



|              |            |                        |                    |             |
|--------------|------------|------------------------|--------------------|-------------|
| Apresentação | Expediente | Instruções aos autores | Edições anteriores | Suplementos |
|--------------|------------|------------------------|--------------------|-------------|

Paracoccidiodomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos  
*Paracoccidiodomycosis: historical, etiologic agent, epidemiology, pathogenesis, clinical forms, laboratory diagnosis and antigens*

Adriana Pardini Vicentini Moreira

Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Seção de Imunologia, Serviço de Microbiologia e Imunologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz (IAL), Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP)

## Resumo

No centésimo aniversário da publicação do primeiro caso de paracoccidiodomicose, são apresentadas informações relacionadas ao histórico, agente etiológico, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. Apesar do expressivo avanço em diversas áreas do conhecimento, a micose descrita por Adolpho Lutz em 1908 ainda demonstra altas taxas de mortalidade e letalidade e baixa visibilidade, configurando-se como oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva entre as infecciosas e parasitárias, e a maior taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas.

**Palavras-chave:** *Paracoccidiodoides brasiliensis*; epidemiologia; patogênese; formas clínicas; diagnóstico; antígenos.

## Abstract

In the 100<sup>th</sup> birthday of the first published case of paracoccidiodomycosis this review summarizes some knowledge about historical, etiologic agent, epidemiology, pathogenesis, clinical forms, laboratory diagnosis and antigens. Despite the significant advances in many areas of knowledge, the mycosis described by Adolpho Lutz in 1908, showed high mortality and lethality rates and low visibility representing the eighth most common cause of death from predominantly chronic or recurrent types of infectious and parasitic diseases.

**Key words:** *Paracoccidiodoides brasiliensis*; epidemiology; pathogenesis; paracoccidiodomycosis diagnosis; *P. brasiliensis* antigens.

## Histórico

Há 100 anos, Adolpho Lutz<sup>1,2</sup>, no Instituto Bacteriológico de São Paulo, descreveu pela primeira vez a paracoccidiodomicose (PCM), ao verificar em lesões bucais de dois pacientes a existência de fungos de natureza dimórfica distintas do *Coccidioides immitis*<sup>3,4</sup>.

Em 1º de abril de 1908, o periódico *Brazil-Médico*<sup>1</sup> publicava a primeira parte dos resultados, fruto de minuciosos estudos iniciados em 1905<sup>5</sup> por Adolpho Lutz. No artigo “Uma mycose pseudococcidica localizada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das *hyphoblastomicoses*

americanas”, Lutz descreveu a paracoccidioidomicose como uma doença que se caracterizava por apresentar lesões muito graves, com presença de úlceras que tomavam conta da boca e destruíam a mucosa da gengiva e o véu palatino e dolorosa repercussão ganglionar, qualificando-a como micose pseudococcídica após identificar seu agente causal, bem como seu modo característico de reprodução. Ao verificar semelhanças morfológicas com micoses anteriormente descritas na Argentina e nos Estados Unidos, incluiu-a em um grupo por ele denominado de hifoblastomicoses americanas<sup>3</sup>.

Após a descrição da doença, fatal na ocasião pela inexistência de terapia específica, seguiu-se longo período de análise e estudo das lesões cutâneas e mucosas, freqüentemente relatadas pelos pacientes acometidos pela enfermidade, na tentativa de isolamento do agente causal. Em 1912, Alfonso Splendore classificou o agente etiológico da paracoccidioidomicose dentro do gênero *Zymonema*, propondo a denominação de *Zymonema brasiliensis*<sup>3,4</sup>.

A classificação definitiva e consensualmente aceita foi feita por Floriano Paulo de Almeida, graças a estudo comparativo realizado entre o granuloma coccidióico nos Estados Unidos e no Brasil, demonstrando que eram indiscutíveis e notáveis as diferenças entre ambas as patologias<sup>6,3,4</sup>. Nesse estudo, confirmou os achados anteriormente descritos por Lutz<sup>1,2</sup>, estabelecendo, assim, as diferenças entre o agente etiológico da paracoccidioidomicose e o *C. immitis*, com o qual era freqüentemente confundido<sup>6</sup>. Em 1930, após diversos estudos, criou o gênero *Paracoccidioides* dentro do reino *Fungi*, revalidando também a espécie *brasiliensis*, criada por Splendore<sup>3,4,5,6</sup>.

Segundo Lacaz<sup>4</sup>, com a observação e o relato de casos isolados da doença em outros países da América do Sul, a mesma passou a ser chamada de blastomicose sul-americana, doença de Lutz, doença de Lutz-Splendore-Almeida, pois Splendore foi o primeiro a cultivar o patógeno e Almeida, o autor do primeiro estudo abrangente sobre a doença<sup>6</sup>. Porém, a oficialização do termo paracoccidioidomicose foi estabelecida em 1971, em Medellín, Colômbia, durante reunião de micologistas do continente americano, sendo mundialmente aceita desde então<sup>4</sup>.

## Agente etiológico

*Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da PCM, micose de alta endemicidade na América Latina<sup>7</sup>.

Taxonomicamente encontra-se no Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Pleomycetes*, Ordem *Onygenales*, Família *Onygenaceae*, Gênero *Paracoccidioides* e Espécie *brasiliensis*<sup>8,9</sup>.

*P. brasiliensis* apresenta dimorfismo termo-dependente, crescendo à temperatura ambiente sob a forma de colônias brancas, aderentes ao meio. Microscopicamente, observa-se hifas delgadas, hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas com produção de clamidósporos terminais ou intercalares, conídios e ausência de corpo de frutificação, sendo denominada de saprofítica<sup>7</sup> ou micélio<sup>10</sup>. Quando cultivado a 35°C-37°C, em meios enriquecidos desenvolve colônias de coloração creme, chamadas cerebriformes ou leveduriformes. Ao microscópico verifica-se a presença de células arredondadas ou ovais, multinucleadas, com paredes celulares espessas, birrefringentes, rodeadas por multibrotamentos, constituindo a variante L (levedura). Esta fase é conhecida também como parasitária, pois é encontrada causando lesões nos tecidos do hospedeiro humano ou animal<sup>10</sup>.

## Epidemiologia

A PCM é micose sistêmica, de natureza granulomatosa crônica, que acomete freqüentemente os pulmões, o sistema fagocítico macrofágico e tecidos mucocutâneos, podendo disseminar-se por via linfohematogênica para tecidos e órgãos adjacentes<sup>11</sup>.

Indivíduos do sexo masculino com idade entre 30 a 50 anos, ou seja, em fase produtiva, são os mais acometidos pela doença, principalmente aqueles que exercem atividades relacionadas à agropecuária<sup>12</sup>.

Até o momento, não foram totalmente esclarecidos o habitat natural e as condições de vida saprofítica de *P. brasiliensis*<sup>13</sup>. Em função das características ecológicas das regiões endêmicas acredita-se que o patógeno habite preferencialmente ambiente úmido, com temperaturas médias anuais entre 18°C a 24°C

e índices pluviométricos elevados (900 mm a 1.800 mm)<sup>7</sup>.

