



## Differential *PbP27* expression in the yeast and mycelial forms of the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex

S. García Blanco<sup>a</sup>, J.F. Muñoz<sup>b,c</sup>, I. Torres<sup>b,c</sup>, S. Díez Posada<sup>d</sup>, B.L. Gómez<sup>e,g</sup>, J.G. McEwen<sup>b,f</sup>, S. Restrepo<sup>a</sup>, A.M. García<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Micología y Fitopatología, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá D.C., Colombia

<sup>b</sup>Unidad de Biología Celular y Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia

<sup>c</sup>Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>d</sup>St. John's Institute of Dermatology, Guy's and St. Thomas' Hospital, King's College, London University, London, United Kingdom

<sup>e</sup>Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia

<sup>f</sup>Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>g</sup>Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 February 2011

Accepted 10 September 2011

Available online 16 September 2011

#### Keywords:

*Paracoccidioides brasiliensis*

p27 antigen

Paracoccidioidomycosis

Dimorphism

qPCR

Western blot

Dot blot

### ABSTRACT

p27 is an antigenic protein produced by *Paracoccidioides brasiliensis*, the etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM). Despite its unknown function, it has been suggested as a putative virulence factor, proposed as a suitable target for the design of diagnostic tools and vaccines, and considered as an enhancer in antifungal treatment of PCM. We evaluated sequence polymorphisms of *PbP27* gene sequence among isolates, finding some polymorphisms associated with the isolates' phylogenetic origin. In order to determine if there was a differential expression pattern between morphological states and among isolates, we also evaluated *PbP27* expression, at transcriptional and translational levels, in mycelia and yeast cultures in 14 isolates belonging to the *P. brasiliensis* species complex (S1, PS2, PS3, and "Pb01-like", proposed to be named *Paracoccidioides lutzii*) by two techniques, real time RT-PCR (RT-qPCR) and protein dot blot. For the latter, four protein extracts from different cell localizations (SDS or β-mercaptoethanol, cytoplasmic and extracellular proteins) were analyzed for each isolate. p27 was present in the four extracts evaluated, mainly in the SDS extract, corresponding to an extract containing proteins loosely attached to the cell wall. This information correlates with immunohistochemical analysis, where positive staining of the yeasts' cell wall was observed. We found that p27 was present in all isolates, mainly in the yeast form. This pattern was corroborated by RT-qPCR results, with higher expression levels found in the yeast form for most of the isolates. The results provide new insights into the expression patterns of this protein, and further characterize it in view of potential uses as a diagnostic and/or therapeutic tool.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is one of the most important systemic mycoses in Latin America, with a restricted geographic distribution ranging from Mexico to Argentina, excluding some countries as Nicaragua, Chile, Guyana and the Caribbean islands (Brummer et al., 1993; Restrepo et al., 2001). Usually this infection is asymptomatic, affecting males and females at the same rate (Brummer et al., 1993). However, the clinical form is in 90% of the cases a chronic disease with higher incidence in males, characterized by primary lung compromise that can disseminate to mucosae, skin and other organs. The remaining 10% of the cases, usually described in children and young persons, are characterized by an acute/subacute form with compromise of the reticuloendothelial system

(Borges-Walmsley et al., 2002). In absence of treatment, this disease is mostly fatal (Borges-Walmsley et al., 2002; Brummer et al., 1993).

The etiologic agent of this mycosis is *Paracoccidioides brasiliensis* sensu lato (s.l.), a dimorphic fungal pathogen that grows as a mold at temperatures below 26 °C, whereas at temperatures between 35 °C and 37 °C it grows as multibudding yeasts, the pathogenic form of this fungus (Borges-Walmsley et al., 2002). High phenotypic diversity among *P. brasiliensis* s.l. isolates has been reported in morphology, rate of growth, and virulence (Borba Cde et al., 2008; Burger et al., 1996; Carvalho et al., 2005; Molinari-Madlum et al., 1999), and recent phylogenetic studies have revealed that this species actually contains at least four cryptic phylogenetic species: two paraphyletic species (S1 [Species 1] and PS2 [Phylogenetic Species 2]), and two monophyletic species (PS3 [Phylogenetic Species 3] and the "Pb01-like" species for which the name *Paracoccidioides lutzii* sp. nov. has been proposed) (Matute et al., 2006; Teixeira et al., 2009).

\* Corresponding author. Address: Corporación para Investigaciones Biológicas, Carrera 72 A No. 78 B 141, Medellín 050034, Colombia. Fax: +57 4 4415514.

E-mail address: [agarcia@cib.org.co](mailto:agarcia@cib.org.co) (A.M. García).

A number of studies in *P. brasiliensis* s.l. have focused on the identification of specific antigenic proteins that can be used for the serological diagnosis of PCM, for follow up of patients in response to therapy, and for possible development of immunization alternatives. In this way, the immunodominant antigen gp43, the first one described (Puccia et al., 1986), has been found useful for diagnosis (Puccia and Travassos, 1991) and to protect against experimental infection in mice (Marques et al., 2006; Pinto et al., 2000; Taborda et al., 1998). Other antigens also assayed for diagnosis, follow up of patients and/or immunization include gp70 antigen (da Silva et al., 2004; de Mattos Grosso et al., 2003) and the heat shock protein 87-kDa antigen (Díez, 2004; Gomez et al., 1998, 1997).

Another such antigen is a 27-kDa protein (p27), obtained from a *P. brasiliensis* cDNA library (McEwen et al., 1996), with potential use for diagnosis due to a high sensitivity and specificity shown (Díez et al., 2003; Fernandes et al., 2011a; Ortiz et al., 1998, 1996). In addition, it has been shown to promote protective immunity in BALB/c mice against infection with *P. brasiliensis* yeast forms (Fernandes et al., 2011b; Reis et al., 2008), enhancing the PCM antifungal therapy (Fernandes et al., 2011b), and has been suggested as a putative virulence factor (Matute et al., 2008; Ortiz et al., 1996; Reis et al., 2008). Nonetheless, the function of this protein remains unknown.

A common approach for recognizing putative virulence factors in dimorphic fungi is to establish a correlation between increased protein expression and the pathogenic form of the fungus (Rapple and Goldman, 2006), since it has been shown that the dimorphic ability of these fungi is crucial for their pathogenicity (Nunes et al., 2005; Rapple and Goldman, 2006), and that those isolates unable to transform into yeast are not virulent (Borges-Walmsley et al., 2002). In this study, *PbP27* expression was examined at the transcriptional and translational levels in the mycelia and yeast forms of different isolates of the species complex of *P. brasiliensis* in order to detect potential differential expression patterns. We also characterized the nucleotide polymorphisms among different isolates.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains and culture conditions

Fourteen isolates belonging to the four cryptic phylogenetic species previously described (S1, PS2, PS3, and “*Pb01-like*” cluster) (Matute et al., 2006; Teixeira et al., 2009) were included in this study (Table 1). For maintenance, the mycelial form was grown

in the modified synthetic McVeigh and Morton medium (Restrepo and Jimenez, 1980) at room temperature (18–23 °C). To obtain the yeast form, mycelia was grown in anaerobic conditions in Sabouraud agar supplemented with 0.2% asparagine and 1% thiamine at 37 °C and subcultured every 4–5 days until a complete reversion was observed. For experiments, all isolates were cultured in Brain Heart Infusion broth supplemented with 0.2% asparagine and 1% glucose, and incubated in constant agitation at 20 °C for 8–10 days and at 37 °C for 4–6 days, for mycelial and yeast forms respectively. Two independent cultures were grown for each form of each isolate in study. Aliquots of each culture were used for RNA, DNA and protein isolation.

### 2.2. Nucleic acids isolation

RNA isolation was performed as previously described (Garcia et al., 2010). Briefly, cells were harvested, disrupted by grinding in liquid nitrogen and mixed with Qiazol reagent (Qiagen, Duesseldorf, Germany) for RNA extraction according to the supplier's instructions. In order to verify the RNA integrity, samples were electrophoresed in 1.2% denaturing formaldehyde agarose gels and visualized with UV light. The presence of intact 28S and 18S rRNA bands was used as a criterion to verify that there was no significant degradation.

DNA was removed by Amplification Grade DNase I treatment (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's procedure. The absence of DNA contamination after the RNase-free DNase treatment was verified by PCR amplification of the  $\beta$ -tubulin gene using oligonucleotides BTubE2F: 5'-AGATGTTTC GATCCTAAGAACATGA-3' and BTubE2R: 5'-ATAGCTGAGCAGGTAA GGTAAACG-3'.

For DNA preparation, cells were mixed with lysis buffer (1 mM EDTA, 10 mM TrisHCl [pH 8.0], 1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 2% Triton X100, 100 mM NaCl) and disrupted using glass beads or maceration of frozen cells for yeast and mycelia respectively (Morais et al., 2000; van Burik et al., 1998). Extraction was carried out with phenol chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) as previously described (Sambrook and Russell, 2001). RNA was removed by RNase I treatment at 37 °C for 30 min. DNA integrity was examined by electrophoresis on 1% agarose gels.

RNA and DNA quantification and additional quality evaluation were carried out using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA).

### 2.3. PCR conditions and sequencing

The sequence of the *PbP27* gene from the Pb18 isolate, obtained from the Broad Institute *P. brasiliensis* Database (Locus PABG\_07332.1), was used to design the following primers for DNA sequencing: P27F, 5'-GACGAGCTGAAACTGTTGT-3' and P27R, 5'-CTAGTTGTGGAAGACAGCG-3'. Amplification reactions were composed of 1x Taq Buffer (100 mM Tris–HCl pH 8.5; 500 mM KCl and 1% (v/v) Triton X-100) (Tucantag, Corpogen, Bogotá, Colombia), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.25  $\mu$ M of each primer, 1 U of Taq Polymerase (Tucantag DNA Polimerasa, Corpogen, Bogotá, Colombia) and 0.4  $\mu$ g of DNA. A reaction without DNA was included as a negative control to rule out possible contamination. PCR amplifications were performed on a MyCycler IQ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with an initial denaturing cycle at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C (30 s), 58 °C (30 s) and 72 °C (30 s), with a final cycle at 72 °C for 5 min. PCR products were electrophoresed on 1% agarose gels visualized by staining with ethidium bromide and sequenced using the BigDye™ Terminator sequencing chemistry on an ABI 3730XL DNA sequencer (Applied Biosystems). Sequence assembly and editing was performed manually on CLC Genomics Workbench (<http://www.clcbio.com>).

**Table 1**  
Isolates evaluated in this study.

Isolate <sup>a</sup>	Country	Source	Species
A1 (A1)	Argentina	Acute PCM	S1
Pb339 (B18)	Brazil	Chronic PCM	S1
T4B14 (B3)	Brazil	Armadoillo	S1
Pb18 (B17)	Brazil	Chronic PCM	S1
T15LN1 (B10)	Brazil	Armadoillo	S1
BT84 (B15)	Brazil	PCM	PS2
T10B1 (B7)	Brazil	Armadoillo	PS2
Uberlandia (B13)	Brazil	Dog Food	PS2
Pb2 (V2)	Venezuela	Chronic PCM	PS2
ATCC 76533 (C13)	Colombia	Chronic PCM	PS3
ATCC 60855 (C4)	Colombia	Chronic PCM	PS3
P204 (C7)	Colombia	Chronic PCM	PS3
P206 (C17)	Colombia	Chronic PCM	PS3
Pb01 (–)	Brazil	Acute PCM	“Pb01-like”

<sup>a</sup> Isolates were provided by the Corporación para Investigaciones Biológicas – CIB collection. Name in brackets is according to the nomenclature given by Matute et al. (2006).

Sequences are available on request. Base substitutions were confirmed by sequencing both strands. Sequence alignments were performed using MUSCLE software (Edgar, 2004).

#### 2.4. cDNA synthesis and real time PCR (RT-PCR)

Equal amounts of DNA-free total RNA (0.3 µg) of each sample and its duplicate were reverse transcribed using the SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with oligo(dT) primers. Real time PCR amplification assays were carried out with an iQ™5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in 25 µl reactions containing 0.25 µM of each primer, 1X iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and 2 µl of cDNA. Each sample was assayed in triplicate. The thermocycling conditions comprised an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 30 s, 56.5 °C for 30 s and 72 °C for 45 s. Finally, to verify the specificity of the reaction, a melting curve analysis was performed by monitoring the decrease in fluorescence as the amplification products were heated from 55 °C to 95 °C at 0.5 °C/10 s.

Relative quantification was performed using the method described by Muller and coworkers (Muller et al., 2002) to evaluate *Pbp27* gene expression, with  $\beta$ -tubulin being used as the normalizer gene (Goldman et al., 2003). This method takes the different efficiencies of PCR amplification for the target (*Pbp27*) and the reference ( $\beta$ -tubulin) into consideration and transforms the logarithmic scaled raw data unit Cycle Threshold (Ct, which is the number of cycles required to detect a fluorescence signal over a settled threshold) into the linear unit of normalized expressions (Simon, 2003). Primers used were BTubE2F (5'-AGATGTTTCGATCCTAAGAACATGA-3') and BTubE2R (5'-ATAGCTGAGCAGGTAAGGTAACG-3') for normalizer amplification, and P27-RT F (5'-CCTCGTGATCCATGTTGACCA-3') and P27-RT R (5'-TGTGCCCAAATGGCTGACT-3') for target gene. For the latter, primers were corroborated to anneal within conserved regions of the gene, first with the gene sequences already available from isolates Pb18, Pb01, Pb3 (*P. brasiliensis* Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT <http://www.broadinstitute.org/>) and Pb339 (GenBank: U41503.1) and subsequently with the gene sequencing results for the 14 isolates in this study. For data analysis, Q-Gen software was used to calculate mean normalized expression (Simon, 2003), and a *t*-test was performed to determine if there were differences between the fungal forms, with a significance level of 95%.

