

ATENUAÇÃO DA FORMA LEVEDURIFORME
DO *PARACOCIDIODES BRASILIENSIS* POR
IRRADIAÇÃO GAMA

Marina Cortez Demicheli

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências e Tecnologia das Radiações, Minerais e
Materiais, como requisito parcial à obtenção do Grau
de Mestre

Comissão Nacional de Energia Nuclear
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das
Radiações, Minerais e Materiais

ATENUAÇÃO DA FORMA LEVEDURIFORME DO
PARACOCIDIOIDES BRASILIENSIS **POR**
IRRADIAÇÃO GAMA

Marina Cortez Demicheli

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia das Radiações

Orientador: Dr. Antero Silva Ribeiro de Andrade



A presente dissertação de mestrado, intitulada "Atenuação da forma leveduriforme do *Paracoccidioides brasiliensis* por irradiação gama", de autoria de **MARINA CORTEZ DEMICHELI**, foi defendida e aprovada em 31 de março de 2006 pela Banca Examinadora abaixo assinada.

Belo Horizonte, 31 de março de 2006

Prof. Dr. Antero Silva Ribeiro de Andrade
CDTN - Orientador

Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Maria José Neves
CDTN

DEDICO

Ao meu orientador pelos ensinamentos e por me fazer crescer a cada dia.
Aos meus pais pelo amor, carinho, atenção e dedicação.
Aos meus irmãos por alegrarem a minha vida.
A minha tia por me dar força e coragem.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir chegar até aqui, sempre me iluminando.

Ao Prof. Dr. Antero, pelos ensinamentos, conselhos, atenção, carinho e amizade que me proporcionou durante esse período, estando sempre disponível; e também por ter me incentivado a desenvolver a capacidade científica.

Aos meus pais por serem o encanto de minha vida.

A tia Carminha pelo seu carinho e amor constantes.

Aos familiares pelo incentivo constantemente demonstrado.

A meus avós pelos olhares sorridentes.

Aos grandes amigos do Laboratório de Radiobiologia, Edinho, Estefânia, Luciana, Marcella, Priscilla e Nino pelo companheirismo, incentivo, paciência e importante ajuda na elaboração deste projeto, pela amizade e agradável convívio. Cada um de vocês foi essencial para a realização desse trabalho...sorrisos... lágrimas... testT.. .planilhas... camundongos...repiques...sítio...computador...palavras...amizade...amigo oculto...gargalhadas...artigos...primeiro lugar...besteiras...artigos...música...cada palavra tem um significado muito especial...Obrigado por fazerem parte da minha vida...

Aos amigos...Bruno...Kezia...Rhaine...Ariane...Flaviano...Vitor...Lucilene...Fred...

A Quel pela amizade, carinho e cuidado.

Aos importantes amigos de longa data, Sérgio, Mauro, Mena e Rafa pela amizade.

A Aninha, Ana Karine, Lili e Tati por deixarem a minha vida mais alegre.

A Sílvia por estar sempre ao meu lado e por alegrar a minha vida

A Nath pela amizade fraterna, pelas risadas, pelas saídas, pela ajuda na realização desse trabalho...mesmo que psicológica....

As pildas pela amizade inabalável.

A Vá e a Cíntia pela amizade sincera de longa data.

Aos grandes amigos do mestrado Andreza, Andreia, Paulinha, Guilherme, Janúbia, Jaquelinizinha, Nelson, Paulinho, Carlos, Fernando e Kássio pela amizade e pelas ajudas incansáveis com a física quântica, listas, aulas, apresentações...quanta saudade dos nossos lanches...

A Andreza por desde o começo ser um anjinho em minha vida.

Ao Ferracini por irradiar as amostras.

Aos amigos do CDTN pela agradável convivência.

A Prof. Dr. Cláudia Vilhena por me inserir no meio científico.

Ao Prof. Dr. Alfredo, pela disponibilidade de tempo e recursos para a realização dessa dissertação.

Ao Bê pelo carinho, alegria, pela ajuda na revisão de alguns itens e ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta e Dr. Nágila F. da Costa Secundino pelo auxílio na confecção das fotos da microscopia eletrônica, estando sempre disponíveis. Obrigado pela paciência, carinho, dedicação e disponibilidade incansável.

A Tati por me receber e me acompanhar durante o processo da microscopia eletrônica.

A Virgínia, Nívia ,Lenira e Romário pela ajuda sempre que necessária.

Ao Machado por me ajudar em todas as horas...por me alegrar...e por me "dar" fé...

A todos os professores da CPG CDTN\CNEN.

Aos demais colegas de mestrado.