A micose apresenta distribuição geográfica restrita a países da América Latina, apresentando maior incidência no Brasil, Venezuela e Colômbia<sup>14,9,13</sup>.

A PCM não é doença de notificação compulsória, portanto, sua real prevalência não pode ser calculada. No entanto, estima-se que a taxa anual de incidência entre a população brasileira seja de 1-3 por 100.000 habitantes e a de mortalidade, de 0,14 por 100.000 habitantes<sup>15</sup>.

Coutinho e cols<sup>15</sup> estudaram 3.181 óbitos por PCM no Brasil, por um período de 15 anos, demonstrando a grande magnitude e baixa visibilidade da doença, destacando-a como oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva, entre as infecciosas e parasitárias, superior à leishmaniose, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas.

Estima-se que nas regiões endêmicas existam, aproximadamente, 10 milhões de pessoas infectadas por *P. brasiliensis*. No entanto, a maioria não apresenta sintomas clínicos<sup>13</sup>.

No Brasil é encontrada em quase todas as regiões do território nacional: Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Norte, sendo que casos esporádicos da doença têm sido relatados no Nordeste. No Estado de São Paulo tem sido relatada principalmente na região central<sup>16</sup>.

A enfermidade é considerada um grave problema de saúde pública devido à existência de extensas áreas endêmicas associadas às importantes repercussões econômico-produtivas dos indivíduos acometidos<sup>12,16</sup>.

Apesar de existirem áreas endêmicas bem definidas, o caráter casual e não repetitivo das observações, aliado às dificuldades de isolamento do agente etiológico, dificulta a exata localização do patógeno no ambiente. Além disso, a falta de surtos epidêmicos, o prolongado período de latência da doença e as freqüentes migrações das populações de áreas endêmicas tornam praticamente impossível a identificação do local onde a infecção foi adquirida<sup>7</sup>.

O isolamento desta espécie fúngica tem sido descrito a partir de fezes de pingüins da Antártida<sup>17</sup>, em amostras de solo<sup>18-23</sup>, ração de cachorro contaminada com solo<sup>24</sup>, trato intestinal de morcegos frugívoros<sup>25</sup> e também de tatus<sup>26-32</sup>.

A literatura tem relatado o sucesso obtido no isolamento de *P. brasiliensis* a partir de vísceras (fígado, baço, linfonodos e pulmões) do tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*)<sup>26-32</sup>. Para tanto, tem-se utilizado, além das técnicas micológicas tradicionais (cultivo e isolamento de células leveduriformes), métodos moleculares, como a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR), visando à amplificação do DNA empregando-se primers específicos.

Segundo Franco e cols.<sup>20</sup>, a combinação dos métodos micológicos e moleculares na análise de 81 tatus investigados permitiu aos autores, em seu conjunto, êxito na obtenção de 29 amostras com características macro e micromorfológicas compatíveis com *P. brasiliensis*. Segundo os autores, a demonstração da patogenicidade/virulência<sup>31</sup> inoculando-se células fúngicas isoladas das vísceras de tatus em animais susceptíveis; a produção de antígenos e avaliação de seu potencial antigênico, pela reação de imunodifusão dupla frente a soros de pacientes com PCM confirmada; a demonstração da imunoreatividade de frações antigênicas, como a glicoproteína de 43.000 daltons ou gp43, pela técnica de *immunoblotting*; a extração e amplificação de DNA fúngico e detecção pela técnica de PCR do gene que codifica a gp43<sup>32</sup> conferiram grau de certeza inquestionável aos resultados obtidos, demonstrando-se capazes de atender aos requisitos de confiabilidade para o isolamento de *P. brasiliensis* a partir de vísceras de tatus.

Esses resultados comprovam a presença de *P. brasiliensis* no solo em razão da constatação da ocorrência do mesmo, em alta freqüência, em tatus da espécie *D. novemcinctus*<sup>26-32</sup>, animais de hábito escavatório, cuja distribuição geográfica coincide com a observada na PCM<sup>13</sup>. O fato de tatus de nove bandas não apresentarem hábito migratório, visto que não costumam distanciar-se de sua toca, abre perspectivas para que se delimite com maior precisão a reservárea do patógeno, possibilitando,

conseqüentemente, determinar a região ou área na qual o homem é infectado. Pode-se dizer, portanto, que o contato com tatus está intimamente relacionado com maior risco de infecção, principalmente nos indivíduos que residem nas áreas endêmicas<sup>33</sup>.

Recentemente foram relatados casos da doença em cães<sup>34-37</sup>, sendo obtida cultura fúngica apenas para um caso. Ono e cols<sup>36</sup> avaliaram a presença de anticorpos anti-gp43 de *P. brasiliensis* em amostras de soro de 305 cães das regiões urbana, periurbana e rural de Londrina, Paraná, usando o ELISA, observando índices de positividade de 14%, 48,8% e 89,5%, respectivamente. Quando submetidos à avaliação da resposta imunológica do tipo tardio (HTT), empregando gp43 como antígeno, verificaram que os cães da área periurbana apresentaram 13,1% de positividade e os da rural, 38,1%. A detecção de altos títulos de anticorpos anti-gp43, associada à forte positividade na intradermoreação, levou ao sacrifício de seis cães, na tentativa de isolamento do agente etiológico. Apesar da utilização de metodologia semelhante àquela descrita para o isolamento em tatus, nesses cães a investigação foi negativa.

Fagundes<sup>37</sup> avaliou a presença de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, empregando as técnicas de ELISA e imunodifusão dupla, frente a soros de 282 cães da zona rural de Botucatu (SP). A reatividade por ELISA foi de 35% e as amostras com altos títulos de anticorpos avaliadas por *immunoblotting*, revelaram a presença de frações antigênicas bem definidas e específicas, embora com padrões de intensidade variável. Não se observou reatividade ao *P. brasiliensis* pela imunodifusão dupla. Os animais que apresentaram reatividade de forte intensidade frente ao antígeno fúngico foram avaliados clínica e radiologicamente, não evidenciando, contudo, sinais de PCM-doença.

A implantação, a implementação e o avanço das técnicas moleculares têm auxiliado de forma expressiva no isolamento de *P. brasiliensis* a partir de amostras de solo, principalmente daquelas coletadas de áreas sabidamente endêmicas para a doença<sup>13,20,22,23</sup>.

Neste sentido, Ono e cols.<sup>21</sup> avaliaram a interferência de produtos químicos utilizados na agricultura no desenvolvimento de *P. brasiliensis*. Os autores avaliaram seis fungicidas, dois herbicidas e dois inseticidas frente a cinco amostras de *P. brasiliensis* isoladas do meio ambiente e cinco isoladas de pacientes, demonstrando que o cultivo destes isolados a 35°C em ágar Sabouraud-dextrose, acrescido de concentrações distintas de cada um dos compostos químicos, impediu o desenvolvimento *in vitro* de *P. brasiliensis*. Estes resultados podem explicar parcialmente a dificuldade muitas vezes observada no isolamento de *P. brasiliensis* a partir de amostras de solo<sup>20</sup>.