#### 2.5. Preparation of proteins

Protein extracts were obtained following the method previously described (Gil et al., 1996; Gonzalez et al., 2005; Penalver et al., 1996) with some modifications. Briefly, cell cultures were centrifuged, washed with phosphate buffered saline and mixed with lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.4, containing 10% (V/V) protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)). Initial supernatant fluid, which corresponds to cell free extract, was recovered and dialyzed against distilled water at 4 °C and then concentrated by assisted evaporation to obtain the extracellular extract. Yeast cells were mechanically disrupted by shaking in a vortex mixer using glass beads, and mycelia were disrupted by maceration in liquid nitrogen (Morais et al., 2000; van Burik et al., 1998). Cell breakage was assessed by microscopic examination.

Cytoplasmic extract was obtained after sedimentation of debris containing proteins from membranes and cell walls (9200 g for 30 min at 4 °C) and recovery of the supernatant. The pellet was washed three times with chilled distilled water, resuspended in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ ME) plus protease inhibitor cocktail as described above and incubated at 37 °C for 30 min in a rotatory

shaker. Thereafter, extract containing cell walls components were sedimented and the supernatant fluid was recovered, dialyzed against chilled distilled water at 4 °C and concentrated by assisted evaporation ( $\beta$ ME extract).  $\beta$ ME-extract was washed three times with chilled distilled water, resuspended in a 2% SDS solution and boiled for 5 min. Subsequently, preparations were centrifuged at 9200 g for 15 min. Proteins present in the supernatant were precipitated with 75% (v/v) ethanol at 4 °C for 16 h, sedimented (9200 g for 35 min) and resuspended in distilled water (SDS extract) (Gil et al., 1996; Penalver et al., 1996). Total protein concentration in the different samples was determined by the method of Bradford (Bradford, 1976).

#### 2.6. SDS PAGE and Western blot analysis

Assays in 12% SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were performed as previously described (Laemmli, 1970) in a MiniProtein Tetra Cell system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using protein extract samples in concentrations from 50 to 500 ng in each line and a PageRuler Prestained Protein Ladder as molecular weight standard (Fermentas Inc., Glen Burnie, MD USA). Cytoplasm protein extract from isolate Pb339 was selected as a positive control due to its demonstrated capacity to produce antigenic proteins, especially gp43 (Camargo et al., 1998, 2003). Cytoplasmic and debris control extracts from human macrophages cell line (MH-S) and Brain Heart Infusion (BHI) broth extracts were added as negative controls. Gels were stained with Coomassie brilliant blue and duplicates were transferred to nitrocellulose membranes, using a Trans-Blot SD Semi Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's recommendations.

Thereafter, membranes were blocked with 5% skin milk plus 1% BSA in a PBS solution containing 0.05% (v/v) Tween 20 (PBST) for 2 h at room temperature, washed three times with PBST and then incubated for 1 h at room temperature with BJ4 (an anti p27 monoclonal antibody obtained by collecting supernatant from subcloned hybridomas (Díez, 2004)) diluted 1:1000 in PBST 5% skin milk plus 1% BSA. Following this, membranes were washed three times with PBST and incubated with Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-mouse IgG antibodies (1:1000 dilution in PBST 5% skin milk plus 1% BSA) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) for 1 h at room temperature. Blots were washed three times with PBST and then immersed in a fresh mixture of 4-chloro-1-naphthol (4C1N) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in ethanol; both suspensions were mixed and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added. The reaction was stopped with distilled water.

#### 2.7. Dot blot analysis

Five microliters of each protein extract at 50 ng/µl were applied to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in duplicate. Subsequent procedure was performed as described above for Western blot.

Image analysis was performed with the Gel Doc XR + 2.0.1 System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the colorimetric application with white epi illumination and a standard filter as an emission filter. To determine spots' intensities, the relative volume quantity was determined using the positive control (Pb339 cytoplasm protein extract) as the reference volume. A replicate of this experiment was done.

#### 2.8. Immunohistochemical analysis

Six skin and oral mucosa biopsy samples from 3 Colombian patients with PCM (diagnosed and confirmed by silver staining and

culture) were embedded in Optimal Cutting Temperature compound (OCT), stored in liquid nitrogen, and subsequently sectioned in a cryostat (Figocut 2700, Reichert-Jung Nussloch, Germany). Thick slices were cut and collected onto Super Frost microscope slides (Labcraft, Houston, Tx, USA) previously coated with 20  $\mu$ l of 0.1% (v/v) poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Negative controls consisting of two lung biopsies from patients with histoplasmosis and aspergillosis and two skin biopsies from healthy volunteers were also used.

For indirect immunofluorescence (modified from Van Moorden, 1986) (Van Noorden, 1986), slides were washed with PBS buffer, placed into a moist chamber and blocked with superbloc® (Pierce, Rockford, IL) for 1 h at 37 °C. Slides were washed with PBS and incubated with BJ4 monoclonal antibody for 1 h at 37 °C. For this, different dilutions of the monoclonal antibody (1:10–1:100) were used. This solution was replaced after washing with fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-mouse IgG Fc (Jackson Immuno-research Laboratories, USA) and incubated 1 h at 37 °C. After further washes with PBS, slides were mounted in a 50% (v/v) glycerol/PBS buffer and fluorescence was evaluated by fluorescence microscopy. A negative control in which primary antibody was replaced with fresh PBS was also included. Additionally, indirect immunofluorescence with P1B, a monoclonal antibody raised to detect a 87-kDa antigen (Gomez et al., 1998) was done as a control.

### 3. Results

#### 3.1. *PbP27* gene sequence analysis

As an initial step of this analysis, we compared *PbP27* gene sequences belonging to different isolates in order to evaluate polymorphisms. A 620 bp region of the *PbP27* gene was sequenced for the 14 isolates of *P. brasiliensis* and analyzed. This analysis revealed the presence of several single nucleotide polymorphisms in the region analyzed (Table 2). We found 26 nucleotide polymorphisms, resulting in 13 silent substitutions, and 13 non-synonymous substitutions. The latter were categorized according to the amino acid classification proposed by Hanada et al. (2007), leading to five conservative and eight non-conservative substitutions. We did not find any insertions or deletions.

As shown in Fig. 1 (box) and Table 2 (position 45, underlined), there is a clustering of the PS3 isolates. These isolates share a polymorphic site that is exclusive for the group, except for the Pb339 isolate, belonging to the S1 group that also showed this polymorphism. PS2 and S1 isolates grouped together in another cluster.

The sequence of this gene was highly conserved among isolates belonging to cryptic species S1, PS2 and PS3, which exhibited low variation between isolates (Fig. 1). Pb01 showed the most divergent sequence compared to the sequences from the other isolates (23 out of the 28 polymorphisms found, including all the non-synonymous substitutions) (Table 2 and Fig. 1). The *PbP27* sequence of the Pb01 isolate was compared with the available genome sequences (*P. brasiliensis* Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT <http://www.broadinstitute.org/>), corroborating the polymorphisms found.

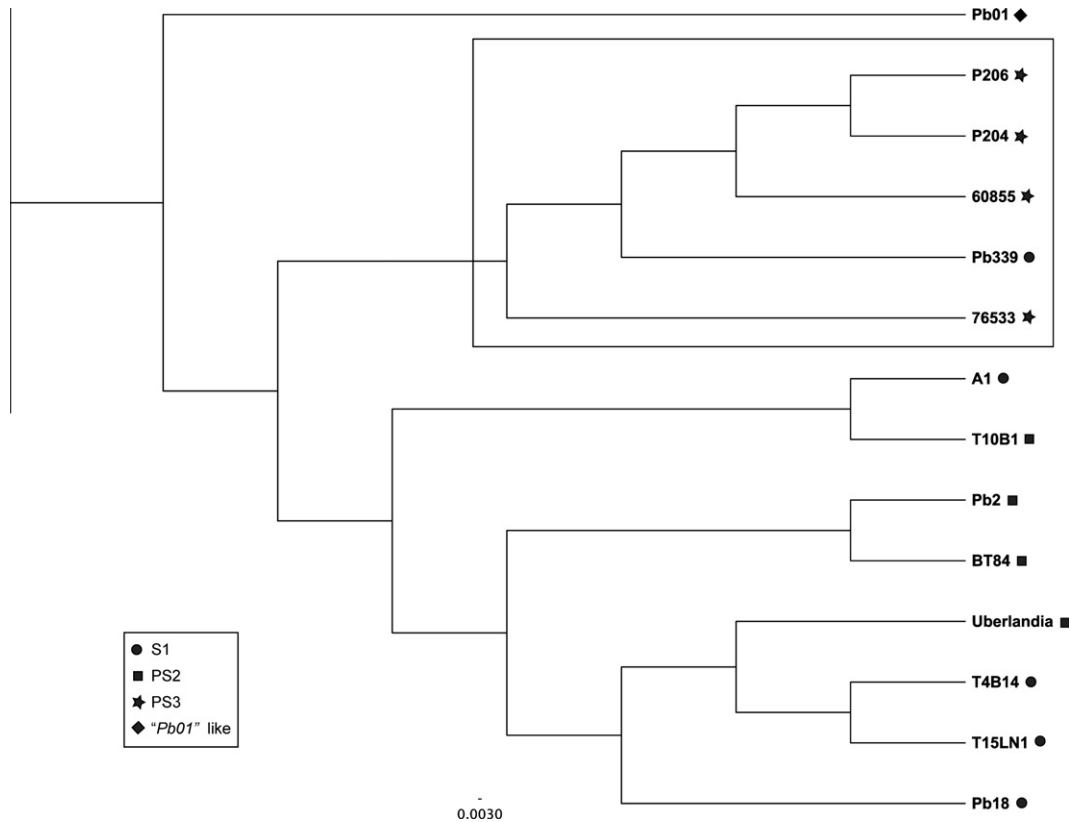
#### 3.2. Differential *p27* gene expression observed by RT-PCR

*PbP27* transcript was detected in all evaluated isolates in yeast and mycelia forms. To determine if there were differences in the *PbP27* levels between yeast and mycelia, normalized *PbP27* expression was compared between the two phases (Fig. 2). For most isolates a significant difference between the two phases ( $p < 0.05$ ) was

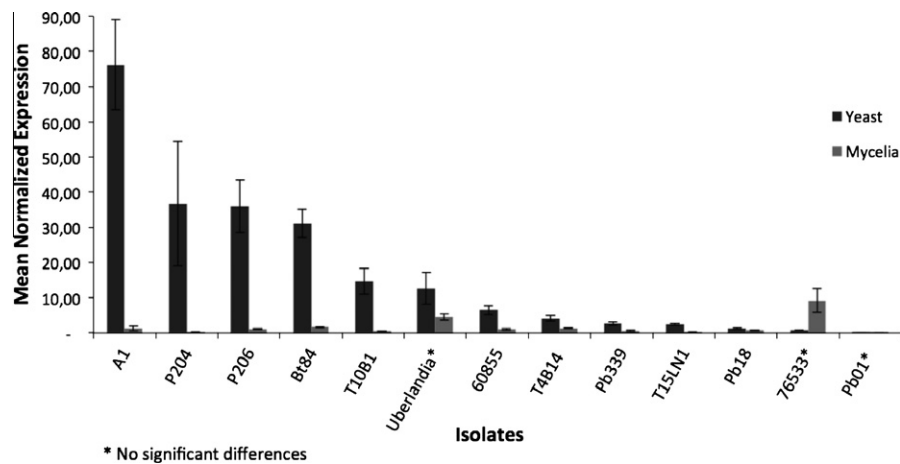
**Table 2**  
Distribution of polymorphisms on *p27* sequence. Non-synonymous polymorphisms are shown in bold and italic. Non-conservative changes are additionally underlined. Isolates T4B14, T15LN1 and Uberlandia exhibit the same sequence, shown here as the consensus sequence.

Position	16	17	24	32	44	45	50	73	96	100	106	118	120	121	124	135	136	160	180	181	183	187	206	207	208	211
Consensus	L	A	N	G	N	R	R	K	R	T	L	P	Y	D	T	Q	K	R	K	P	L	Q	S	S	A	A
76533	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T10B1	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BT84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60855	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P206	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB18	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB339	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P204	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB01	L	-	D	G	D	-	I	I	R	A	-	P	Y	N	A	Q	K	R	R	P	L	G	R	Q	S	V





**Fig. 1.** Dendrogram of the *PbP27* sequences' multiple alignment obtained with the MUSCLE software. Symbols placed next to each isolate name represent the corresponding cryptic species of *P. brasiliensis* (●: S1, ■: PS2, ★: PS3 and ♦: "Pb01-like"). Box: PS3 clustering for a particular polymorphic site. Dendrogram was generated using the Figtree tool version 1.3.1.



**Fig. 2.** Mean normalized *PbP27* expression in yeast and mycelial forms. Black bars correspond to yeast form's expression, while gray bars correspond to mycelia. \* No significant differences.

detected (Supplementary Table 1), with an up regulation in the yeast form. There were no statistically significant differences between the forms' expression for isolates Uberlandia, Pb01 and 76533.