Ao CDTN/CNEN pela oportunidade e pela bolsa de mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ATENUAÇÃO DA FORMA LEVEDURIFORME DO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* POR IRRADIAÇÃO GAMA

Marina Cortez Demicheli

Resumo

O *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente causador da paracoccidioidomicose, a micose sistêmica mais prevalente na América Latina. Este trabalho teve como objetivo atenuar a forma leveduriforme do *P. brasiliensis* por irradiação gama para estudos posteriores na pesquisa de vacina. Atualmente não há nenhuma vacina eficaz. As culturas do *P. brasiliensis* (cepa Pb-18) foram irradiadas com doses entre 0,5 e 8,0kGy. Depois de cada dose os fungos foram plaqueados e após 10 dias as unidades formadoras de colônias (UFC) contadas. A viabilidade das células irradiadas foi avaliada utilizando-se os corantes verde Janus e azul de metileno. A síntese de proteína foi analisada pela incorporação ³⁵S- Metionina. A comparação entre o perfil antigênico das leveduras controle e irradiadas foi feita através do Western blot e a atenuação da virulência foi analisada através da inoculação dessas leveduras em camundongos C₅₇Bl/J6 and Balb/c. Mudanças morfológicas nas leveduras irradiadas foram avaliadas por microscopia eletrônica (transmissão e varredura), e a integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. Na dose de 6,5kGy as leveduras perderam a capacidade reprodutiva. A viabilidade e a incorporação de ³⁵S- Metionina foi similar nos controles e nas células irradiadas com 6,5kGy, mas nesta dose as leveduras secretaram 40% menos proteína. O DNA apresentou-se degradado e esse dano não foi reparado O perfil do Western blot das leveduras controle, foi idêntico aos das leveduras irradiadas com 6,5kGy. Nenhuma UFC foi recuperada dos tecidos dos camundongos infectados com a levedura radioatenuada. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou significativas alterações no núcleo das células irradiadas. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que duas horas após a irradiação as células apresentavam-se

colapsadas e com dobras profundas na superfície das células, entretanto esses danos foram reversíveis. Concluiu-se que para as células leveduriformes do *P. brasiliensis* foi possível encontrar uma dose na qual o patógeno perdeu sua capacidade reprodutiva e virulência, enquanto reteve sua viabilidade, atividade metabólica e perfil antigênico.

Palavras - chave:

***Paracoccidioides brasiliensis*; irradiação gama; atenuação; vacina.**

ATTENUATION OF YEAST FORM OF *PARACOCIDIoidES BRASILIENSIS* BY GAMMA IRRADIATION

Marina Cortez Demicheli

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is the agent of paracoccidioidomycosis, the most prevalent mycosis in Latin America, and currently there is no effective vaccine. The aim of this work was to attenuate the yeast form of *P. brasiliensis* by gamma irradiation for further studies on vaccine research. *P. brasiliensis* (strain Pb-18) cultures were irradiated at doses between 0.5 and 8.0kGy. After each dose the fungal cells were plated and after 10 days the colony forming units (CFU) counted. The viability of the irradiated cells was measured using the dyes Janus green and methylene blue, and protein synthesis by incorporation of L-³⁵S methionine. The comparison between the antigenic profile of irradiated and control yeast was made by Western blot and the virulence evaluated by the inoculation in C₅₇Bl/J6 and Balb/c mice. Morphological changes in irradiated yeast were evaluated by electronic microscopy and DNA integrity by electrophoresis in agarose gel. At 6.5kGy the yeast lost the reproductive capacity. The viability and the incorporation of L-³⁵S methionine were the same in control and up to 6.5kGy irradiated cells, but 6.5kGy irradiated yeast secreted 40% less proteins. The Western blot profile was clearly similar in control and 6.5kGy irradiated yeast. No CFU could be recovered from the tissues of the mice infected with the radioattenuated yeast. At the dose of 6.5kGy the DNA was degraded and this damage was not repaired. The transmission electronic microscopy showed significant alterations in the nucleus of the irradiated cells. The scanning electronic microscopy showed that two hours after the irradiation the cells were collapsed or presented deep folds in the surface, however these injury were reversible. We concluded that for *P. brasiliensis* yeast

cells it was possible to find a dose in which the pathogen loses its reproductive ability and virulence, while retaining its viability, metabolic activity and the antigenic profile.