## Patogênese

Durante muito tempo acreditou-se que o mecanismo de infecção humana ocorria pela via oral, visto que grande número de pacientes que relatavam hábito de mascar capins apresentava lesões em mucosa da cavidade oral.

González-Ochoa<sup>38</sup> consolidou a hipótese de que o mecanismo de infecção da PCM ocorria pela via área superior, por meio da inalação de formas fúngicas diminutas denominadas de conídeos. Uma vez inalados, sob os efeitos da temperatura corpórea do hospedeiro, alguns sistemas enzimáticos do patógeno são ativados, permitindo a transformação da forma infectante em parasitária<sup>39,11</sup>. Segundo o autor, as manifestações em mucosa oral e cutânea seriam secundárias e resultantes da disseminação linfo-hematogênica do fungo, a partir do tecido pulmonar.

Desde então esta via de infecção é a mais aceita, sendo evidenciada por vários aspectos, destacando-se: as tentativas infrutíferas de isolamento de *P. brasiliensis* a partir de gramíneas e outros vegetais<sup>40</sup>; o freqüente achado de lesões pulmonares em exames de autopsias<sup>41</sup>; e o isolamento de *P. brasiliensis* em amostras de escarro e lavado brônquico de pacientes portadores de lesões pulmonares inaparentes<sup>41,42,11</sup>.

Uma vez inalado, o fungo pode ser destruído no parênquima pulmonar por células fagocíticas inespecíficas ou multiplicar-se e produzir foco de infecção, o qual é drenado para o linfonodo regional localizado no hilo pulmonar, caracterizando, assim, o complexo primário na PCM. No entanto, essas lesões podem regredir espontaneamente em indivíduos imunocompetentes, com destruição total ou

parcial do fungo<sup>43</sup>, caracterizando a forma subclínica da doença<sup>44</sup>.

Eventualmente, os fungos contidos no complexo primário podem disseminar-se por via hematogênica e/ou linfática, atingindo outros órgãos, causando a forma juvenil ou aguda<sup>45</sup>. No entanto, muitos indivíduos permanecem com o complexo primário cicatricial contendo fungos viáveis, denominados de lesões quiescentes, que podem evoluir para PCM crônica muitos anos após a infecção<sup>11</sup>.

Nos tecidos a reatividade do hospedeiro induz reação inflamatória, que culmina na formação de granuloma, o qual foi inicialmente descrito por Motta<sup>46</sup>. O granuloma representa uma resposta do hospedeiro ao agente agressor, ou seja, o *P. brasiliensis*, na tentativa de bloquear e restringir seu desenvolvimento, impedindo sua multiplicação e disseminação para órgãos e tecidos adjacentes<sup>11</sup>. A evolução do granuloma parece estar intimamente relacionada ao tipo de resposta imune desencadeada pelo hospedeiro, bem como aos componentes de parede liberados pelo patógeno<sup>47</sup>.

Fatores relacionados ao *P. brasiliensis*, como virulência, patogenicidade e composição antigênica, e ao hospedeiro, como suscetibilidade genética, faixa etária, sexo, tabagismo, etilismo, desnutrição e deficiência do sistema imunológico, estão associados às manifestações clínicas da doença<sup>48</sup>.

San-Blas e San-Blas<sup>49</sup>, verificaram que polissacarídeos como  $\alpha$ -(1,3) glucana e  $\beta$ -(1,3) glucana estão relacionados ao dimorfismo fúngico e à virulência deste patógeno. Os autores, ao estudarem diferentes isolados de *P. brasiliensis*, sugeriram que a  $\alpha$ -(1,3) glucana protege o fungo contra enzimas digestivas produzidas pelos leucócitos e macrófagos do hospedeiro. Segundo San-Blas<sup>50</sup>, o parasitismo por *P. brasiliensis* ocorre quando este se transforma em levedura no início do processo infeccioso, evadindo-se, assim, da ação de enzimas fagocíticas, uma vez que os fagócitos humanos são capazes de produzir apenas  $\beta$ -glucanases, as quais digerem somente a  $\beta$ -(1,3) glucana.

Dentre os fatores próprios do fungo capazes de aumentar sua patogenicidade, os mais freqüentes são os lípidos e os polissacarídeos<sup>50</sup> e, mais recentemente, a glicoproteína de 43 kDa, antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*<sup>51-52</sup>.

## Formas clínicas

A classificação adotada leva em consideração as manifestações clínicas e os parâmetros imunológicos da patologia, apresentando três diferentes formas: PCM-infecção, PCM-doença e PCM-residual<sup>53-56</sup>.

A PCM-infecção é observada em indivíduos que apresentam positividade em testes cutâneos frente à paracoccidiodina, sendo considerada a forma assintomática da doença. Nestes indivíduos a imunidade celular encontra-se preservada, observando-se intensas reações intradérmicas<sup>11</sup>.

A PCM-doença pode manifestar-se sob duas formas: a aguda (tipo juvenil) e a crônica (tipo adulta). A forma aguda representa menos de 10% da casuística geral desta patologia, sendo a mais grave e a que afeta jovens de ambos os sexos, os quais apresentam acentuada depressão da resposta imunocelular e elevados títulos de anticorpos<sup>11</sup>. Normalmente, é originada de uma infecção primária, disseminando-se rapidamente por meio das vias linfáticas para o sistema monocítico-macrofágico, causando hepatoesplenomegalia e possível disfunção medular. As lesões em mucosas são pouco freqüentes, ocorrendo em 15% a 20% dos casos; o acometimento pulmonar é raro, estando presente em apenas 5% a 11% dos pacientes<sup>11,54,55</sup>.

A crônica representa 90% dos casos e acomete, freqüentemente, adultos do sexo masculino em idade produtiva, ou seja, entre 30 a 50 anos. A doença surge a partir de um foco quiescente<sup>55</sup>, caracterizando-se por apresentar curso de evolução lento, podendo comprometer um único órgão (unifocal) ou disseminar-se para outros órgãos (multifocal)<sup>11</sup>.

A residual constitui forma clínica importante pela freqüência com que se manifesta, mesmo após tratamento eficaz. As principais seqüelas relacionam-se ao comprometimento pulmonar, adrenal, laríngeo, digestivo, encefálico e tegumentar.

## Diagnóstico laboratorial

## Micológico

Na PCM, como em outras micoses, o diagnóstico considerado como padrão-ouro é o isolamento do agente etiológico em cultura. Para o isolamento de *P. brasiliensis* recomenda-se o emprego de meios de cultura enriquecidos com extrato de levedura, contendo antibióticos ou, ainda, ágar infusão de cérebro e coração (BHI). O material semeado é incubado a 25°C-30°C, crescendo lentamente (15 a 30 dias), sob a forma de micélio, apresentando colônias brancas ou amarronzadas, cotonosas ou glabrasas<sup>57,58</sup>.

Na maioria das vezes, as leveduras de *P. brasiliensis* podem ser facilmente visualizadas ao microscópio óptico. Normalmente, empregam-se secreções do trato respiratório, raspado e crostas de lesões ulceradas, tecidos de biópsia, pus de gânglios, urina e LCR, entre outros. Em material de punção ganglionar, por exemplo, visualizam-se células globosas, ovais ou elípticas com 5µm a 25µm de diâmetro, inclusões citoplasmáticas e multibrotamentos com parede de duplo contorno refringente.