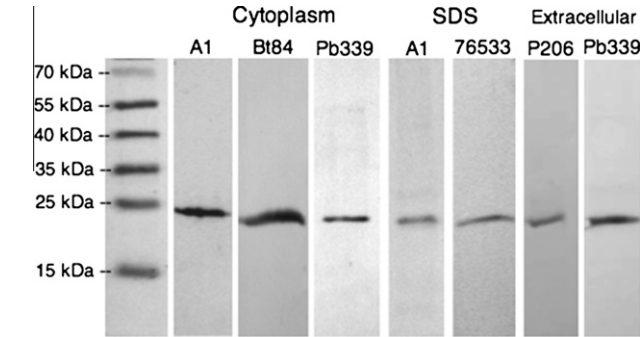
### 3.3. *p27* is present in the SDS protein extract

Evaluation of some protein extracts by Western blot with the monoclonal monospecific antibodies (BJ4) showed reactivity with a specific single band corresponding to *p27*, and did not present

cross-reactivity with other proteins in the extracts (Fig. 3). Given these results, we proceeded to evaluate quantitatively all isolates' protein samples in a dot blot assay, as this is a simple, cost-effective and straightforward technique.

As revealed by dot blot assay, the *p27* protein was primarily found in the cytoplasm and SDS extracts containing cell wall proteins. To a lesser extent, *p27* was detected in the extracellular and  $\beta$ ME extracts (Fig. 4).

Furthermore, *p27* detection was not the same for all isolates, showing different patterns in the protein extracts tested



**Fig. 3.** Examples of p27 protein detection by Western blot in extracellular, cytoplasm and SDS cell wall containing extracts for some isolates. Molecular marker: PageRuler Prestained Protein Ladder weight standards (in kDa). For A1, Bt84 and Pb339 cytoplasmic extracts the concentrations were 400 µg, 500 µg and 300 µg respectively. For A1 and 76533 SDS extracts the concentrations were 50 µg and 100 µg respectively. For P206 and Pb339 extracellular extracts the concentration was 400 µg in both cases.

(Table 3). For the SDS extract, protein p27 was more easily detected in extracts from the yeast forms than in those from the mycelial ones (Fig. 4 and Table 3).

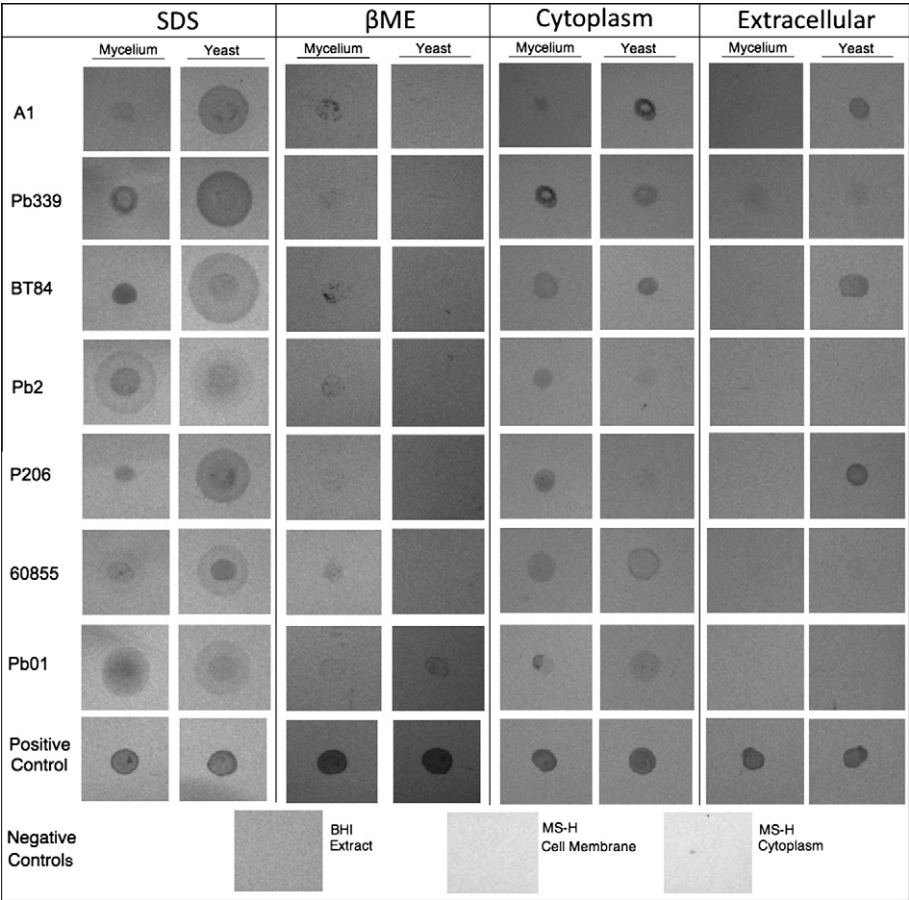
Accordingly, positive and strong staining of the cell wall for the yeast cells with scarce extracellular distribution was observed by immunofluorescence staining in material from biopsy samples (Fig. 5). The optimal dilution of the BJ4 monoclonal antibody was found to be 1:50. Negative control slides were unreactive and indirect immunofluorescence with P1B monoclonal antibodies showed

fluorescence in the cell wall together with some cytoplasmic regions of the cells with a generalized granular appearance. Also extracellular labeling was observed with this antibody (data not shown).

4. Discussion

In this study, we gathered information on expression of the *Pbp27* gene and its corresponding protein, an antigenic protein of the human pathogen *P. brasiliensis*, and evaluated sequence polymorphisms. We combined real-time RT-PCR and dot blot analysis to examine differential expression in the yeast and mycelial forms of *P. brasiliensis*. These procedures informed us at different levels about protein expression (Beyer et al., 2004). As expected, no relation was found between the gene or protein sequences’ polymorphism and expression levels. Future evaluation of the upstream DNA sequences of *Pbp27* gene for polymorphisms in the promoter sequences that could be related to differential regulation could provide valuable information to understand the variable expression level profiles observed.

We found by RT-PCR that the *Pbp27* gene is expressed in all evaluated isolates (*P. brasiliensis* s.l.), in which a general trend was the higher *Pbp27* expression in yeast cells. These findings were in concordance with the results obtained by dot blot in which p27 protein was present in all isolates, mainly detected in the SDS extract with the strongest reactivity detected in the yeast forms. No correlation between a specific cryptic species, isolate source or country of origin and a *Pbp27* expression level pattern was

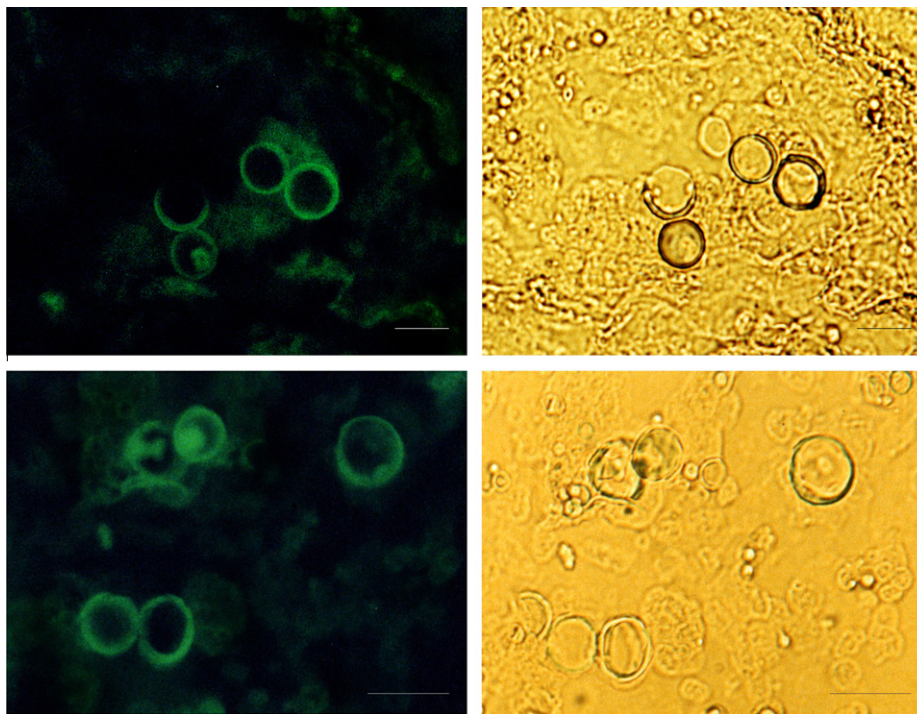


**Fig. 4.** p27 detection by dot blot assay in the four protein extracts from different *P. brasiliensis* isolates (isolate name is shown on the left). Positive control: Cytoplasmic protein extract from strain Pb339. Negative controls: Brain Heart Infusion broth, cytoplasmic and cell wall extracts from Human macrophages cell line MS-H.

**Table 3**

p27 detection in the four protein extracts of *P. brasiliensis* isolates by dot blot assay. Values for relative volume quantity were determined using the positive control (Pb339 cytoplasm protein extract) as the reference with a volume quantity value of 3.

	Cell wall SDS		Cell wall $\beta$ ME		Cytoplasmic		Extracellular	
	Yeast	Mycelia	Yeast	Mycelia	Yeast	Mycelia	Yeast	Mycelia
Pb339	2.844	0.55	0	0.278	0.483	0.18	0.11	0.258
Bt84	2.728	0.526	0	0.838	0.34	0.357	0.783	0
A1	2.097	0.724	0	0	0.915	0.064	0.674	0
P206	2.002	0.261	0	0.034	0.199	0.52	0.894	0
Pb2	1.561	1.179	0	0.485	0.199	0.291	0	0
60855	1.266	0.232	0	0.59	0.199	0.378	0	0
76533	0.919	0.617	0.103	0.33	0.273	0.287	0	0
Pb01	0.749	1.485	0.962	0.019	0.199	0.199	0	0
Pb18	0.619	0.136	0	0.468	0.236	0.072	0.428	0
T10B1	0.483	0.589	0	0	0.199	0.116	0.683	0
T15LN1	0.451	0.795	0	0	0.07	0.261	0	0
Uberlandia	0.46	0.561	0	0.69	0.475	0.087	0.355	0
P204	0.33	0.852	0.535	0.144	0	0.052	0.59641	0
T4B14	0.266	0.822	0	0.109	0	0.1644	0.348	0



**Fig. 5.** Immunofluorescence reactivity of *P. brasiliensis* using BJ4 monoclonal antibody. Yeast cell forms in biopsy material from PCM patients. Bars represent 40  $\mu$ m.

observed, although high variability of expression was seen among isolates.

Differences in antigen expression among isolates and in the same isolate cultured under the same conditions have been reported in *P. brasiliensis* (Berzaghi et al., 2005; Franco et al., 1996). Gp43, the immunodominant antigen of this fungus, has a variable secretion pattern even in clonal cultures (Berzaghi et al., 2005); the amount of gp43 accumulated in the extracellular fluids of the same isolate could also be affected by the incubation time, culture medium, fungal phases as well as multiple sub culturing and after animal passage (Rocha et al., 2009). This variability is also reported for *Candida albicans* and seems to be related to multiple environmental and organism-related factors (Berzaghi et al., 2005). Nonetheless, the mechanisms underlying this antigenic instability remain unknown and require further studies (Berzaghi et al., 2005). For p27, we would like to perform, in the future, additional experiments on p27 expression kinetics, not only in the yeast and

mycelia forms of different isolates of the described phylogenetic species but also in the conidia form and during the transition processes, in order to understand its variable expression profile. In the future, it would also be useful to evaluate all protein extracts by Western blot in order to corroborate results obtained here on protein expression differences among isolates.

The gene sequence analysis of this protein in the different isolates of *P. brasiliensis* revealed that it is a highly conserved protein, showing low levels of variation among species S1, PS2 and PS3 and a divergent sequence belonging to Pb01 isolate. To determine the levels of polymorphism among “Pb01-like” isolates more sequences are needed. However, it is known that the “Pb01-like” phylogenetic species shows high levels of genomic variation (Carrero et al., 2008; Teixeira et al., 2009). It was proposed that antigenic differences among Brazilian central-western region isolates (where Pb01-like isolates are considered to be endemic) could be associated with the phylogenetic divergence of them from most of the



*P. brasiliensis* isolates (Batista et al., 2010). Moreover, this clade tends to show different responses to the host, and exclusive phenotypic characteristics such as virulence levels, resistance to fungicides and rates of proliferation (Teixeira et al., 2009). It should be important to figure out if *PbP27* sequence differences found in Pb01 have a biological effect in this protein since this isolate, interestingly, displays the lowest *p27* expression level.

Isolate A1 was identified as a good candidate for antigen preparation. This isolate exhibited the highest *PbP27* gene expression level among the isolates tested, and *p27* protein was easily detected in protein extracts of this isolate. Isolate Pb339 has been widely used to produce antigenic preparations for PCM serological diagnosis (Berzaghi et al., 2005) and although it showed a moderate *PbP27* expression level, in the protein assay it showed an acceptable detection level.