Key words

***Paracoccidioides brasiliensis*; gamma irradiation; attenuation; vaccine.**

LISTA DE FIGURAS	PAG
Figura 1- Colônias de <i>P. brasiliensis</i> crescendo no meio de plaqueamento	41
Figura 2- Curva padrão de dosagem de proteína	49
Figura 3- Curva de sobrevivência das leveduras de <i>P. brasiliensis</i> em função da dose de radiação gama	54
Figura 4- Curva de viabilidade das células de <i>P. brasiliensis</i> em função da dose da radiação gama	56
Figura 5- Incorporação ³⁵ S metionina nas células de <i>P. brasiliensis</i> em função da dose da radiação	57
Figura 6- Visualização da radioatividade incorporada nas proteínas do <i>P. brasiliensis</i>	58
Figura 7- Avaliação da secreção de proteínas em função da dose de radiação	60
Figura 8- “Western – Blot”	61
Figura 9- Avaliação da integridade do DNA em função da dose de radiação gama	62
Figura 10- Avaliação da integridade do DNA após a irradiação	64
Figura 11- Microscopia eletrônica de transmissão de célula não irradiada do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	67
Figura 12- Microscopia eletrônica de transmissão da célula irradiada do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> com a dose de 6.5kGy	67

Figura 13- Microscopia eletrônica de transmissão da célula não irradiada do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	68
Figura 14- Microscopia eletrônica de transmissão da célula irradiada com a dose de 6.5kGy do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	68
Figura 15- Microscopia eletrônica de transmissão da célula controle do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	69
Figura 16- Microscopia eletrônica de transmissão da célula irradiada com a dose de 6.5kGy do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	69
Figura 17- Microscopia eletrônica de varredura das células não irradiadas do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	70
Figura 18- Microscopia eletrônica de varredura das células não irradiadas do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	71
Figura 19- Microscopia eletrônica de varredura das células <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> . analisadas 2 horas após a irradiação com a dose de 6.5kGy	72
Figura 20- Microscopia eletrônica de varredura das células <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> . analisadas 2 horas após a irradiação com a dose de 6.5kGy	73
Figura 21- Microscopia eletrônica de varredura das células <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> . analisadas 48 horas após a irradiação com a dose de 6.5kGy	74
Figura 22- Microscopia eletrônica de varredura das células <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> analisadas 48 horas após a irradiação com a dose de 6.5kGy	75
Figura 23- Monitoramento da viabilidade das leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	76

LISTA DE TABELAS

PAG

Tabela 1- Recuperação das UFCs de camundongos C₅₇Bl/J6 infectados com leveduras radioatenuadas com a dose de 6,5kGy e controles de *P. brasiliensis* 65

Tabela 2- Recuperação das UFCs de camundongos Balb/c infectados com leveduras radioatenuadas com a dose de 6,5kGy e controles de *P. brasiliensis*. 65

Tabela 3 –Resistência relativa de espécies fúngicas à irradiação gama 80

Tabela 4 - Danos causados pela radiação gama no DNA de células de mamíferos 81

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs: Absorbância

BHI: "Brain heart infusion"

BSA: Solução de Albumina Bovina

CDTN: Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear

U.F.C.: Unidades formadoras de colônias

Co : Cobalto

DAB: Diamino Benzidina

DNA: "Desoxiribonucleic Acid"

EDTA: "Ethylenediaminetetraacetic Acid"

kDa: Quilodalton

kGy: Kilo Gray

LIG: Laboratório de irradiação gama

NCM: Membrana de Nitrocelulose

OMS (WHO): Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

Pb: *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS: Tampão salina fosfato (Phosphate buffered saline)

PCM: Paracoccidioidomicose

PMSF: "Phenylmethylsulphonylfluoride"

q.s.p.: quantidade suficiente para

SDS - PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS

TAE: O tampão Tris / Ácido Acético /EDTA

TEMED: N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina

	SUMÁRIO	Pag.
RESUMO		VII
ABSTRACT		IX
LISTA DE FIGURAS		XI
LISTA DE TABELAS		XIII
LISTA DE ABREVIATURAS		XIV
I INTRODUÇÃO		17
I.1 - Evolução dos conhecimentos sobre a Paracoccidioidomicose - Um pouco da sua história		18
I.2 -Paracoccidioidomicose		19
I.3 - <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>		23
I.4 - Formas Clínicas		25
I.5 - Diagnóstico		26
I.6 - Tratamento		27
II. JUSTIFICATIVA		30
III. OBJETIVOS		36
IV. MATERIAIS E MÉTODOS		38
IV.1 - Cultura		39
IV.2 -Irradiação gama		39
IV.3 - Contagem de Células		39
IV.4 - Avaliação da capacidade de reprodução (crescimento) ds leveduras		39
IV.5 - Avaliação da viabilidade celular		40