Nos casos em que a biópsia é possível e menos lesiva para o paciente, colorações especiais como o Gomori-Grocott ou ácido periódico de Schiff podem auxiliar no diagnóstico, por meio da observação nos granulomas de células típicas multibrotantes. As células em múltiplo brotamento são esféricas (10 a 20 µm de diâmetro) e os brotos esféricos ou em forma de limão encontram-se dispostos ao redor da célula-mãe<sup>57</sup>.

Importante salientar que a PCM, principalmente em sua forma pulmonar, deve ser diferenciada de outras micoses e da tuberculose. Os achados clínicos e radiológicos são inespecíficos; no entanto, calcificação extensa, efusão pleural e localização apical são indicativas de histoplasmose e tuberculose. O diagnóstico diferencial com leishmaniose também assume grande importância, uma vez que as regiões endêmicas para esta patologia coincidem muitas vezes com as da PCM, sendo que as lesões orais, cutâneas e de fossas nasais são bastante semelhantes. O comprometimento do sistema linfático simula doença de Hodgkin e outras doenças malignas<sup>57</sup>.

## Sorológico

É evidente o fato de que o diagnóstico de certeza de processos infecciosos derive da demonstração do agente etiológico em preparados histológicos, exame a fresco ou cultivo<sup>3,57,58</sup>. No entanto, em algumas situações o estado físico ou clínico dos pacientes impossibilita o acesso ao local da lesão, impedindo assim a coleta do material biológico<sup>59</sup>.

Historicamente, na PCM a pesquisa de anticorpos<sup>59-64</sup> e antígenos<sup>66-67</sup> específicos no soro de pacientes empregando-se técnicas sorológicas, além de importante auxílio diagnóstico, tem a função de monitorar o curso da doença durante e pós-tratamento<sup>61,65-68</sup>, permitindo a obtenção de resultados mais rápidos, quando comparados aos exames de cultura e histopatológico<sup>3,57</sup>, sendo que em alguns casos se traduz na primeira indicação da natureza micótica da doença, principalmente naqueles indivíduos com sinais clínicos inaparentes<sup>3</sup>. A técnica utilizada, portanto, há que aliar sensibilidade à especificidade<sup>69,70</sup>, para que o valor preditivo<sup>71</sup> seja máximo e reprodutível.

Apesar de técnicas sorológicas como imunodifusão dupla (ID)<sup>59,60,62,68</sup>, imunofluorescência indireta<sup>72</sup>, contraimuno eletroforese<sup>61,64,69</sup>, ELISA<sup>73-78,60-62,65-68</sup> e *immunoblotting*<sup>79-83,60,62,73</sup> serem empregadas para o diagnóstico confirmatório da PCM, visando à pesquisa de anticorpos e/ou antígenos, os índices de resultado falso-positivos e falso-negativos ainda são muito elevados, estando a especificidade e sensibilidade da técnica diretamente relacionadas ao antígeno empregado<sup>62</sup>.

Segundo Fava-Netto<sup>84</sup>, o primeiro teste amplamente utilizado no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com PCM foi a fixação de complemento, desenvolvido por Moses<sup>85</sup>, empregando como antígeno extrato de *P. brasiliensis* em salina, obtendo sensibilidade de 80%. Posteriormente, o emprego de antígeno polissacarídico de *P. brasiliensis* elevou a sensibilidade da técnica para 90%<sup>86</sup>. Contudo, devido a sua baixa especificidade e às dificuldades metodológicas envolvidas, como a instabilidade das hemáceas e do complemento, esta técnica agora é raramente utilizada<sup>60</sup>.

A ID foi primeiramente utilizada no diagnóstico da PCM por Ferri<sup>87</sup> e permanece há 47 anos como método de escolha, empregado rotineiramente pelos laboratórios clínicos devido ao seu fácil procedimento, baixo custo operacional, sensibilidade entre 65% a 100%, especificidade e valor preditivo de 100%. Além disso,

esta técnica consente que os clínicos realizem o acompanhamento sorológico dos pacientes, verificando a diminuição dos títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, permitindo também avaliar a eficácia da terapia antifúngica<sup>62</sup>.

Na ID, quando se utiliza como antígeno filtrado de cultura obtido a partir de leveduras de *P. brasiliensis* frente a soros de pacientes com suspeita clínica de PCM, é possível detectar até três linhas de precipitação: linha 1 (perto do orifício do antígeno), linha 2 (posição intermediária) e linha 3 (perto do orifício do soro). A linha 1 é detectada em aproximadamente 95% a 98% dos soros de pacientes portadores de doença ativa, sendo a última a desaparecer após a instauração da terapia antifúngica<sup>88</sup>. A linha 2 tem sido identificada em 60% a 65% dos casos, sendo a segunda a desaparecer após o início do tratamento específico, enquanto a terceira linha tem sido observada em apenas 30% a 35% dos casos, sendo a primeira a desaparecer. O número de bandas observadas no ensaio de ID está intimamente relacionado à severidade da doença<sup>60,69</sup>.

Segundo Siqueira<sup>69</sup>, os resultados da ID podem variar devido a diferentes parâmetros, entre os quais a preparação antigênica utilizada, a forma da doença e o início do tratamento.

O teste de ELISA tem sido utilizado para a detecção de anticorpos em quase todas as micoses sistêmicas, senão em todas. Apesar disso, em relação ao imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose a técnica ainda oferece grandes porcentagens de reatividade cruzada, principalmente frente a soros de pacientes com histoplasmose, candidíase, doença de Jorge Lobo e, recentemente, frente a soros de pessoas aparentemente saudáveis, residentes em áreas endêmicas para PCM<sup>60,62,78</sup>.

O teste de ELISA para o sorodiagnóstico da PCM foi utilizado primeiramente por Arango<sup>89</sup> e depois, simultaneamente, por Camargo e cols.<sup>74</sup> e Mendes-Giannini e cols.<sup>90</sup>, que comprovaram a existência de reatividade cruzada frente a soros heterólogos. Entretanto, os autores demonstraram que a absorção dos soros de pacientes com PCM com células de *Candida albicans* ou *Histoplasma capsulatum* tornava a reação mais específica<sup>62</sup>.

Del Negro e cols.<sup>68</sup> avaliaram pelo método clássico de ELISA o perfil de reatividade de 43 amostras de soro de pacientes com doença ativa, verificando que soros de pacientes com a forma crônica unifocal apresentaram baixa densidade óptica, com três pacientes apresentando valores próximos ao *cut off*, observando ainda a existência de reatividade cruzada frente a soros de pacientes com doença de Jorge Lobo e histoplasmose.