The procedure for obtaining protein extracts described by Peñalver and coworkers and Gil and coworkers (Gil et al., 1996; Penalver et al., 1996) has been successfully used also by other authors such as Gonzalez et al. in 2005. Using this methodology and determining proteins' presence in the SDS extracts, Gonzalez et al. (2005) demonstrated the presence of two new polypeptides capable of interacting with extracellular matrix proteins on the surface of *P. brasiliensis* yeast cells. In the present study, we found a primary cytoplasmic and cell wall localization of *p27* protein consistent with previous reports (Reis et al., 2008). The protein was predominantly found in the SDS cell extract, which corresponds to proteins loosely attached to other cell wall components by non-covalent bonds (Pitarch et al., 2008). This location is expected due to the antigenic nature of *p27*. Also, immunohistochemical analysis demonstrated that *p27* is detectable in skin and oral mucosa biopsy samples containing *P. brasiliensis* yeast cells, with a limited extracellular distribution. Both dot blot and immunohistochemical analysis results confirmed *p27* as a cell wall associated protein. Indeed, cell wall proteins are a target of preference for the design of antifungal drugs and vaccines as the cell wall plays an active role in the host-pathogen interaction and has fungal specificity (Pitarch et al., 2008).

In addition, we detected the protein in the extracellular extract of some isolates, suggesting that it can be secreted. On one hand, secreted proteins pass through the cell wall, where they are transiently associated with cell wall-bound moieties and contribute to the total cell wall proteinaceous component (Chaffin et al., 1998). On the other hand, from studies developed in *Candida albicans* it is known that several cell wall proteins, not thought to be secreted, can be found in the cell cultures' supernatants, probably coming from the outer wall layers, and may be released by lysed cells or as a consequence of the processes of synthesis and degradation of the cell wall structure, required for wall expansion during cell growth (Chaffin et al., 1998), as evidenced during the early stages of cell wall regeneration in protoplasts (Pitarch et al., 2006). Moreover, for some proteins, localization (cell wall or secreted proteins) depends upon growth conditions (Chaffin et al., 1998). Considering the results obtained from *in situ* immunolocalization assay, *p27* is a cell wall protein, found in the culture supernatants for the reasons mentioned above.

## 5. Concluding remarks

Antigenic proteins have been widely studied in other fungal pathogens such as *Histoplasma capsulatum* (Deepe and Gibbons, 2001), *Cryptococcus neoformans* (Biondo et al., 2002; Huang et al., 2002), *Coccidioides* spp. (Kirkland et al., 2006; Shubitiz et al., 2006) and *C. albicans* (Bromuro et al., 1994). In these fungi, antigenic proteins have been found useful for diagnosis and follow up purposes, and some of them are vaccine candidates due to the

protective immunity they elicit through activation of the T-cell response. Protein *p27* is one of the major antigenic proteins in *P. brasiliensis* with potential use in PCM diagnosis (Diez et al., 2003; Ortiz et al., 1998, 1996); it has been shown to promote protective immunity in BALB/c mice against infection with *P. brasiliensis* yeast forms (Reis et al., 2008) and has been proposed as a virulence factor (Matute et al., 2008; Ortiz et al., 1996; Reis et al., 2008). The low genetic variability of this protein in non-Pb01 strains together with its confirmed expression in all isolates evaluated, its preferential expression in the yeast forms, and its surface-associated localization reinforce its potential use as a diagnostic tool. Further studies on the expression behavior of *p27* during the transition process, expression kinetics and regulation by promoter sequences should allow a more detailed understanding of the variable expression profile observed in this study.

## Acknowledgments

We thank Colciencias (No. 2213-343-19183) and Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes for funding as well as the National Doctoral Program of Colciencias for supporting I. Torres. We would also like to thank Dr. Andrew Hamilton for his kind collaboration on immunolocalization assays and to Dr. Oliver Clay for his comments on the manuscript.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.fgb.2011.09.001.

## References

- Batista Jr., J., De Camargo, Z.P., Fernandes, G.F., Vicentini, A.P., Fontes, C.J.F., Hahn, R.C., 2010. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? *Mycoses* 53, 176–180.
- Berzaghi, R., da Silva, S.H., de Camargo, Z.P., 2005. Variable gp43 secretion by *Paracoccidioides brasiliensis* clones obtained by two different culture methods. *J. Clin. Microbiol.* 43, 491–493.
- Beyer, A., Hollunder, J., Nasheuer, H.P., Wilhelm, T., 2004. Post-transcriptional expression regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a genomic scale. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 1083–1092.
- Biondo, C., Beninati, C., Delfino, D., Oggioni, M., Mancuso, G., Midiri, A., et al., 2002. Identification and cloning of a cryptococcal deacetylase that produces protective immune responses. *Infect. Immun.* 70, 2383–2391.
- Borba Cde, M., Correia, J., Vinhas, E., Martins, A., Alves, B.C., Unkles, S., et al., 2008. Genetic characterization of morphologically variant strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 306–309.
- Borges-Walmsley, M.I., Chen, D., Shu, X., Walmsley, A.R., 2002. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.* 10, 80–87.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bromuro, K.C., Torosantucci, A., Gomez, M.J., Urbani, F., Cassone, A., 1994. Differential release of an immunodominant 65 kDa mannoprotein antigen from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* 32, 447–459.
- Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A., 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 89–117.
- Burger, E., Vaz, C.C., Sano, A., Calich, V.L., Singer-Vermes, L.M., Xidieh, C.F., et al., 1996. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice. studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 391–398.
- Camargo, Z.P., Baruzzi, R.G., Maeda, S.M., Florian, M.C., 1998. Antigenic relationship between Loboia loboia and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological methods. *Med. Mycol.* 36, 413–417.
- Camargo, Z.P., Berzaghi, R., Amaral, C.C., Silva, S.H., 2003. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. *Med. Mycol.* 41, 539–542.
- Carrero, L.L., Nino-Vega, G., Teixeira, M.M., Carvalho, M.J., Soares, C.M., Pereira, M., et al., 2008. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet. Biol.* 45, 605–612.
- Carvalho, K.C., Ganiho, L., Batista, W.L., Moraes, F.V., Marques, E.R., Goldman, G.H., et al., 2005. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. *Microbes Infect.* 7, 55–65.



- Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D., Martinez, J.P., 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 130–180.
- da Silva, S.H., Grosso Dde, M., Lopes, J.D., Colombo, A.L., Blotta, M.H., Queiroz-Telles, F., et al., 2004. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4480–4486.
- de Mattos Grosso, D., de Almeida, S.R., Mariano, M., Lopes, J.D., 2003. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect. Immun.* 71, 6534–6542.
- Deepe Jr., G.S., Gibbons, R., 2001. Protective efficacy of H antigen from *Histoplasma capsulatum* in a murine model of pulmonary histoplasmosis. *Infect. Immun.* 69, 3128–3134.
- Diez, S., 2004. Characterization and Use of Serodiagnostically Important Antigens from Ph. St. John's Institute of Dermatology, The Guy's, King's and St. Thomas' Medical School (KCL), vol. PhD. University of London, London, 2004, pp. 121.
- Diez, S., Gomez, B.L., McEwen, J.G., Restrepo, A., Hay, R.J., Hamilton, A.J., 2003. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1536–1542.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinf.* 5, 113.
- Fernandes, V.C., Coitinho, J.B., Veloso, J.M., Araujo, S.A., Pedrosa, E.P., Goes, A.M., 2011a. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Immunol. Methods* 367, 78–84.
- Fernandes, V.C., Martins, E.M., Boeloni, J.N., Coitinho, J.B., Serakides, R., Goes, A.M., 2011b. Additive effect of rPb27 immunization and chemotherapy in experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS ONE* 6, e17885.
- Franco, M., Bagagli, E., Cunha, M., Chamma, L.G., Fecchio, D., 1996. *Paracoccidioides brasiliensis* antigen batches from the same isolate show immunological and biochemical differences. *Mycopathologia* 135, 13–19.
- Garcia, A.M., Hernandez, O., Aristizabal, B.H., De Souza Bernardes, L.A., Puccia, R., Naranjo, T.W., et al., 2010. Gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* transition from conidium to yeast cell. *Med. Mycol.* 48, 147–154.
- Gil, M.L., Penalver, M.C., Lopez-Ribot, J.L., O'Connor, J.E., Martinez, J.P., 1996. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* 64, 5239–5247.
- Goldman, G.H., dos Reis Marques, E., Duarte Ribeiro, D.C., de Souza Bernardes, L.A., Quiapin, A.C., Vitorelli, P.M., et al., 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot. Cell* 2, 34–48.
- Gomez, B.L., Figueroa, J.I., Hamilton, A.J., Ortiz, B., Robledo, M.A., Hay, R.J., et al., 1997. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3278–3283.
- Gomez, B.L., Figueroa, J.I., Hamilton, A.J., Diez, S., Rojas, M., Tobon, A.M., et al., 1998. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87-kilodalton determinant during and after antifungal therapy. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3309–3316.
- Gonzalez, A., Gomez, B.L., Restrepo, A., Hamilton, A.J., Cano, L.E., 2005. Recognition of extracellular matrix proteins by *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Med. Mycol.* 43, 637–645.
- Hanada, K., Shiu, S.H., Li, W.H., 2007. The nonsynonymous/synonymous substitution rate ratio versus the radical/conservative replacement rate ratio in the evolution of mammalian genes. *Mol. Biol. Evol.* 24, 2235–2241.
- Huang, C., Nong, S.H., Mansour, M.K., Specht, C.A., Levitz, S.M., 2002. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-Cell responses. *Infect. Immun.* 70, 5485–5493.
- Kirkland, T.N., Raz, E., Datta, S.K., 2006. Molecular and cellular mechanisms of protective immunity to coccidioidomycosis. *Vaccine* 24, 495–500.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Marques, A.F., da Silva, M.B., Juliano, M.A., Travassos, L.R., Taborda, C.P., 2006. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2814–2819.
- Matute, D.R., McEwen, J.G., Puccia, R., Montes, B.A., San-Blas, G., Bagagli, E., et al., 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* 23, 65–73.
- Matute, D.R., Quesada-Ocampo, L.M., Rauscher, J.T., McEwen, J.G., 2008. Evidence for positive selection in putative virulence factors within the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e296.
- McEwen, J.G., Ortiz, B.L., Garcia, A.M., Florez, A.M., Botero, S., Restrepo, A., 1996. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet. Biol.* 20, 125–131.
- Molinari-Madlum, E.E., Felipe, M.S., Soares, C.M., 1999. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med. Mycol.* 37, 269–276.
- Morais, F.V., Barros, T.F., Fukada, M.K., Cisalpino, P.S., Puccia, R., 2000. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3960–3966.
- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R., Dobbie, Z., 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 32, 1372–1374, 1376, 1378–1379.
- Nunes, L.R., Costa de Oliveira, R., Leite, D.B., da Silva, V.S., dos Reis Marques, E., da Silva Ferreira, M.E., et al., 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot. Cell* 4, 2115–2128.
- Ortiz, B.L., Garcia, A.M., Restrepo, A., McEwen, J.G., 1996. Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3, 239–241.
- Ortiz, B.L., Diez, S., Uran, M.E., Rivas, J.M., Romero, M., Caicedo, V., et al., 1998. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 826–830.
- Penalver, M.C., O'Connor, J.E., Martinez, J.P., Gil, M.L., 1996. Binding of human fibronectin to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* 64, 1146–1153.
- Pinto, A.R., Puccia, R., Diniz, S.N., Franco, M.F., Travassos, L.R., 2000. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* 18, 3050–3058.
- Pitarch, A., Nombela, C., Gil, C., 2006. *Candida albicans* biology and pathogenicity: insights from proteomics. *Methods Biochem. Anal.* 49, 285–330.
- Pitarch, A., Nombela, C., Gil, C., 2008. Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics. *Methods Mol. Biol.* 425, 217–239.
- Puccia, R., Travassos, L.R., 1991. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1610–1615.
- Puccia, R., Schenkman, S., Gorin, P.A., Travassos, L.R., 1986. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect. Immun.* 53, 199–206.
- Rappleye, C.A., Goldman, W.E., 2006. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 281–303.
- Reis, B.S., Fernandes, V.C., Martins, E.M., Serakides, R., Goes, A.M., 2008. Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* 26, 5461–5469.
- Restrepo, A., Jimenez, B.E., 1980. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J. Clin. Microbiol.* 12, 279–281.
- Restrepo, A., McEwen, J.G., Castaneda, E., 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.* 39, 233–241.
- Rocha, A.A., Malavazi, I., Goldman, G.H., Puccia, R., 2009. Transcription regulation of the Pbgp43 gene by nitrogen in the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet. Biol.* 46, 85–93.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Shubitz, L.F., Yu, J.J., Hung, C.Y., Kirkland, T.N., Peng, T., Perrill, R., et al., 2006. Improved protection of mice against lethal respiratory infection with *Coccidioides posadasii* using two recombinant antigens expressed as a single protein. *Vaccine* 24, 5904–5911.
- Simon, P., 2003. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 19, 1439–1440.
- Taborda, C.P., Juliano, M.A., Puccia, R., Franco, M., Travassos, L.R., 1998. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 66, 786–793.
- Teixeira, M.M., Theodoro, R.C., de Carvalho, M.J., Fernandes, L., Paes, H.C., Hahn, R.C., et al., 2009. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol. Phylog. Evol.* 52, 273–283.
- van Burik, J.A., Schreckhise, R.W., White, T.C., Bowden, R.A., Myerson, D., 1998. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med. Mycol.* 36, 299–303.
- Van Noorden, S., 1986. Tissue preparation and immunostaining techniques for light microscopy. *Immunocytochemistry: modern methods and applications*, pp. 26–53.

