.L. & SHACKLETTE, M.H. **Naturally acquired histoplasmosis in the mammals of the Panama Canal Zone.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 11, 796-799, 1962.
- TEITELBAUM, R.; GLATMAN-FREEDMAN, A.; CHEN, B.; ROBBINS, J.B.; UNANUE, E.; CASADEVALL, A. & BLOOM, B.R. **A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 15688-15693, 1998.
- THIAGALINGAM, S.; FERNANDO, G.T.; TAN, K.; O'DONNELL, B.A.; WEEKS, K. & BRANLEY, M. **Orbital apex syndrome secondary to *Pseudallescheria boydii* fungal sinusitis in an immunocompetent patient.** Clin. Experiment. Ophthalmol., 32, 545-547, 2004.
- THORNTON, C.R. **Tracking the emerging human pathogen *Pseudallescheria boydii* by using highly specific monoclonal antibodies.** Clin. Vaccine Immunol., 16, 756-764, 2009.
- TISSIERES, A.; MITCHELL, H.K. & RACY, U.M. **Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs.** J. Mol. Biol., 84, 389-398, 1974.
- TRAVIS, L.B.; ROBERTS, G.D. & WILSON, W.R. **Clinical significance of *Pseudallescheria boydii*: a review of 10 years' experience.** Mayo Clin. Proc., 60, 531-537, 1985
- UCHIDA, K.; NISHIYAMA, Y.; YOKOTA, N. & YAMAGUCHI, H. ***In vitro* antifungal activity of a novel lipopeptide antifungal agent, FK463, against various fungal pathogens.** J. Antibiot. (Tokyo), 53, 1175-1181, 2000.

- UEDA, Y.; SANO, A.; TAMURA, M.; INOMATA, T.; KAMEI, K.; YOKOYAMA, K.; KISHI, F.; ITO, J.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M. & NISHIMURA, K. **Diagnosis of histoplasmosis by detection of the internal transcribed spacer region of fungal rRNA gene from a paraffin-embedded skin sample from a dog in Japan.** Vet. Microbiol., 94, 219-224, 2003.
- VAN BURIK, J.A. & MAGEE, P.T. **Aspects of fungal pathogenesis in humans.** Annual Rev. Microbiol., 55, 743-772, 2001.
- VAN DE VEERDONK, F.L.; KULLBERG, B.J.; VAN DER MEER, J.W.; GOW, N.A. & NETEA, M.G. **Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens.** Curr. Opin. Microbiol., 11, 305-312, 2008a.
- VAN DE VEERDONK, F.L.; NETEA, M.G.; JANSEN, T.J.; JACOBS, L.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J.W. & KULLBERG, B.J. **Redundant role of TLR9 for anti-*Candida* host defense.** Immunobiology, 213, 613-620, 2008b.
- VEGA, W.; ALMEIDA, R.; MINO, G.; GENE, J. & GUARRO, J. **A quick and cost-effective method for diagnosing disseminated histoplasmosis in children.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 57, 405-408, 2007.
- VINCENT, R.D.; GOEWERT, R.; GOLDMAN, W.E.; KOBAYASHI, G.S.; LAMBOWITZ, A.M. & MEDOFF, G. **Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms.** J. Bacteriol., 165, 813-818, 1986.
- WALSH, T.J.; PETER, J.; MCGOUGH, D.A.; FOTHERGILL, A.W.; RINALDI, M.G. & PIZZO, P.A. **Activities of amphotericin B and antifungal azoles alone and in combination against *Pseudallescheria boydii*.** Antimicrob. Agents Chemother., 39, 1361-1364, 1995.
- WALSH, T.J. & GROLL, A.H. **Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century.** Transpl. Infect. Dis., 1, 247-261, 1999.
- WARRIS, A.; NETEA, M.G.; VERWEIJ, P.E.; GAUSTAD, P.; KULLBERG, B.J.; WEEMAES, C.M. & ABRAHAMSEN, T.G. **Cytokine responses and regulation of interferon-gamma release by human mononuclear cells to *Aspergillus fumigatus* and other filamentous fungi.** Med. Mycol., 43, 613-621, 2005.