Visando minimizar os altos índices de reatividade cruzada e, conseqüentemente, otimizar a especificidade da técnica de ELISA para o diagnóstico da PCM, Albuquerque e cols.<sup>78</sup> empregaram como antígeno a fração de 43 kDa de *P. brasiliensis* tratada com diferentes concentrações de metaperiodato de sódio, avaliando-se parâmetros como: a pré-absorção dos sorotestes com antígenos de *C. albicans* e/ou *H. capsulatum* e a diluição dos soros de pacientes com PCM com galactose. Entretanto, os autores obtiveram especificidade máxima de 84%, sugerindo que nenhum dos procedimentos adotados foi suficiente na eliminação da reatividade cruzada.

Técnicas imunoenzimáticas do tipo Western-Blot ou *immunoblotting* (IB) possuem alta sensibilidade e foram empregadas originalmente para caracterizar a resposta imune humoral aos antígenos de *P. brasiliensis*<sup>62</sup>.

Camargo e cols.<sup>79</sup> avaliaram por IB a capacidade discriminatória de exoantígeno obtido a partir de filtrado de cultura da amostra B-339 de *P. brasiliensis* frente a 97 soros de pacientes com PCM (25 soros de pacientes antes do tratamento antifúngico e 72 soros de pacientes na vigência de terapia específica) e a frente a soros heterólogos, bem como de indivíduos saudáveis residentes em zona endêmica para esta patologia. A análise dos resultados demonstrou que anticorpos anti-*P. brasiliensis* da classe IgG reagiram preferencialmente frente a quatro frações antigênicas: 70, 52, 43 e 20-21 kDa, sendo observado que a fração de 43 kDa (gp43) foi reconhecida por 100% dos soros de pacientes com PCM e a de 70 kDa (gp70), por 96%.

Mendes-Giannini e cols.<sup>64</sup> detectaram por *immunoblotting* a presença da gp43 em 28 soros de pacientes com PCM, divididos em três grupos. Grupo 1, constituído de 12 soros de pacientes portadores da forma juvenil, avaliados em três diferentes períodos: antes, 10 e 24 meses pós-tratamento. Grupo 2: cinco soros de pacientes com a forma crônica, que não se encontravam na vigência de tratamento. Grupo 3: seis soros de pacientes considerados clinicamente curados há mais de um ano. Soros de indivíduos

saudáveis foram utilizados como controle da reação. Em relação aos pacientes com PCM juvenil, verificou-se que 100% das amostras obtidas antes do início do tratamento reconheceram de forma específica a gp43 e que a partir do décimo mês de quimioterapia a detecção da mesma acontecia com menor frequência, tornando-se indetectável após 24 meses de tratamento. Observou-se que 100% dos soros de pacientes com PCM crônica reagiram frente à fração de 43 kDa e que a mesma não foi detectada por soros de pacientes considerados clinicamente curados.

Blotta e Camargo<sup>80</sup> avaliaram por IB 60 soros de pacientes com PCM, observando que 100% dos soros reconheciam de forma específica a gp43. Ortiz e cols.<sup>81</sup> demonstraram que o antígeno recombinante de 27 kDa era reconhecido por IB por 91% dos soros com PCM avaliados, não sendo observada reatividade cruzada frente a soros heterólogos. Este achado é de considerável interesse, visto que proteínas recombinantes fornecem uma fonte altamente reprodutível de antígenos definidos.

Takahachi e cols.<sup>82</sup> avaliaram por *immunoblotting* 78 soros de pacientes com suspeita clínica de PCM, que apresentaram ausência de reatividade pela ID. Os autores empregaram como antígeno filtrado de cultura da amostra B-339 de *P. brasiliensis*, observando que das 78 amostras, 51 (65,4%) reagiram de forma específica frente à gp43.

Segundo Del Negro e cols.<sup>91</sup>, são raros os casos de pacientes que apresentam ausência de reatividade pelas provas de ID e contraímunoelctroforese. Entretanto, quando isto ocorre e os soros são avaliados por *immunoblotting* os mesmos reagem frente à gp43.

Da Silva e cols.<sup>83</sup> avaliaram por *immunoblotting* 23 soros de pacientes com confirmação clínica e micológica de PCM e com ausência de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, pela ID, frente a duas preparações antigênicas distintas, observando que 95,4% dos soros reconheceram de forma específica a gp43 e 100%, gp70, descritas como marcadores sorológicos da doença.

Vidal e cols.<sup>92</sup> relatam o caso de um paciente com resposta sorológica atípica, ou seja, o não reconhecimento por *immunoblotting* da gp43; reagindo, contudo, frente à fração antigênica de 70 kDa, descrita na literatura como sendo reconhecida por aproximadamente 96% dos soros de pacientes com PCM<sup>79</sup>.

Os resultados de Vidal e cols.<sup>92</sup> e Da Silva e cols.<sup>83</sup> podem ser explicados, talvez, pelos achados de Berzaghi e cols.<sup>93</sup>, sendo que a ausência de reatividade à gp43 pelas provas de ID e IB se deva a não secreção/expressão desta molécula pela amostra fúngica responsável pela infecção dos pacientes; ou ainda pelos achados de Campos e cols.<sup>94</sup>, relacionados à existência de diferentes isoformas da molécula de 43 kDa.

Chamou a atenção de Neves e cols.<sup>95</sup> o fato de pacientes com PCM ativa apresentarem ausência de reatividade frente a antígenos de *P. brasiliensis* pela ID. Os autores observaram que estes pacientes continham baixos níveis de IgG e IgG1 específicas, quando comparados aos elevados níveis de IgG2 de pacientes com ID positivas. Os mesmos sugerem que a ausência de reatividade na ID pode estar relacionada à produção de IgG2 de baixa afinidade direcionada a epítomos glicídicos.

## **Molecular**

Bialek e cols.<sup>8</sup> utilizaram a técnica de Nested PCR para detectar fragmentos de DNA de *P. brasiliensis*, empregando uma seqüência do gene da gp43 como alvo. A PCR foi realizada com DNA obtido de homogenato de pulmão de 23 camundongos infectados com conídios de *P. brasiliensis*, DNA de camundongos não infectados e de camundongos infectados com *H. capsulatum*. Os autores observaram que os 23 homogenatos foram positivos pela técnica de Nested PCR, sugerindo que, pelo fato de ser uma metodologia sensível e específica, poderá ser utilizada no diagnóstico da PCM em amostras de tecido.

Gomes e cols.<sup>96</sup> relataram o emprego da PCR para a detecção de DNA de *P. brasiliensis* na saliva de 11 pacientes com a forma crônica da PCM. Segundo os autores, 100% das amostras analisadas foram positivas, apresentando uma banda de 0,6 kb.

Devido a sua alta sensibilidade e especificidade, é inevitável que a identificação molecular de fragmentos de DNA de *P. brasiliensis* pela PCR, com aplicabilidade diagnóstica, seja brevemente implantada para o



diagnóstico da paracoccidiodomicose.