# Paracoccidioidomicose (doença de Lutz-Splendore-Almeida): propedêutica complementar, diagnóstico diferencial, controle de cura

*Paracoccidioidomycosis disease (Lutz-Splendore-Almeida disease): Additional workup, differential diagnosis, cure control*

Alexandre Vasconcellos Alvim Ambrósio<sup>1</sup>, Camila Cristiane Silva Camelo<sup>1</sup>, Carolina Venâncio Barbosa<sup>1</sup>, Fernanda Gomes Tomazatti<sup>1</sup>, Flávia Araújo de Souza Brazões<sup>1</sup>, Juliana Márcia Veloso<sup>1</sup>, Gregório Victor Rodrigues<sup>1</sup>, Lucas Fonseca Rodrigues<sup>1</sup>, Pedro Igor Daldegan de Oliveira<sup>1</sup>, Raíza Almeida Aguiar<sup>1</sup>, Valdirene Silva Siqueira<sup>1</sup>, Victor Bastos Jardim<sup>1</sup>, Victoria Almeida Correa Gontijo<sup>1</sup>, Ana Cláudia Lyon de Moura<sup>2</sup>, Ivie de Paula<sup>2</sup>, Lílian da Silva Santos<sup>2</sup>, Nara Sulmonetti<sup>2</sup>, Ricardo Miguel de Freitas<sup>2</sup>, Samuel Gonçalves da Cruz<sup>2</sup>, Stanley de Almeida Araújo<sup>2</sup>, Vinícius Sousa Pietra Pedrosa<sup>2</sup>, Weverton César Siqueira<sup>2</sup>, Fabiana Rocha-Silva<sup>3</sup>, Rachel Basques Caligiorne<sup>3</sup>, Alfredo Miranda Góes<sup>4</sup>, Cid Sérgio Ferreira<sup>5</sup>, Enio Roberto Pietra Pedrosa<sup>6</sup>

DOI: 10.5935/2238-3182.20140021

## RESUMO

O diagnóstico da paracoccidioidomicose requer a presença de dados epidemiológicos e de algumas manifestações clínicas mais típicas, entretanto, depende da propedêutica complementar que ainda requer métodos intervencionistas, o diagnóstico diferencial com patologias de grande relevância como tuberculose e linfomas, e o controle de cura. Nesta atualização são discutidos os avanços nessas várias áreas que inclui a propedêutica complementar, o diagnóstico diferencial e o controle de cura, apontando para as perspectivas de desenvolvimento que poderão ajudar a definir melhor a sua abordagem. **Palavras-chave:** Paracoccidioidomicose; Micose; Diagnóstico Diferencial; Técnicas e Procedimentos Diagnósticos.

## ABSTRACT

*The diagnosis of paracoccidioidomycosis requires epidemiological data to be available and for the presence of some more typical clinical manifestations. It requires complementary investigation with interventional methods, differential diagnosis of pathologies of great importance such as tuberculosis and lymphomas, and cure control. This update discusses the advances in these various areas, which include complementary investigation, differential diagnosis and cure control, pointing to development prospects that may help better define the best approach to this disease.*

**Key words:** Paracoccidioidomycosis; Mycosis; Diagnosis, Differential; Diagnostic Techniques and Procedures.

## INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a paracoccidioidomicose (PCM) ainda requer desvendar muitos dos aspectos relevantes da biologia do fungo, sua fisiopatologia, métodos diagnósticos menos intervencionistas, terapêutica mais curta e controle de cura adequado.<sup>1-7</sup>

A PCM constitui-se em doença endêmica em muitas regiões brasileiras, o que significa ser nosologia prevalente e requerer que seu diagnóstico seja precoce, minimamente intervencionista, fácil e disponível nas unidades básicas de saúde, para

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Medicina. Bolsista de Iniciação Científica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil.

<sup>2</sup> Pós-graduando do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina da UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Micologia da Santa Casa de Belo Horizonte. Belo Horizonte, MG – Brasil.

<sup>4</sup> Biólogo. Professor Associado IV. Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil.

<sup>5</sup> Médico Radiologista. Professor Titular Aposentado do Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil.

<sup>6</sup> Médico. Doutor em Medicina Tropical. Professor Titular do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil.

Recebido em: 16/01/2014

Aprovado em: 10/02/2014

Instituição:

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina da UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil

Autor correspondente:

Enio Roberto Pietra Pedrosa  
E-mail: enio@medicina.ufmg.br

que a terapêutica adequada contribua para evitar a morte prematura e impeça sequelas graves.<sup>1-3</sup>

Na avaliação diagnóstica inicial é importante considerar, além do estado geral do paciente, os órgãos e sistemas mais frequentemente comprometidos, observando-se as formas clínicas da doença: aguda-subaguda e crônica.<sup>1,2,5-7</sup>

## PROPEDÊUTICA COMPLEMENTAR

O diagnóstico da PCM e de suas repercussões sobre órgãos e sistemas baseia-se em identificação direta, a fresco, em espécimes clínicos variados; exame histopatológico; ou cultura do fungo, todos considerados métodos padrão-ouro; ou em exames hematológicos, sorológicos, de detecção de antígenos, de biologia molecular, funcionais e de imagem.<sup>1-7</sup>

### Exame direto

O diagnóstico micológico da PCM é feito a partir de espécime(s) clínico(s) obtido(s) de lesão(ões) suspeita(s) e examinado(s) diretamente, a fresco, entre lâmina e lamínula e, preferencialmente, após clarificação e homogeneização com hidróxido de sódio ou potássio, com ou sem coloração; ou após cultivo. É baseado na identificação de células leveduriformes birrefringentes ou de duplo contorno com brotamento simples ou múltiplo.

Na PCM pulmonar exclusiva, o escarro constitui-se no material mais útil para o exame, mesmo em casos de lesões pulmonares não expressivas radiologicamente, podendo ser coletado pelo lavado ou aspirado brônquico (lavado broncoalveolar), aspirado pulmonar transcutâneo ou biópsia. O *P. brasiliensis* é mais difícil de ser identificado no escarro (entre lâmina e lamínula) do que em raspado de lesões tegumentares e em secreções linfonodais. O escarro, como na tuberculose, deve ser examinado por intermédio da coleta diária de amostra, em três dias consecutivos.<sup>6-24</sup>

O estudo anatomopatológico de fragmentos teciduais também permite o exame direto em preparações histopatológicas, pelas colorações de hematoxilina-eosina ou com utilização de colorações especiais como o Gomori-Grocot ou ácido periódico de Schiff (Gráfico 1). A biópsia pulmonar a céu aberto deve ser considerada quando o diagnóstico é impossível por intermédio de outros métodos. O material obtido por aspiração transcutânea pulmonar é submetido a exa-

me microscópico em potassa a 10% e ao cultivo em meios de rotina. A biópsia pulmonar obtida com agulha lancetante ou a céu aberto deve ser preservada em frasco esterilizado, sobre gaze umedecida em água destilada esterilizada e parte do material enviada para exame histopatológico e micológico. Os cortes histológicos devem ser corados à hematoxilina e eosina e por técnica de impregnação de prata.<sup>25</sup> Nos pacientes com PCM pulmonar e acometimento cutâneo-mucoso, o isolamento do fungo, em geral, é feito a partir das lesões cutâneo-mucosas, de mais fácil acesso. A análise histopatológica visa ao reconhecimento de estruturas leveduriformes com parede celular birrefringente com brotamento múltiplo, semelhante à roda de leme ou timão, considerado patognomônico. Ainda assim, o fungo é escasso em alguns espécimes e pode ser despercebido na lâmina ou ser confundido com outros fungos termodimórficos, como *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides immitis*.<sup>7,8,26-29</sup> A obtenção de material para análise histológica pode ser difícil e desaconselhada, como no acometimento nervoso central ou pulmonar isolados, o que requer procedimentos invasivos, como craniectomia e toracotomia, que muitas vezes estão indisponíveis em muitas regiões endêmicas da PCM, além de custo elevado.<sup>10-25</sup>

### Cultura e inóculo em animal

A dúvida diagnóstica pode ser resolvida pelo cultivo do material examinado, pela inoculação em animais suscetíveis ou pela reação de imunofluorescência com soros hiperimunes marcados com fluoresceína. O cultivo do fungo pode ser feito em alguns meios, como: *Mycosel*®, *Mycobiotic agar*®, *SaBHI*®, *água-sabouraud*®, ágar-extrato de levedura; e a seguir identificado. A cultura é demorada (requer três a quatro semanas) e necessita de instalações de biossegurança adequadas para sua manipulação, o que é problemático principalmente em áreas não endêmicas, onde a doença é rara e o diagnóstico é, geralmente, difícil e retardado.<sup>2-5,25</sup>

### Exames imunológicos

O diagnóstico presuntivo da PCM pode ser baseado em provas sorológicas, como evidência indireta da presença do fungo no paciente, quando não é possível o seu isolamento. A detecção de anticorpos

contra antígenos do *Paracoccidioidis* ou a existência desses antígenos em fluidos corporais constituem critério indireto do diagnóstico de PCM.<sup>10-21</sup>

Esses exames, embora sejam de grande ajuda no diagnóstico e monitoramento da terapia da PCM, não são usados rotineiramente. Os exames sorológicos baseados na detecção de anticorpos circulantes nem sempre são conclusivos e requerem mais tempo para que se desenvolva a fase de convalescença. Por isso, é altamente justificado o empenho na padronização de técnicas de diagnóstico para a PCM que sejam eficientes e rápidas.<sup>30</sup>

O diagnóstico sorológico por intermédio da pesquisa de anticorpos específicos anti*Paracoccidioidis* tem, portanto, valor limitado, sendo usado principalmente no acompanhamento da resposta ao tratamento. A reação sorológica padronizada e que possui melhor especificidade e sensibilidade é feita pela imunodifusão dupla em gel de ágar, com o uso de um extrato de exoantígenos rico em glicoproteína de 43 kDaltons (gp43), obtido de amostras de *P. brasiliensis* com sete dias de cultivo. Constitui-se no teste mais simples e, atualmente, considerado o principal método de diagnóstico sorológico da PCM, por intermédio de ensaios sorológicos como a imunodifusão, hemaglutinação, ELISA e *western-blot*, embora o encontro de anticorpos séricos específicos tenha valor apenas preditivo. O valor do encontro desses anticorpos séricos específicos é apenas preditivo, não são altamente específicos, pela similaridade de vários antígenos do *P. brasiliensis* com os de outros fungos, especialmente o *Histoplasma capsulatum*, o que gera frequentemente reações cruzadas. A resposta imune à gp43 envolve linfócitos Th1CD4+, secretando interferon gama e interleucina 2. A clonagem da proteína recombinante de 27 kDaltons (rPb27) induz em camundongos a produção de altos níveis de IgG2a, TGF-beta e interferon-gama e baixos níveis de interleucina 10. A quantificação dos níveis séricos de anticorpos correlaciona-se também com a gravidade da doença, sendo mais elevados nas formas graves, entretanto, alguns pacientes com PCM não possuem anticorpos anti*P. brasiliensis*, especialmente os imunossuprimidos.<sup>1-3,10-21</sup> A técnica de ELISA aplicando dois antígenos distintos, Pb27 e Mexo, garante elevada sensibilidade diagnóstica da PCM, evidenciada pela sua compatibilidade plena com a análise histopatológica de espécime contendo *P. brasiliensis*, entretanto, sua disponibilidade na prática clínica ainda é muito limitada.<sup>10-21</sup>

A sorologia pode ser útil ainda para definir o critério de cura e a duração do tratamento. Os títulos de

anticorpos podem diminuir gradativamente com o controle clínico da doença e o critério de cura sorológica baseia-se na negatificação ou estabilização em diluição de 1:2, ou menos, mas estes dados não são totalmente corretos e exames com melhor sensibilidade e especificidade precisam ser desenvolvidos.<sup>1-4,19-21</sup>

Outros testes sorológicos como contraímunoelctroforese (CIE), fixação de complemento (FC), imuno-fluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e *immunoblot* (IB) são menos utilizados ou não fazem parte da rotina diagnóstica na PCM.<sup>1-4</sup> O teste de imunodifusão radial dupla constitui-se em método de grande especificidade (98%) e sensibilidade adequada (84%), além de baixo custo operacional, requerendo preparação do antígeno gp43 pelos diferentes laboratórios para que não ocorram conflitos ao comparar resultados de diferentes regiões de ocorrência da PCM.

Cada um desses métodos de diagnóstico possui limitação. Os testes sorológicos indicam apenas que houve infecção pelo fungo – o que ocorre em cerca de 50% dos habitantes de áreas endêmicas –, não afirmando sobre atividade da doença, o que deve ser inferido pela correlação com manifestações clínicas atuais, que se assemelham muito às de outras doenças como histoplasmosse, coccidioidomicose e algumas neoplasias (linfoma, adenocarcinoma, sarcoma), que constituem o seu diagnóstico diferencial.

Existem testes baseados na detecção de antígenos fúngicos no plasma e na urina que não são padronizados e são menos eficazes que os anteriormente citados.