- WASYLNKA, J.A. & MOORE, M.M. ***Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells.** J. Cell. Sci., 116, 1579-1587, 2003.
- WEISER, M.R.; WILLIAMS, J.P.; MOORE, F.D.; KOBZIK, L.; MA, M.; HECHTMAN, H.B. & CARROLL, M.C. **Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement.** J. Exp. Med., 183, 2343-2348, 1996.
- WHEAT, L.J. & SMALL, C.B. **Disseminated histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome.** Arch. Intern. Med., 144, 2147-2149, 1984.
- WHEAT, L.J.; SLAMA, T.G. & ZECKEL, M.L. **Histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome.** Am. J. Med., 78, 203-210, 1985.
- WHEAT, L.J.; CLOUD, G.; JOHNSON, P.C.; CONNOLLY, P.; GOLDMAN, M.; LE MONTE, A.; FULLER, D.E.; DAVIS, T.E.; HAFNER, R; AIDS CLINICAL TRIALS GROUP; MYCOSES STUDY GROUP OF NIAID. **Clearance of fungal burden during treatment of disseminated histoplasmosis with liposomal amphotericin B versus itraconazole.** Antimicrob. Agents Chemother., 45, 2354-2357, 2001a.
- WHEAT, L.J.; CONNOLLY, P.; SMEDEMA, M.; BRIZENDINE, E. & HAFNER, R. **Emergence of resistance to fluconazole as a cause of failure during treatment of histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency disease syndrome.** Clin. Infect. Dis., 33, 1910-1913, 2001b.
- WHEAT, L.J.; FREIFELD, A.G.; KLEIMAN, M.B.; BADDLEY, J.W.; MCKINSEY, D.S.; LOYD, J.E. & KAUFFMAN, C.A. **Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America.** Clin. Infect. Dis., 45, 807-825, 2007.
- WILLIAMSON, E.C., SPEERS, D., ARTHUR, I.H., HARNETT, G., RYAN, G. AND INGLIS, T.J. **Molecular epidemiology of *Scedosporium apiospermum* infection determined by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences in patients with chronic lung disease.** J. Clin. Microbiol., 39, 47-50, 2001.

- WILLINGER, B.; OBRADOVIC, A.; SELITSCH, B.; BECK-MANNAGETTA, J.; BUZINA, W.; BRAUN, H.; APFALTER, P.; HIRSCHL, A.M.; MAKRISTATHIS, A. & ROTTER M. **Detection and identification of fungi from fungus balls of the maxillary sinus by molecular techniques.** J. Clin. Microbiol., 41, 581-585, 2003.
- WINGARD, J.R. **Fungal infections after bone marrow transplant.** Biol Blood Marrow Transplant, 5, 55-68, 1999a.
- WINGARD, J.R. **Opportunistic infections after blood and marrow transplantation.** Transpl. Infect. Dis., 1, 3-20, 1999b.
- WINN, R.M.; GIL-LAMAIGNERE, C.; ROILIDES, E.; SIMITSOPOULOU, M.; LYMAN, C.A.; MALOUKOU, A. & WALSH, T.J. **Selective effects of interleukin (IL)-15 on antifungal activity and IL-8 release by polymorphonuclear leukocytes in response to hyphae of *Aspergillus* species.** J. Infect. Dis., 188, 585-590, 2003.
- WINN, R.M.; GIL-LAMAIGNERE, C.; ROILIDES, E.; SIMITSOPOULOU, M.; LYMAN, C.A.; MALOUKOU, A. & WALSH, T.J. **Effects of interleukin-15 on antifungal responses of human polymorphonuclear leukocytes against *Fusarium* spp. and *Scedosporium* spp.** Cytokine, 31, 1-8, 2005.
- YUSTES, C. & GUARRO, J. ***In vitro* synergistic interaction between amphotericin B and micafungin against *Scedosporium* spp.** Antimicrob. Agents Chemother., 49, 3498-3500, 2005.
- ZERBE, C.S. & HOLLAND, S.M. **Disseminated histoplasmosis in persons with interferon-gamma receptor 1 deficiency.** Clin. Infect. Dis., 41, e38-41, 2005.
- ZOUHAIR, R.; DEFONTAINE, A.; OLLIVIER, C.; CIMON, B.; SYMOENS, F.; HALLE, J.N.; DEUNFF, J. & BOUCHARA, J.P. **Typing of *Scedosporium apiospermum* by multilocus enzyme electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA.** J. Med. Microbiol., 50, 925-932, 2001.

8. Anexos

Trabalhos científicos relacionados à tese de Doutorado (aceitos e/ou submetidos):

1. A *Histoplasma capsulatum* specific IgG1 isotope monoclonal antibody, H1C, to a 70 kDa cell surface protein is not protective in murine histoplasmosis. **Livia Cristina Liporagi Lopes**, Allan J. Guimarães, Beatriz L. Gómez, and Joshua D. Nosanchuk – **Aceito pela Clinical Vaccine Immunology**

2. Monoclonal Antibodies Against Peptidorhamnomannans of *Scedosporium apiospermum* Enhance the Pathogenicity of the Fungus. **Livia Cristina Liporagi Lopes**, Rodrigo Rollin-Pinheiro, Allan J. Guimarães, Vera Carolina Bordallo Bittencourt, Luiz Martinez, Wade Kroba, Sandra Estraluzas Faria, Joshua D. Nosanchuk, and Eliana Barreto-Bergter – **Submetido para Plos Neglected Tropical Diseases**

Trabalhos científicos desenvolvidos durante o Doutorado, não relacionados à Tese:

1. " β -Galactofuranose-containing structures present in the cell wall of the saprophytic fungus *Cladosporium (Hormoconis) resinae*". Renata O.R. Calixto, Bianca Braz Mattos, Vera Carolina Bordallo Bittencourt, **Livia Cristina Liporagi Lopes**, Lauro M Souza, Guilherme L. Sasaki, Thales R Cipriani, Maria Helena da Silva, Eliana Barreto-Bergter – **Aceito pela Research in Microbiology**

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)