### **Antígenos de *P. brasiliensis***

*P. brasiliensis* apresenta em sua constituição uma multiplicidade de componentes antigênicos<sup>97</sup>, alguns próprios da espécie e outros comuns aos demais fungos. Segundo Restrepo e cols.<sup>98</sup>, estes antígenos podem ser extraídos da parede celular do fungo, do conteúdo citoplasmático ou, ainda, do filtrado de cultura. Contudo, dados da literatura demonstram variabilidade na metodologia utilizada pelos diferentes laboratórios com o objetivo de produzir antígenos de *P. brasiliensis*<sup>58</sup>. Entre estas, pode-se citar: a escolha da amostra fúngica, tamanho do inóculo, meio de cultura, período, forma e temperatura de incubação. A grande heterogeneidade destes parâmetros muitas vezes interfere no produto final e compromete a especificidade, estabilidade e reprodutibilidade dos antígenos, características de vital importância no imunodiagnóstico da PCM e de outras micoses<sup>99,58,70</sup>. A reatividade cruzada, comumente observada nestes casos, pode ser explicada pela grande similaridade antigênica entre os fungos dimórficos, particularmente *H. capsulatum* e *Lacazia loboi*<sup>100,101</sup>.

Pesquisas visando à obtenção de antígenos de *P. brasiliensis* vêm sendo realizadas desde o início do século passado. Na década de 1920, Arêa Leão<sup>102</sup> obteve antígenos com o objetivo de utilizá-los na avaliação da imunidade humoral de pacientes com PCM. Lacaz<sup>103</sup> os obteve com a mesma finalidade; contudo, os antígenos não se conservaram. Fava Netto<sup>86</sup> relatou a obtenção de antígeno polissacarídico, empregando-o em ensaios de fixação de complemento e precipitação em tubos. Este mesmo antígeno foi utilizado para ensaios de intradermorreação, objetivando analisar a hipersensibilidade do tipo tardio (HTT).

A partir de 1960, as pesquisas relacionadas à caracterização de antígenos de *P. brasiliensis* apresentaram aumento significativo. Estudos foram realizados testando-se diferentes parâmetros, entre os quais podem ser citados: a natureza química, bem como diferentes concentrações dos nutrientes utilizados no preparo de meios sintéticos, pH, temperatura, período de incubação, amostras fúngicas utilizadas, condições de aeração e processamento do antígeno obtido<sup>104-108</sup>.

Um dos mais importantes avanços e contribuições ao estudo e caracterização de antígenos de *P. brasiliensis* foi a identificação e purificação da glicoproteína de 43 kDa, descrita como antígeno exocelular e imunodominante<sup>88</sup>. A gp43, porém, não é totalmente específica, visto que sua fração glicídica contém epítomos capazes de serem reconhecidos por soro heterólogo, principalmente os que contêm anticorpos anti-*H. capsulatum*<sup>100,101</sup>.

Dados da literatura indicam que a preparação antigênica adequada e com aplicabilidade no sorodiagnóstico deve conter, em sua composição, a molécula de 43.000 daltons<sup>80</sup>. Neste sentido, há necessidade de escolher adequadamente a amostra a ser utilizada para este propósito, pois, conforme demonstrado por Campos e cols.<sup>94</sup>, existem amostras de *P. brasiliensis* que não expressam gp43.

Berzaghi e cols.<sup>93</sup> relataram que as culturas de *P. brasiliensis* seriam compostas por diferentes clones, e por alguma razão apenas alguns destes expressariam a molécula de 43 kDa. Para avaliar esta hipótese, obtiveram clones de três diferentes amostras de *P. brasiliensis* (113, B-339 e 18), avaliando-os quanto à capacidade de expressar gp43. Os autores verificaram por *immunoblotting* que os exoantígenos produzidos a partir de clones das amostras 113 e 339 apresentavam gp43 e que dos 26 clones obtidos da amostra 18, quatro não secretavam esta molécula. Avaliando os clones não secretores de gp43 verificaram que após dez subcultivos, estes clones voltaram a expressar, de maneira extremamente variável, a glicoproteína de 43 kDa. Segundo os autores, este fenômeno pode ser possivelmente explicado por algum problema molecular no mecanismo de expressão da molécula de 43 kDa.

### **Considerações finais**

Mesmo após ter sido descrita há 100 anos, e apesar dos expressivos avanços que permitiram a melhor compreensão da epidemiologia, patogênese, diagnóstico clínico e laboratorial, a paracoccidiodomicose ainda apresenta no Brasil alta prevalência, altas taxas de mortalidade e letalidade, podendo ser considerada uma doença negligenciada.

## Referências bibliográficas

1. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. *Brazil Médico*. 1908;13:121-24.
2. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. *Brazil Médico*. 1908;15:141-44.
3. Lacaz CS. Paracoccidioidomicose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari E, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. São Paulo: Sarvier; 2002.
4. Lacaz CS. Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidioidomicose. Um pouco de sua história. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM. *Paracoccidioidomicose-Blastomicose Sul-Americana*. São Paulo: Sarvier-Eduso;1982.
5. Biblioteca Virtual Adolpho Lutz. Disponível em: <http://www.bvslutz.coc.fiocruz.br>.
6. Almeida FP. Estudos comparativos do granuloma coccidiótico nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. *An Fac Med S. Paulo*.1930;5:125-41.
7. Restrepo A. The Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*. 1985; 23(5):323-34.
8. Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, Najvar LK, Fothergill AW, Knobloch J, Graybill JR. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2000;38(8):2940-2.
9. San-Blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol*. 2002;40(3):225-42.
10. Lacaz CS. *Paracoccidioides brasiliensis*: Morphology; Evolutionary Cycle; Maintenance during Saprophytic Life; Biology; Virulence; Taxonom. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, USA. 1994.
11. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*. 1986;25:5-18.
12. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouer AS, Papaiodanou PM, Gouveia A, Camargo ZP.. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61(3):390-4.
13. Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*. 2001;39(3):233-41.
14. Calle D, Rosero DS, Orozco LC, Camargo D, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. *Epidemiol Infect*. 2001;126(2):309-15.
15. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública*. 2002;18 (5):1441-54.
16. Marques SA, Franco MF, Mendes RP, Silva NC, Baccili C, Curcelli ED, et al. Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic area of Botucatu (São Paulo - Brazil). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1983;25(2):87-92.
17. Guezelle E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. de heces de pinguino de la Antártida, res. B2. In: Resúmenes IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis; 1989; Caracas, Venezuela.
18. Shome SK, Batista AC. Ocurrência de *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. *Rev Fac Med Fed Ceará*. 1963;3:90-4.
19. Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva-G, Leite Maffei CM. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol*. 1998;36(1):37-42.
20. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Lacaz CS A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol*. 2000;38(3):185-91.
21. Ono MA, Itano EN, Mizuno LT, Mizuno EHF, Camargo ZP. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? *Med Mycol*. 2002;40(5):493-9.
22. Theodoro RC, Candeias JM, Araujo JPr, Bosco S, Macoris AS, Oadula LO, Franco M, Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol*. 2005;43(8):725-9.
23. Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco S, Macoris AS, Richini-Pereira VB. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol*. 2007;22:7:92.
24. Ferreira MS, Freitas LH, Lacaz CS, Del Negro GM, Melo NT, Garcia NM, Assis CM, Salebian A, Heins-Vaccari EM. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a