## Métodos de biologia molecular

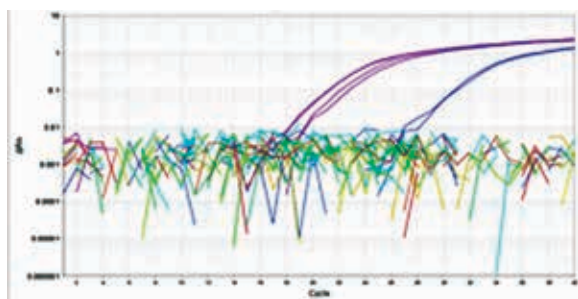
Os métodos de biologia molecular, como hibridização *in situ*, reação em cadeia de polimerase tradicional, *nested*-reação em cadeia de polimerase e reação em cadeia de polimerase em tempo real, têm sido propostos para o diagnóstico mais sensível e específico de PCM, mas ainda não estão disponíveis na prática clínica.<sup>31-34</sup>

São usados vários alvos para a detecção do DNA de *P. brasiliensis* e do *P. lutzii* como marcadores, como as regiões codificantes do RNA ribossômico (rDNA) e das glicoproteínas gp43 e pb27.<sup>32,35-37</sup> A PCR realizada com iniciadores baseados nas sequências do gene da gp43 são excelente instrumento e método altamente sensível.<sup>32</sup> Os microssatélites podem ser importantes marcadores para a detecção do DNA do *P. brasiliensis*.<sup>38</sup>



A PCR constitui-se em excelente alternativa para o diagnóstico da PCM em comparação aos métodos convencionais, uma vez que pode detectar baixa carga fúngica, chegando a obter picogramas de DNA/mL de espécime clínico e pode ser usada em pequenas quantidades de amostras.<sup>39,40</sup> Os perfis genotípicos gerados pelas técnicas moleculares precisam ser sempre somados aos caracteres morfológicos, para que se conclua a identificação das espécies e seja estabelecido o diagnóstico da PCM.

A técnica de PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) tem se tornado método importante, uma vez que, a partir do desenho de uma sonda espécie-específica, é possível padronizar um teste de diagnóstico rápido e preciso para as doenças infecto-parasitárias. Assim como a PCR convencional, a qPCR consiste na duplicação exponencial de parte específica do genoma de um organismo *in vitro*. A qPCR usa, entretanto, o momento da primeira amplificação detectada e não o produto acumulado ao final de todos os ciclos, como acontece na PCR convencional. A detecção da qPCR é realizada por intermédio de fluorescência, o que requer, além dos reagentes necessários para qualquer reação de PCR, uma sonda fluorescente que se anela em regiões espécie-específicas dos genomas. O equipamento de qPCR é um termociclador com um conjunto de feixes de luz e um mecanismo que capta a fluorescência emitida durante a reação, convertendo-a em valor numérico, codificado pelo programa em gráficos (Figura 1).<sup>41-43</sup>



**Figura 1** - Curva de amplificação pela técnica qPCR. As duas curvas em roxo são amostras padrão do fungo *P. brasiliensis*, na concentração de 1 ng, e em azul o DNA de cultura de *P. brasiliensis*, isolada de paciente na concentração de 0,01 ng. As demais amostras de outras espécies de fungos, representadas pelas linhas coloridas, por não apresentarem a região espécie-específica não foram reconhecidos pela sonda e, portanto, não apresentaram o pico de amplificação. Laboratório de Micologia, Pós-Graduação, Santa Casa de Belo Horizonte, Minas Gerais.

A qPCR permite quantificar o material gênico inicial, desde que quanto maior o número inicial de cópias de DNA, menor será o ciclo no qual ocorre a primeira amplificação. Pode ser usada também como ensaio qualitativo, quando o produto é avaliado ao final da reação. Constituem os ensaios *endpoint* – ensaios de presença/ausência e de discriminação alélica.<sup>42</sup>

A manutenção da qualidade dos exames usando a qPCR exigiu a criação, pela comunidade científica, de um manual de orientação para sua padronização e validação, intitulado de *Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments* (MIQE), que normaliza a nomenclatura e os padrões de análises. Esse manual permite o uso seguro da qPCR no diagnóstico de doenças.<sup>31,42,44</sup>

A qPCR usando sonda fluorescente derivada do gene que codifica a gp43 é capaz de detectar o mínimo de 10 cópias da sequência codificadora da gp43, sendo eficiente no diagnóstico da PCM.<sup>42,45,46</sup> O uso como alvo do gene da GP43 permite especificidade e sensibilidade de 100% com capacidade em detectar 10 cópias do gene da GP43 em cultura com especificidade de 100% e sensibilidade de 61% em amostras biológicas. O uso da região de ITS1 rDNA como alvo por qPCR possui especificidade e sensibilidade de 100% em DNA de cultura e amostras biológicas, como biópsias e lavado brônquico alveolar.<sup>8,40,42,46,47</sup>

Os métodos de biologia molecular tem sido também cada vez mais usados no estudo da relação taxonômica em fungos.<sup>34,48-55</sup> A análise molecular, por isso, apresenta-se como instrumento importante na identificação de espécies fúngicas e no auxílio de diagnóstico das micoses. É importante ressaltar que os perfis genotípicos gerados pelas técnicas moleculares precisam ser somados aos caracteres morfológicos e aos aspectos clínicos, para que se conclua a identificação das espécies e diagnóstico da PCM.

## Intradermorreação

A intradermorreação com paracoccidioidina (gp43 kDa) possui grande valor na PCM-infecção. É exame imunológico com aplicações em inquéritos epidemiológicos, prognóstico e controle de cura (reações de anergia). Sugere falta de resistência por depleção da imunidade celular quando é negativa, em casos isolados de doença em evolução, o que traduz mau prognóstico.<sup>2-4,56-58</sup>

## Hematologia

O hemograma pode revelar anemia normocítica e normocrômica, leucocitose discreta à custa de neutrofilia às vezes com desvio à esquerda nas formas crônicas graves. A eosinofilia é mais frequente na forma juvenil (forma aguda-subaguda) do que na crônica. A velocidade de hemossedimentação em geral está elevada acima de 40 mm na primeira hora.<sup>2-4,19-25</sup>

## Função pulmonar

Os testes de função pulmonar nos portadores de PCM possuem padrão variável. A PCM pode provocar lesões difusas em todos os compartimentos pulmonares (brônquico, alveolar, intersticial e vascular), com repercussões importantes na função pulmonar. As sequelas fibróticas também contribuem para a alteração na função respiratória. A espirometria, frequentemente, demonstra padrão ventilatório obstrutivo, porém, devido ao fato de quase todos os pacientes serem tabagistas crônicos, não se pode atribuir esse achado unicamente à PCM. Há o predomínio, em geral, do distúrbio ventilatório obstrutivo, seguido pelos padrões combinados (obstrutivo-restritivo) e restritivo puro. A espirometria sugere lesões brônquicas, especialmente bronquiolares ou do conjuntivo peribronquiolar. Alterações da relação ventilação/perfusão (V/Q) e da difusão dos gases são decorrentes da destruição pulmonar pela fibrose, comprometendo a árvore brônquica, alvéolos e interstício. As alterações vasculares também levam a transtornos da difusão que podem ser evidenciados pelo teste de difusão de monóxido de carbono. A ocorrência de hipoxemia associa-se, em geral, à diferença alveoloarterial de oxigênio aumentada, o que expressa o predomínio das alterações perfusionais sobre as ventilatórias. Alterações na perfusão pulmonar e hipoxemia podem resultar em hipertensão arterial pulmonar. O teste de caminhada de seis minutos é útil para demonstrar queda na saturação de oxigênio pela hemoglobina e a distância percorrida em seis minutos. A redução do aspecto das lesões radiológicas, em geral, não se acompanha de recuperação da função pulmonar.<sup>22,59-63</sup>

## Hormônios e metabolismo

Os exames hormonais são de importância diante da suspeita de insuficiência suprarrenal pela identificação de níveis urinários de 17-hidroxisteroides

aumentados e plasmáticos de cortisol baixos antes e após estimulação com ACTH e, em alguns pacientes, de aldosterona plasmática diminuída.<sup>23,24,64-66</sup>

Observam-se, ainda, hiperpotassemia, hipercalcemia, hipocloremia, hiponatremia e uremia.

Os exames mais complexos estão condicionados à suspeita clínica ou às alterações dos exames laboratoriais iniciais, indicando outros envolvimento fisiopatológicos.<sup>2-4</sup>

## Ionograma

Na insuficiência suprarrenal podem ser encontradas hiperpotassemia, hipercalcemia, hipocloremia, hiponatremia e uremia.<sup>2-4</sup>

## Exames de imagem

Os exames de imagem são fundamentais para estabelecer o acometimento de diversos órgãos, seja por intermédio de seu padrão, como no estudo das sequelas após o tratamento.

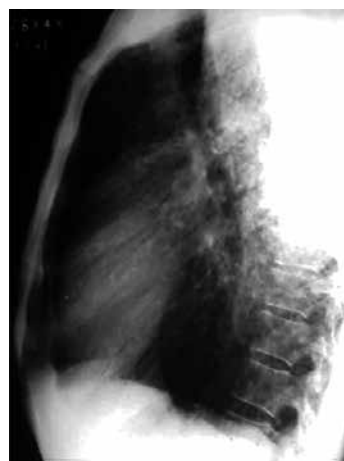
O estudo de imagem das manifestações pulmonares da PCM-doença começa com a radiografia convencional (telerradiografia) seguida pela tomografia computadorizada de tórax de alta resolução. A telerradiografia de tórax revela acometimento pulmonar bilateral na maioria dos casos (90,5%). As lesões pulmonares ocupam mais de um terço dos campos pulmonares (86%); com distribuição predominantemente difusa (ápices, campos médios e bases) e nos ápices e campos médios em 47,6 e 28,5% dos casos, respectivamente (Figuras 2, 3, 4). Os padrões radiológicos mais comuns são de lesão: nodular predominante (23 a 48,2%), miliar exclusivo (22,2%), miliar predominante (14,8%), reticular predominante (11 a 26%) e broncopneumônico (3,7%). A forma cavitária é pouco comum (4,8%).<sup>67-71</sup> A tomografia computadorizada revela as mesmas alterações como opacidades alveolares (24%), distorção arquitetural (30%), alargamento irregular do espaço aéreo (30%), nódulos (38%), bronquiectasias (41%), bolhas (59%), espessamento pleural (65%), opacidades em vidro fosco (67%), enfisema difuso (70%), espessamento da parede brônquica (89%), espessamento septal (100%) e raramente lesões em faveolamento ou bronquiectasias císticas. Em cerca de 10% dos casos pode ser visibilizado o sinal do halo invertido, caracterizado por crescente ou anel de consolidação, com opacidade em vidro fosco central.



**Figura 2** - Telerradiografia de tórax evidenciando comprometimento pulmonar bilateral, principalmente dos lobos médios, com infiltrado broncopneumônico, em aspecto de asa de borboleta em paciente com PCM. Paciente atendido no Centro de Referência em PCM do Hospital das Clínicas da UFMG.



**Figura 3** - Telerradiografia de tórax evidenciando comprometimento pulmonar bilateral, com padrão nodular. Paciente atendido no Centro de Referência em PCM do Hospital das Clínicas da UFMG.



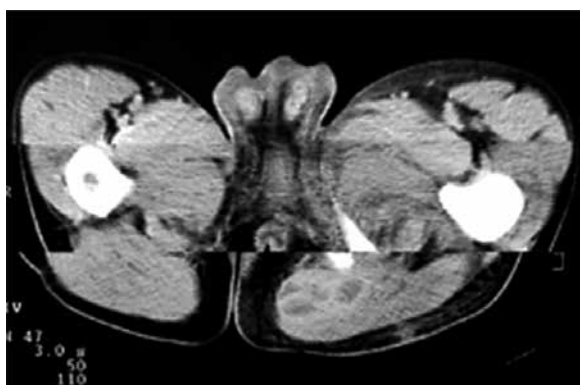
**Figura 4** - Telerradiografia de tórax evidenciando comprometimento pulmonar bilateral, com padrão nodular-micro-nodular em paciente com PCM. Paciente atendido no Centro de Referência em PCM do Hospital das Clínicas da UFMG.

As sequelas pulmonares após o tratamento são de fibrose e enfisema difuso com alargamento irregular do espaço aéreo, por vezes, próprias da hipertensão pulmonar.<sup>25,67-72</sup>

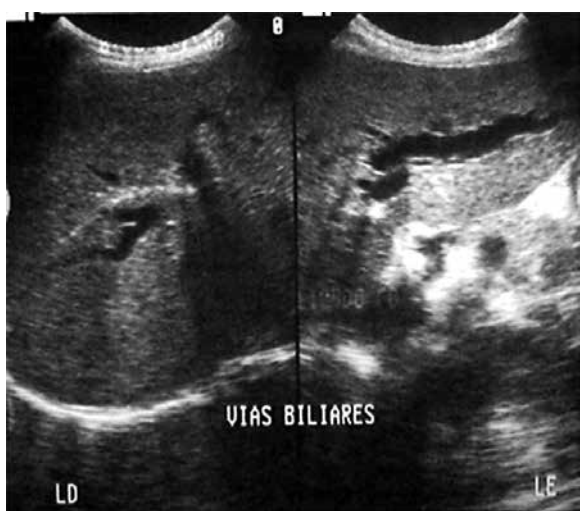
As lesões osteoarticulares podem ser demonstradas pelo exame radiológico simples ou pela ultrassonografia do aparelho locomotor, sendo especialmente determinadas pela cintilografia com MDP-99mTc e a ressonância nuclear magnética (Figura 5).<sup>3-9</sup>

A endoscopia digestiva alta ou colonoscopia, a ultrassonografia abdominal, a tomografia axial computadorizada ou linfocintilografia ajudam a definir o comprometimento das estruturas intra-abdominais – incluindo intestinos, fígado, baço, rim – e do sistema linfático profundo (Figuras 6 e 7).<sup>73-84</sup>

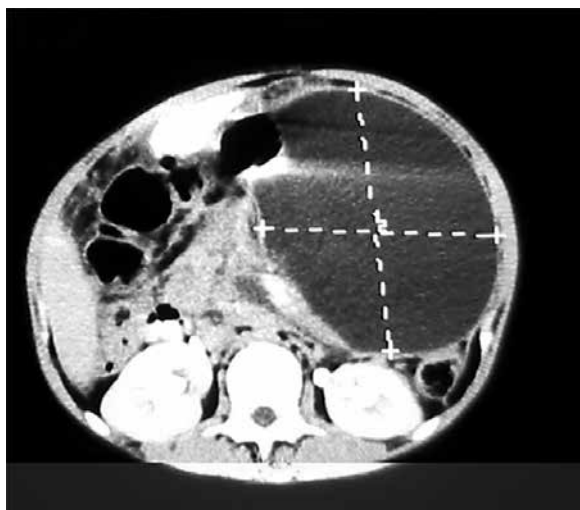
As alterações anatômicas na suprarrenal podem ser definidas pela ultrassonografia ou tomografia computadorizada (Figura 8).<sup>64-66,75,76</sup>



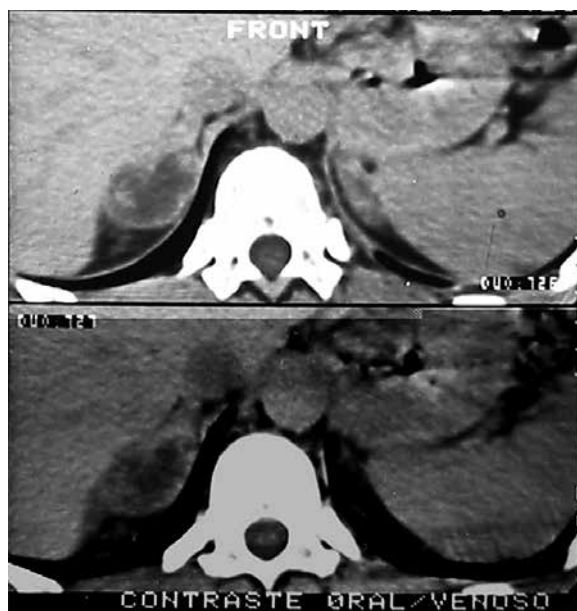
**Figura 5** - Abscessos musculares. Paciente atendido no Centro de Referência em PCM do Hospital das Clínicas da UFMG.



**Figura 6** - Dilatação de vias biliares intra-hepáticas. Paciente com linfonodomegalia no hilo hepático. Paciente atendido no Centro de Referência em PCM do Hospital das Clínicas da UFMG.



**Figura 7** - Formações císticas mesentéricas. Paciente atendido no Centro de Referência em PCM do Hospital das Clínicas da UFMG.



**Figura 8** - Acometimento da suprarrenal, nódulo hipocogênico, necrose central e calcificação.

FO acometimento do sistema nervoso central pode ser identificado pela tomografia computadorizada, sendo caracterizado por lesão arredondada, de localização variável, sem sinais de neoformação ou destruição óssea, com pequena quantidade de edema perifocal, efeito compressivo discreto e acúmulo de contraste (lesão circinada) em anel (Figura 9).<sup>85,86</sup>

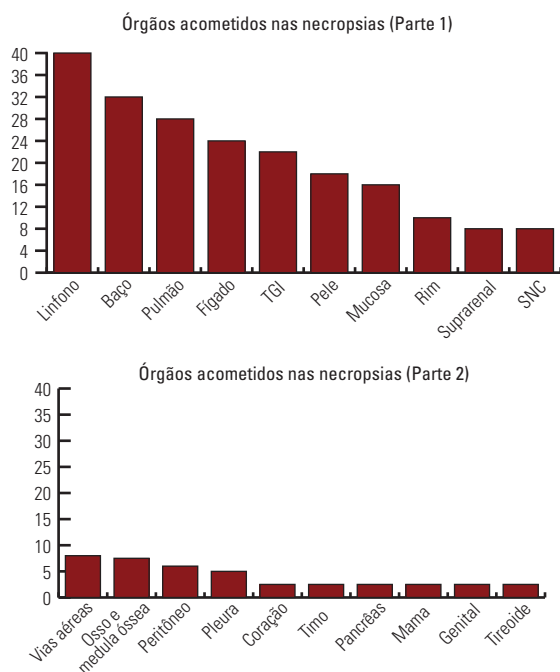


**Figura 9** - Tomografia computadorizada contrastada do paciente da Figura 1, que se apresentou com hemiparesia esquerda, além de lesões cutâneas e linfonodomegalias. A imagem evidencia múltiplas lesões parênquimatosas com captação de contraste em realce anelar. Paciente atendido no Centro de Referência em PCM do Hospital das Clínicas da UFMG.



## Exame do liquor

As alterações líquóricas observadas quando há acometimento do sistema nervoso central são caracterizadas por pleocitose variável, geralmente discreta, com predomínio de linfócitos, proteinorraquia (predomínio de gamaglobulina) e hipoglicorraquia.<sup>1-7,18</sup>



**Figura 10 (Partes 1 e 2)** - Distribuição dos 41 pacientes com paracoccidioidomicose necropsiados entre os anos de 1944 e 1999, no Serviço de Anatomia Patológica do HC/UFGM, em função dos órgãos acometidos.

## Avaliação dos métodos diagnósticos

Todos os métodos possuem alguma limitação, sendo necessário reunir as evidências clínicas aos resultados laboratoriais para a conclusão do diagnóstico.

A visualização a fresco das formas fúngicas nos tecidos apresenta baixa sensibilidade.

A cultura é demorada, requerendo três a quatro semanas para determinação do agente etiológico e de instalações de biossegurança adequadas para sua manipulação, o que é de difícil obtenção, principalmente em regiões em que a PCM não é endêmica, onde a doença é rara e o diagnóstico é, geralmente, difícil e retardado.

A análise histopatológica visa ao reconhecimento de estruturas leveduriformes com parede celular birrefringente com brotamento múltiplo e aspecto de roda de leme ou timão, considerado patognomônico.

Ainda assim, o fungo é escasso em alguns espécimes e pode ser despercebido na lâmina ou ser confundido com outros fungos termodimórficos. A obtenção de material para análise histológica é, ocasionalmente, difícil e desaconselhada, como no acometimento isolado do sistema nervoso central ou pulmonar, requerendo procedimentos invasivos, demorados, de alta complexidade e risco e de custo elevado. A histopatologia, apesar de apresentar baixa sensibilidade, é bem importante, pois confirma a presença do agente nos tecidos lesados e em várias situações é mais rápido do que a cultura. Apresentam, entretanto, pela sua fundamentação apenas em caracteres patológicos, a desvantagem de não identificar a espécie.

Os métodos sorológicos não são altamente específicos (há reação cruzada com outros fungos como *Histoplasma capsulatum*) e possuem sensibilidade variável, sendo baixa, sobretudo, em pacientes imunossuprimidos, em que há produção escassa de anticorpos; e indicam apenas que houve infecção pelo fungo, o que ocorre em cerca de 50% dos habitantes de áreas endêmicas, não afirmando sobre atividade de doença, que deve ser inferida pela correlação com manifestações clínicas atuais que se assemelham muito às de outras doenças fúngicas (histoplasmose, coccidioidomicose) e algumas neoplasias, que constituem o seu diagnóstico diferencial.

Os testes baseados na detecção de antígenos fúngicos no plasma e na urina não são padronizados e são menos eficazes do que os exames anteriormente citados.

Os métodos de biologia molecular (hibridização *in situ*, PCR tradicional, *nested*-PCR e PCR em tempo real) têm sido propostos para o diagnóstico mais sensível e específico de PCM, mas ainda não estão disponíveis na prática clínica.<sup>3,6-8,20,48-55</sup>

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

A PCM constitui, em suas diferentes formas, diagnóstico diferencial com tuberculose, histoplasmose, coccidioidomicose, criptococose, neoplasias (pulmão, laringe, boca, adrenais, pele), calazar, citomegalovirose, cromomicose, esporotricose, sífilis, doença de Churg-Strauss, granulomatose de Wegener, hanseníase, linfoma, adenocarcinoma, sarcoma, mononucleose infecciosa, sarcoidose, toxoplasmose, doença da arranhadura do gato, mononucleose infecciosa e síndrome mononucleose simile (citomegalovírus, toxoplasmose, síndrome retroviral aguda).

O acometimento ocular pode ser confundido com esporotricose, leishmaniose, lúpus eritematoso sistêmico, sífilis secundária, tracoma, tuberculose, toxoplasmose.

As alterações intestinais podem simular câncer de cólon, doença inflamatória intestinal, linfoma, tuberculose, histoplasmose.

O comprometimento ósseo pode requerer diferenciação com leishmaniose, hanseníase, com metástases ósseas de câncer de mama, próstata, rins, tireoide, tumores ósseos ou cartilaginosos, mieloma múltiplo e a tuberculose. A tuberculose óssea constitui um dos diagnósticos diferenciais principais da PCM. Na tuberculose as lesões tendem a ser assimétricas e acometem preferencialmente a coluna vertebral lombar e as articulações dos quadris e joelhos, enquanto na PCM tendem a ser simétricas e acometer preferencialmente a cintura escapular, os úmeros, arcos costais e articulação acromioclavicular.<sup>3,6-8,20</sup>

## CONTROLE DE CURA

O momento adequado para a interrupção do tratamento continua controverso. Deve perdurar até que sejam observados os critérios de cura determinados por parâmetros:

- **clínicos:** caracterizados pela regressão dos sinais e sintomas, cicatrização de lesões e involução das linfonodopatias. A melhora pode ser rápida, em geral em quatro a cinco meses, infundindo no paciente a sensação de que não precisa mais de medicação e desejo de interrompê-la, mesmo sem a autorização médica. Esse comportamento dos pacientes deve ser alertado para evitar que haja descontinuidade terapêutica e instalação de recidiva da PCM. A vigilância clínica cuidadosa nas consultas ambulatoriais constitui medida essencial para a manutenção da adesão até a suspensão completa do tratamento;
- **radiológicos:** estabilização das imagens radiológicas, manutenção das mesmas lesões cicatriciais em cinco radiografias realizadas ao longo de um ano;
- **imunológico:** negatificação dos títulos de imunodifusão dupla ou estabilização do título em valores até 1:2, observada em três amostras de soro em intervalo de dois meses. Em geral requer 17 meses. É importante considerar que a relação entre os níveis de IgG e de quimiocinas, com a melhora clínica, nem sempre é direta, o que impede concluir que os métodos sorológicos disponíveis sejam de

valor para indicar a cura da PCM e, portanto, não devem ser seguidos sem juízo clínico;

- **micológica:** pesquisa negativa do fungo em exame das secreções nas quais foi anteriormente identificado;
- **aparente:** refere-se à cura clínica, micológica, radiológica e imunológica durante dois anos, sem receber tratamento de manutenção.<sup>7-9,86-89</sup>

É frequente, entretanto, a observação de pacientes que apresentam recidiva da PCM cada vez que o tratamento é interrompido. Dessa forma, existe a necessidade de definição de parâmetros ou testes laboratoriais de mais segurança para a tomada de decisão quanto à duração da terapêutica.

## REFERÊNCIAS

1. Martinez R. Paracoccidioidomycosis: The dimension of the problem of a neglected disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43:480.
2. Souza W. (coordenador). Doenças negligenciadas. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 2010.
3. Moreira APV. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. *Bol Epidemiol Paulista*. 2008 mar; 5(51).
4. Marques SA. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *An Bras Dermatol*. 2003; 78(2):135-50.
5. Palmeiro M, Cherubini K, Yurgel LS. Paracoccidioidomicose: revisão da literatura. *Scientia Med*. 2005; 15(4):234-7.
6. Lacaz CS. Paracoccidioidomicose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia Médica*. 8. ed., São Paulo: Sarvier; 1991. p. 248-97.
7. Bummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev*. 1993; 6(1):89.
8. Mendes RP. Paracoccidioidomicose. In: Rocha MOC, Pedroso ERP. *Fundamentos em Infectologia*. Rio de Janeiro: Rubio; 2009. p. 945-94.
9. Restrepo A, Tobon AM, Agudelo CA. Paracoccidioidomycosis. In: Hospenthal DR, Rinaldi MG. (editors). *Diagnosis and treatment of human mycoses*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 331.
10. Pedroso ERP, Veloso JMR, Prado LGR. Saúde pública e epidemiologia: a paracoccidioidomicose em pacientes atendidos no Hospital das Clínicas (HC-UFMG). In: III Congresso Mineiro de Infectologia, 2008, Belo Horizonte. A paracoccidioidomicose em pacientes atendidos no Hospital das Clínicas (HC-UFMG). Belo Horizonte: HC-UFMG; 2008.
11. Gontijo CCV, Prado RS, Neiva CLS, Freitas RM, Prado FLS, Pereira ARA, et al. A paracoccidioidomicose em pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG). *Rev Med Minas Gerais*. 2002; 13(4):231-3.
12. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol*. 2002; 10(2):80-7.