- dogfood probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. J Med Vet Mycol. 1990;28(3):253-6.
25. Grosse E, Tamsitt J. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia S.A. Sabouraudia. 1965;4:124-25.
  26. Naiff R, Barretto T. Novos registros de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasypus novemcinctus*). In: Proceedings Congresso Brasileiro Parasitologia; 1989; Rio de Janeiro, Brazil: Sociedade Brasileira de Parasitologia. Abstract 197.
  27. Naiff RD, Ferreira LC, Barret TV, Naiff MF, Arias JR. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1986;28(1):19-27.
  28. Bagagli E, Sabo A, Coelho KI et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in na endemic area of paracoccidioidomycosis. Am J Trop Med Hyg. 1998;58:505-12.
  29. Corredor GG, Castano JH, Peralta LA et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in na endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. Rev Iberoam Micol. 1999;16:216-20.
  30. Silva-Vergara ML, Martinez R. Role of the aramdillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 1999;144:131-33.
  31. Helder Barbosa F, Montenegro MR, Bagagli E. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). Med Mycol. 2003;41:89-96.
  32. Helder Barbosa F, Morais FV, Montenegro MR, Kuramae EE, Taylor JW, Montes B, Puccia R, Bagagli E. Sequence comparison of the internal transcribed spacer regions and gp 43 in *Paracoccidioides brasiliensis* for patients and armadillos *Dasypus novemcinctus*. J Clin Microbiol. 2003;41:5735-7.
  33. Cadavid D, Restrepo A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. Epidemiol Infect. 1993;111:121-33.
  34. Ricci G, Mota FT., Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco, M. Canine paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 2004;42:379-83.
  35. Farias MR, Werner J, Muro MD, Marues SA, Marques MEA, Franco MF, Ribeiro MG, Custodio CC, Condas LAZ, Bosco SMG, Bagagli E. Canine paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. Rev Inst Med Trop. 2005;47(14):64.
  36. Ono MA, Bracarense APFRL, Morais HAS, Trapp SM, Belitardo DR. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. Med Mycol. 2001;39(3):277-82.
  37. Fagundes R. Pesquisa da paracoccidioidomicose em cães (*Canis familiaris*) na região endêmica de Botucatu, São Paulo [Dissertação de Mestrado]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu; 2002.
  38. Gonzáles-Ochoa A. Classificacion clinica de las micoses. Rev Int Salubr Enferm Trop. 1956;16:1.
  39. San-Blas G, San-Blas F. Molecular aspects of dimorphism. Crit Rev Microbiol. 1984;11(2):101-27.
  40. Alquati SAB. *Paracoccidioides brasiliensis* não ocorre na forma endofítica em gramíneas da região de Botucatu-SP-Brasil. [Dissertação de Mestrado] Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu; 1999.
  41. Montenegro MR, Franco M. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro. Paracoccidioidomycosis. CRC, Boca Raton, USA, 1994.
  42. Restrepo A, Robledo M, Giraldo R, Hernandez H, Sierra F, Gutierrez F, Londono F, Lopez R. Calle G. The gamut of paracoccidioidomycosis. Am J Med. 1976;61(1):33-42.
  43. Lopez RC, Restrepo A. Spontaneous regression of pulmonary paracoccidioidomycosis. Mycopathol. 1983;83:187-9.
  44. Lacaz CS, Passos Filho MCR, Fava Netto C, Macarron R. Contribuição para o estudo da Blastomicose-infecção: inquérito com paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico radiológico dos paracoccidioidinos-positivos. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1959;1:245-59.
  45. Londero AT, Del Negro G. Paracoccidioidomicose. J Pneumol. 1986;12:41-60.
  46. Motta LC. Granulomatose paracoccidioica. An Fac Med São Paulo. 1935;11:293.
  47. Figueiredo F, Silva CL, Alves LMC, Rossil MA. Participation of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and polysacharides in the evaluation of granulomas. Braz J Med Biol Res. 1986;19:615.
  48. Londero AT. Epidemiologia. In: Paracoccidioidomicose (Blastomicose sul-americana). Del negro G, Lacaz CS, Fiorillo A. São Paulo: Sarvier-Edusp; 1982. p. 85-90.
  49. San-Blas G, San-Blas F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence.

- Mycopathol. 1977;62(2):77-86.
50. San-Blas G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationship. Mycopathol. 1982;79(3):159-84.
  51. Vicentini AP, Gesztesi J-L, Franco MF, De Souza W, De Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD.. Binding of *P. Brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. Infect Immun. 1994;62(4):1465-9.
  52. Lopes JD, Moura-Campos MC, Vicentini AP, Gesztesi JL, De Souza W, Camargo ZP. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. Braz J Med Biol Res. 1994;27(9):2309-13.
  53. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of this clinical forms. Rev Soc Bras Med Trop. 1987;20(2):129-32.
  54. Mendes RP. The Gamut of clinical manifestation. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A. Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton, Flórida, USA, 1994.
  55. Del Negro GMB, Lacaz CS, Zamith VA, Siqueira AM. General and clinical aspects: polar forms of Paracoccidioidomycosis, the disease in childhood. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A. Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton, Flórida, USA, 1994.
  56. Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso M, Montenegro MRG. Paracoccidioidomycosis. Bailliere's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases. 1989.
  57. Mendes-Giannini MJS, Melhem MC. Infecções fúngicas. In: Ferreira AW, Ávila SLM Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Guanabara-Koogan: São Paulo; 2001.
  58. Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Rev Iberoam Micol. 2000;17(2):41-8.
  59. Ferreira-da-Cruz MF, Francesconi-do Vale AC, Espinera MC, Wamke B, Galvão Castro BO. Study of antibodies in paracoccidioidomycosis: follow-up of patients during and after treatment. J Med Vet Mycol. 1990;28(2):151-7.
  60. Mendes-Giannini MJS, Del Negro GB, Siqueira AM. Serodiagnosis, In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A. Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton, Flórida, USA, 1994.
  61. Hamilton AJ. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii; current status and future trends. Med Mycol. 1998;36:351-64.
  62. Elias Costa MR, Da Silva Lacaz C, Kawasaki M, De Camargo ZP. Conventional versus molecular diagnostic tests. Med Mycol. 2000;38 Suppl 1:139-45.
  63. Bueno JP, Mendes-Giannini MJ, Del Negro GM, Assis CM, Takiguti CK, Shikanai-Yasuda MA. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation. J Med Vet Mycol. 1997;35(3):213-7.
  64. Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Masuda A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 1989;27(12):2842-5.
  65. Salina MA, Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Barraviera B, Mendes Giannini MJ. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. J Clin Microbiol. 1998;36(6):1723-8.
  66. Rodrigues MC, Cassaguerra CM, Lacaz CS Antigenemia in paracoccidioidomycosis. Probable demonstration of circulating antigen by counterimmunoelectrophoresis test. Preliminary report. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1984;26(5):285.
  67. Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Diez S, Rojas M, Tobon AM, Hay RJ, Restrepo A. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87-kilodalton determinant during and after antifungal therapy. J Clin Microbiol. 1998; 36(11):3309-16.
  68. Del Negro GM, Pereira CN, Andrade HF, Palacios SA, Vidal MSM, Charbel CE, Benard G. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. J Med Microbiol. 2000;49(1):37-46.
  69. Siqueira AM. Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidioidomicose. Caracterização do antígeno E<sub>2</sub> de *Paracoccidioides brasiliensis*. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1982.
  70. Del Negro GM, Garcia NM, Rodrigues EG, Cano MI, de Aguiar MS, Lirio Vde S, Lacaz CS. The

- sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1991;33(4):277-80.
71. Cano LE, Restrepo A. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1987;29:276-283.
  72. Franco M, Fava-Netto C, Chamma LG. Reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico da blastomicose sul-americana. Padronização da reação para comparação dos resultados com a reação de fixação de complemento. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1973;15:393-8.
  73. Do Valle AC, Costa RLB, Fialho Monteiro PC, Von Helder J, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2001;39(4):373-7.
  74. Camargo ZP, Guesdon JL, Drouhet E, Improvisil L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmunoelectrophoresis and erythro-immunoassay. *Mycopathol*. 1984;88(1):31-7.
  75. Camargo ZP, Gesztesi JL, Saraiva EC, Taborda CP, Vicentini AP, Lopes JD. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 1994;32(10):2377-81.
  76. Marques-da-Silva SH, Colombo AL, Blotta MH, Queiroz-Telles F, Balthazar AB, Lopes JD, de Camargo ZP. Diagnosis of Paracoccidioidomycosis by detection of antigen and antibody in bronchoalveolar lavage fluids. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13(12):1363-6.
  77. da Silva SH, Colombo AL, Blotta MH, Queiroz-Telles F, Lopes JD, de Camargo ZP. Diagnosis of neuroparacoccidioidomycosis by detection of circulating antigen and antibody in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4680-3.
  78. Albuquerque CF, da Silva SH, Camargo ZP. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1944-6.
  79. Camargo ZP, Unterkircher C, Travassos LR. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. *J Med Vet Mycol*. 1989;27(6):407-12.
  80. Blotta MHS, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 1993;31(3):671-6.
  81. Ortiz BL, Diez S, Uran ME, Rivas JM, Romero M, Caicedo V, Restrepo A, McEwen JG. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998;5(6):826-30.
  82. Takahachi G; Guilhermetti E; Silva JA; Svidzinski TIE. Importância do western blott no diagnóstico seguro da Paracoccidioidomicose. VII Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicose. 1999; Resumo B-01, p.87.
  83. Silva DF, Assis CM, Zamboni IM, Barreto LC, Kohara VS, Vicentini-Moreira AP. Use of immunoblotting assay improves the sensitivity of paracoccidioidomycosis diagnosis. Aceito para publicação no *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*.
  84. Fava Netto C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídeo. *Arq Cir Clin Exp*. 1955;18:197-254.
  85. Moses A. Fixação de complemento na blastomicose. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1916;8:68-70.
  86. Fava-Netto C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1961;21:99-194.
  87. Ferri RG. Estudo imunológico de antígenos intracelulares. *Hospital*. 1961;59:917-24.
  88. Puccia R, Schenkman S, Gorin PA, Travassos LR. Exocelular components of *Paracoccidioides brasiliensis*. Identification of a specific antigen. *Infect Immun*. 1986;53(1):199-206.
  89. Arango M, Oropeza F, Andreson O, Contreras C, Bianco N, Yarzabal L. Circulating immune complexes and in vitro cell reactivity in paracoccidioidomycosis. *Mycopathol*. 1982;79:153-58.
  90. Mendes-Giannini MJ, Camargo ME, Lacaz CS, Ferreira AW. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 1984;20(1):103-8.
  91. Del Negro GM, Benard G, Assis CM, Vidal MSM, Gardia NM, Otani C, Shikanai-Yasuda MA, Lacaz CS. Lack of reactivity of *Paracoccidioidomycosis* sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. *J Med Vet Mycol*. 1995;33:113-116.
  92. Vidal MS, Benard G, de Brito T, Dantas KC, Pereira CN, França FO, da Silva AM, Martins JE. Atypical serological response marked by a lack of detectable anti-gp43 antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 2005;43(6):3014-6.
  93. Berzaghi R, da Silva SH, de Camargo ZP. Variable gp43 secretion by *Paracoccidioides*

- brasiliensis clones obtained by two different culture methods. J Clin Microbiol. 2005;43:491-3.
94. Campos MC, Gesztesi JL, Vicentini AP, Lopes JD, Camargo ZP. Expression and isoforms of gp43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol. 1995;33(4):223-7.
95. Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MHS. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-affinity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Sep;10(5):802-7.
96. Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, de Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 2000;38(9):3478-80.
97. Yarzabal LA, De Albornoz MB, De Cabral NA, Santiago AR. Specific double diffusion microtechnique for the diagnosis of aspergillosis and paracoccidioidomycosis using monospecific antisera. Sabouraudia. 1978;16(1):55-62.
98. Restrepo A, Cano LE, Tabares AM. A comparison of mycelial filtrate - and yeast lysate-paracoccidioidin in patients with paracoccidioidomycosis. Mycopathol. 1983;84(1):49-54.
99. Silva DF. Análise da estabilidade de exoantígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças; 2005, p.169.
100. Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. J Clin Microbiol. 1991;29(8):1610-5.
101. Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. J Clin Microbiol. 1991;29(8):1610-5.
102. Arêa-Leão AE Réactions sérologiques dans l'actinomycose. Comp Rend Soc Biol. 1928;99:878-80.
103. Lacaz CS. Novos dados em relação a blastomicose sul-americana e seu agente etiológico. Rev Med Cir S. Paulo. 1949;IX:59-96.
104. Fava Netto C, Vegas VS, Sciammaméa IM, Guarnieri DB. Antígeno polissacarídeo do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultivo do *Paracoccidioides brasiliensis*, necessário ao preparo do antígeno. Rev Inst Adolfo Lutz. 1969;11:177-81.
105. Assis CM. Antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* solúveis em NaCl 0,85%. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1990, p.96.
106. Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. J Clin Microbiol. 1988;26(10):2147-51.
107. Casotto M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. J Clin Microbiol. 1990;28(6):1188-93.
108. Camargo ZP, Berzaghi R, Amaral CC, Silva SH. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. Med Mycol. 2003;41(6):539-42.

---

**Correspondência/Correspondence to:**

Adriana Pardini Vicentini Moreira  
Instituto Adolfo Lutz-Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses  
Seção de Imunologia  
Av. Dr. Arnaldo, 351 – 11º andar – Sala 1.109  
Te.: (+55) 11 3068-2899/2900  
Fax: (+55) 11 3068-2898  
E-mail: [apardini@ial.sp.gov.br](mailto:apardini@ial.sp.gov.br)



Bepa  
Av. Dr. Arnaldo, 351 - 1º andar, s. 135 – CEP: 01246-000  
São Paulo - SP - tels.: (11) 3066-8823 / 3066-8825  
e-mail: [bepa@saude.sp.gov.br](mailto:bepa@saude.sp.gov.br)