13. Padilha GA. Paracoccidioidomicose: quadro clínico como expressão da imunopatologia. *Anais Brasileiros Dermatol.* 1996; 71(5):1996.
14. Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, Franco M, Travassos LR. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun.* 1998; 66:786-93.
15. Teixeira ABMJ, Etchebehere ECSC, Lima MCL, Santos AO, Pires BC, Valença Jr, JT, *et al.* Gallium-67 imaging in a patient with paracoccidioidomycosis: a case report. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2000; 42(3):167-70.
16. Yamaga LY, Benard G, Hironaka FH, Castro LG, Funari MG, de Castro CC, *et al.* The role of gallium-67 scan in defining the extent of disease in an endemic deep mycosis, paracoccidioidomycosis: a predominantly multifocal disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2003; 30(6):888-94.
17. Padilha GA. Paracoccidioidomicose: quadro clínico como expressão da imunopatologia. *Anais Brasileiros Dermatol.* 1996; 71(5):1996.
18. Pereira WJF. Paracoccidioidomicose do sistema nervoso central – análise de 13 casos com pesquisa do antígeno gp43 por imunofluorescência. [Dissertação]. Belo Horizonte: Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte; 2001.
19. Reis BS, Bozzi A, Prado FL, Pereira MC, Ferreira FE, Godoy P, *et al.* Membrane and extracellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* (Mexo): identification of a 28-KDa protein suitable for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Immunol Meth.* 2005; 307:118.
20. Ferreira MS. Contribuição para o estudo clínico-laboratorial e terapêutico da forma juvenil da paracoccidioidomicose. *Rev Pat Trop.* 1993; 22(2):267-406.
21. Bozzi A, Reis BS, Prado FL. Modulation of CD28 and CD86 expression in patients with paracoccidioidomycosis in different periods of treatment. *Scand J Immunol* 2004; 60: 500-5.
22. Bozzi A, Pereira PP, Reis BS, Goulart MI, Pereira MC, Pedrosa EP, *et al.* Interleukin-10 and tumor necrosis factor- $\alpha$  single nucleotide gene polymorphism frequency in paracoccidioidomycosis. *Hum Immunol.* 2006; 67:931-9.
23. Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathol.* 2008; 165(4-5):289-302.
24. Fernandes VC, Coitinho JB, Veloso JMR, Araújo SA, Pedrosa ERP, Góes AM. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Immunol Meth.* 2011; 367:78-84.
25. Fornajero N, Maluf MCF, Takahachi G, Svidzinski TIE. Paracoccidioidomycosis epidemiological survey using gp43, in two cities of northwestern region of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38(2):191-3.
26. Camargo ZP, Unterkircher C, Travassos RL. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. *J Med Vet Mycol.* 1989; 27:407-12.
27. Coitinho JB. Caracterização estrutural da forma recombinante da proteína Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis*. [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2009. 119p.
28. Londero AT, Melo IS. Aula 13: Paracoccidioidomicose. *J Bras Med.* 1998; 55(3):98-111.
29. Restrepo A, Gómez BL, Tobón A. Paracoccidioidomycosis: Latin America's Own Fungal Disorder. *Curr Fungal Infect Rep.* 2012; 6:303-11.
30. Yasuda MAS, Restrepo AM. Imunologia das micoses. *In: Veronesi R, Focaccia R. (org). Tratado de Infectologia.* São Paulo: Atheneu; 1996. p. 1058-80.
31. Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FSB, Olsvk PA, *et al.* MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC.* 2010; 11(74):67-71.
32. Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, de Camargo ZP. PCR for diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(9):3478-80.
33. Hamdan JS, Rocha RL. Epidemiologia da paracoccidioidomicose. *An Fac Med UFMG.* 1987; 36(1/2):52-61.
34. Saens GS, Taylor JW, Gargas A. 18S rRNA gene sequences and supraordinal classification of the *Erysiphales*. *Mycol.* 1994; 86(2):212-6.
35. Marques da Silva SH, Colombo AL, Blotta MH, Lopes JD, Queiroz-Telles F, Pires de Camargo Z. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(8):3675-80.
36. Moraes FV. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(11):3960-6.
37. Sano A, Yokoyama K, Tamura M, Mikami Y, Takahashi I, Fukushima K, *et al.* Detection of gp43 and ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal RNA genes of *Paracoccidioides brasiliensis* in Paraffin-embedded Tissue. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2001; 42(1):23-7.
38. Marques ER, Ferreira ME, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, *et al.* Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Genet Genomics.* 2004; 271:667-77.
39. Goldani LZ, Sugar AM. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. *Clin Infect Dis.* 1995; 21:1275-81.
40. Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, Morrison CJ. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific probes. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3505-11.
41. Applied Biosystems. 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Getting Started for Standard Curve Experiments. Applied Biosystems; 2007-2010. 126p.
42. Johnson G, Nolan T, Bustin SA. Real-time quantitative PCR, Pathogen detection and MIQE. *In: PCR Detection of Microbial Pathogens.* 2. ed. Methods Molec Biol. 2013; 943(1):1-14.
43. Zaha A. Biologia molecular básica. *In: Rossetti ML, Silva CMD, Rdrigues JJS. Doenças infecciosas: diagnóstico molecular.* São Paulo: Guanabara-Koogan; 2006. p. 1-15.
44. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR: Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods.* 2010; 50(4):S1-5.

45. Karuppaiyl SM, Peng M, Mendoza L, Levins TA, Szanislo PJ. Identification of the conserved coding sequences of three chitin synthase genes in *Fonsecaea pedrosoi*. *J Med Vet Mycol*. 1996; 32(2):117-25.
46. Semighini CP, Marins M, Goldman MH, Goldman GH. Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter *Atr* genes in *Aspergillus nidulans* by Real-Time Reverse Transcription-PCR assay. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68:1351-7.
47. Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a Road map for control and elimination. *Plos Negl Trop Dis*. 2008; 2(9):e300.
48. Attili DS, De Hoog GS, Pizzirani-Kleiner AA. rDNA- RFLP and ITS-1 sequencing of species of the genus *Fonsecaea*, agents of chromoblastomycosis. *Med Mycol*. 1998; 36:219-25.
49. Bruns TD, White TJ, Taylor JW. Fungal molecular systematics. *Annu Rev Ecol Syst*. 1991; 22:525-64.
50. Bryan GT, Daniels MJ, Osbourn AE. Comparison of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by analysis of ribosomal DNA sequences. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61(2):681-9.
51. Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW, Moens W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J Med Vet Mycol*. 1995; 33(5):319-25.
52. Leclerc MC, Philippe H, Guého E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J Med Vet Mycol*. 1994; 32:331-41.
53. Mitchell TG, Sandin RL, Bowman BH, Meyer W, Merz WG. Molecular mycology: DNA probes and applications of PCR technology. *J Med Vet Mycol*. 1994; 32(1):351-66.
54. Mitchell TG, White TJ, Taylor JW. Comparison of 5,8S ribosomal DNA sequences among the basidiomycetes yeast genera *Cystotilobasidium*, *Filobasidium* and *Filobasidiella*. *J Med Vet Mycol*. 1992; 30:207-18.
55. Spatafora JW, Mitchell TG, Vilgalys R. Analysis of genes coding for small-subunit rRNA sequences in studying phylogenetics of dermatiaceous fungal pathogens. *J Clin Microbiol*. 1995; 33:1322-6.
56. Wanke B. Paracoccidioidomycose. Inquérito intradérmico com paracoccidioidina em zona urbana do município do Rio de Janeiro. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1976.
57. Costa EO, Diniz LSM, Fava Netto C, Arruda C, Dagli MLZ. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. *J Med Vet Mycol*. 1995; 33(1):39-42.
58. Silva-Vergara ML, Martinez R. Inquérito epidemiológico com paracoccidioidina e histoplasmina em área agrícola de café em Ibiá, Minas Gerais, Brasil. *Rev Iberoam Micol*. 1998; 15(4):294-7.
59. Afonso JE, Nery LE, Romaldini H, Bogossian M, Ribeiro-Rato O. Pulmonary function in paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1979; 21(6):269-80.
60. Malaguti C, Napolis LM, Dal Corso S. Testes simplificados de avaliação funcional. In: Gomes M, Nader JA, Stelmach R, Leiro LCF (editores). *Atualização e reciclagem pneumologia*. Rio de Janeiro: Revinter; v.VI, 2006. p. 382-6.
61. Lemle A, Wanke B, Miranda JL, Kropf GL, Mandel MB, Mandel S. Pulmonary function in paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). An analysis of the obstructive defect. *Chest*. 1983; 83(5):827-8.
62. Campos EP, Cataneo AJM. Pulmonary function in 35 patients with paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1986; 28(5):330-6.
63. Sulmonetti N. Estudo da função pulmonar em pacientes adultos portadores da paracoccidioidomycose crônica. [Dissertação]. Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Belo-Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.
64. Leal AMO, Magalhães PK, Martinez R, Moreira AC. Adrenocortical hormones and interleukin patterns in paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis*. 2003; 187(1):124-7.
65. Leal AMO, Magalhães PK, Martinez R, Moreira AC. Adrenocortical hormones and interleukin patterns in paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis*. 2003; 187(1):124-7.
66. Londero AT, Del Negro G. Paracoccidioidomycose. *J Pneumol*. 1986; 12:41-60.
67. Barba MF, Marques HHS, Scatigno Neto A, Aquino MZ, Vitule LF, Barbato AJG, et al. Paracoccidioidomycose na infância: diagnóstico por imagens – relato de caso. *Radiol Bras*. 1993; 26(2):87-90.
68. Valle AC, Guimarães RR, Lopes DJ, Capone D. Thoracic radiologic aspects in paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1992; 34(2):107-15.
69. Restrepo A, Bernard G, Castro CC, Agudelo CA, Tobón AM. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2008; 29(2):182-97.
70. Muniz MAS, Marchiori E, Magnago M, Moreira LBM, Almeida Júnior JG. Paracoccidioidomycose pulmonar: aspectos na tomografia computadorizada de alta resolução. *Radiol Bras*. 2002; 35(3):147-54.
71. Freitas RM, Prado R, Prado FL, Paula IB, Figueiredo MT, Ferreira CS, et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis: radiology and clinical-epidemiological evaluation. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43(6):651-6.
72. Severo LC. Paracoccidioidomycose. Estudo clínico e radiológico das lesões pulmonares e seu diagnóstico. [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1979.
73. Cerri GG, Del Negro G, Magalhães AJR, Amato Neto V, Magalhães A. Utilização da ultrassonografia e da linfografia na forma linfática da paracoccidioidomycose. *Rev Hosp Clin*. 1983; 38(4):160-3.
74. Arruda PR, Castro RM. Linfografia na blastomycose sul-americana. *An Bras Dermatol*. 1964; 40:7-14.
75. Marchiori E, Tannus J, Ramos RC, Cunha MLS, Pantaleão CA, Silva SC, et al. Paracoccidioidomycose das suprarrenais: avaliação por métodos radiológicos: relato de caso. *Radiol Bras*. 1990; 23:197-200.
76. Leal AMO, Bellucci AD, Muglia VF, Lucchesi FR. Unique adrenal gland imaging features in Addison's disease caused by Paracoccidioidomycose. *AJR Am J Roentgenol*. 2003 Nov; 181(5):1433-4.
77. Martinez R, Meneghelli UG, Dantas RO, Fiorillo AM. O comprometimento gastrointestinal na blastomycose sul-americana (paracoccidioidomycose). Estudo clínico, radiológico e histopatológico. *Rev Ass Med Brasil*. 1979; 25(1):31-4.
78. Martinez R, Bellucci AD, Fiorillo AM. A tomografia computadorizada na avaliação do comprometimento abdominal na paracoccidioidomycose. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1988; 21(2):47-50.



79. Moraes CR. Calcificações intra-abdominais na blastomicose sul-americana. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1971; 13(6):428-32.
80. Oliveira IRS. *In*: Cerri GG, Oliveira IRS. Ultrassonografia abdominal. São Paulo: Revinter; 2002. p. 360-451.
81. Rosenfield A, Siegel N. Renal parenchymal disease: histopathologic-sonographic correlation. *AJR*. 1981; 137:739-98.
82. Martinez R, Rossi MA. Avaliação endoscópica do comprometimento do esôfago, estômago e duodeno na paracoccidioidomicose humana. *Arq Gastroenterol S Paulo*. 1986; 32:21-5.
83. Dantas JC, Sipahi LFM. Blastomicose hepática: diagnóstico sonográfico e drenagem percutânea. *Rev Imagem*. 1985; 7(1):21-4.
84. Yang ZG, Min PQ, Sone S, He ZY, Liao ZY, Zhou XP, *et al*. Tuberculosis versus lymphoma in the abdominal lymph nodes evaluation with contrast enhanced CT. *AJR*. 1999; 172:619-23.
85. Pedroso VSP, Vilela MC, Pedroso ERP, Teixeira AL. Paracoccidioidomycosis with central nervous system involvement: review of the literature. *Rev Bras Neurol*. 2008; 44:33-40.
86. Pedroso VSP, Vilela MC, Pedroso ERP, Teixeira AL. Paracoccidioidomycosis compromising the central nervous system: a systematic review of the literature. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009; 42:691-7.
87. Calegari JUM. Acompanhamento terapêutico da paracoccidioidomicose por imagens com Ga-67. *Arq Bras Med*. 1994; 68(6):381-5.
88. Nogueira MGS, Andrade GMQ, Tonelli E. Aspectos laboratoriais evolutivos de crianças em tratamento da paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39:478-83.
89. Lyon AC, Teixeira MM, Araújo SA, Pereira MC, Pedroso ER, Teixeira AL. Serum levels of sTNF-R1, sTNF-R2 and CXCL9 correlate with disease activity in adult type paracoccidioidomycosis. *Acta Trop*. 2009; 109(3):213-8.