IV.5.1 - Método modificado de coloração com verde Janus	40
IV.5.2 - Método de coloração com o Azul de Metileno	40
IV.6 - Acompanhamento da viabilidade das leveduras irradiadas	42
IV.7 - Avaliação do metabolismo de síntese de proteínas	42
IV.8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)	43
IV.9 - Avaliação da secreção de proteína <i>in vitro</i>	44
IV.10 - Avaliação do perfil antigênico nas leveduras irradiadas	44
IV.11 - Avaliação a atenuação da virulência	46
IV.11.1 - Avaliação a atenuação da virulência utilizando camundongos C ₅₇ Bl/J6	46
IV.11.2 - Avaliação a atenuação da virulência utilizando camundongos Balb/c	47
IV.12 - Dosagem de proteína	47
IV.13 - Avaliação da fragmentação do DNA nas leveduras irradiadas	48
IV.14 - Microscopia eletrônica de varredura	48
IV.15 - Microscopia eletrônica de transmissão	50
IV.16 - Animais experimentais	51
V. RESULTADOS	52
VI. DISCUSSÃO	78
VII. CONCLUSÃO	85
VIII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

I - Introdução

I-1 - Evolução dos conhecimentos sobre a Paracoccidioomicose

Um pouco da sua história

A paracoccidioomicose é uma micose profunda provocada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*.

A expressão paracoccidioomicose foi consagrada em 1971, em Medellín (Colômbia), mas já era utilizada por Jordan (1942). Vários pesquisadores brasileiros, como Del Negro *et al.* (1954) e Aguiar Pupo (1965), já haviam, igualmente, usado tal designação.

A paracoccidioomicose (PCM) foi descoberta em 1908, na cidade de São Paulo, por Adolpho Lutz, que descreveu os aspectos clínicos e patológicos das lesões mucocutâneas de dois pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia. Descreveu a morfologia peculiar do fungo observado no material das lesões, isolou o agente em cultivo puro, inoculou cobaias com a amostra obtida e assinalou a natureza dimórfica do fungo. Descoberta a doença, iniciou-se uma fase na qual iriam predominar os registros de casos para o estudo de suas principais características.

Ainda em São Paulo, Alfonso Splendore começa, também, a estudar a doença, cultivando seu agente etiológico, enquadrando-o em um gênero já conhecido em Micologia – *Zymonema*, chamando a espécie de *Zymonema brasiliense*. Entre 1909 e 1912, esse microbiologista e patologista cuidou, de modo minucioso, da paracoccidioomicose, tanto do ponto de vista clínico, quanto do experimental.

A partir de 1930, é crescente a literatura pertinente à doença, com importantes e significativos eventos. Aprofunda-se o estudo da parte experimental e imunológica; graças aos avanços da imunologia contemporânea; aparecem drogas para o tratamento da paracoccidioomicose. O agente etiológico, revelando-se como fungo dimórfico, passa a ser

estudado por microscopia eletrônica; pesquisas citoquímicas e outras técnicas, que evidenciaram sua estrutura antigênica e mostraram sua complexidade. Alguns aspectos da epidemiologia e da etiopatogenia passam a ser conhecidos.

A histoquímica aprimorou-se e novos processos de coloração passaram a ser utilizados para melhor detectar o fungo nas lesões. Estabeleceram-se, em animais de laboratório, modelos experimentais da infecção paracoccidióidica, correlacionando tipo de lesão histopatológica com imunidade humoral e celular.

A infecção experimental foi obtida, inicialmente, por Montenegro (1927), em cobaias inoculadas por via testicular.

A paracoccidioidomicose infecção foi detectada por Mackinnon (1953). Daí em diante, inquéritos imuno-alérgicos passaram a ser realizados em diversas partes do Brasil e no exterior, com tipos diferentes de antígenos, dificultando a interpretação dos resultados.

I-2 - Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção granulomatosa crônica e sistêmica, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (ALMEIDA, 1930). A distribuição geográfica da paracoccidioidomicose é limitada à América Latina, onde ocorre desde o México (23°N) até a Argentina (34°S) (BRUMMER *et al.*, 1993). Entretanto, a doença não ocorre em todos os países situados dentro desses limites.

A PCM é considerada a mais importante micose sistêmica da América Latina. As áreas endêmicas situam-se em regiões de florestas tropicais ou subtropicais com temperaturas médias entre 14-20°C, precipitações entre 800 a 2.000mm/ano e umidade relativamente alta (LONTERO; MELO, 1998).

O Brasil apresenta a maior incidência da doença e é responsável por 80% dos casos já reportados mundialmente, seguido da Colômbia, Venezuela e Guatemala (LACAZ, 1982). É a oitava endemia mais freqüente no país, podendo ser encontrada em quase todos os estados (BARBOSA, W; DAHER, R.R, 1991). As regiões mais acometidas são o Sudeste, o Centro-Oeste e o Sul (BLOTTA *et al.*, 1999).

Uma estimativa feita por Restrepo (2001), mostra que, em uma região endêmica, na qual vivem 90 milhões de pessoas, por volta de 10 milhões poderiam estar infectadas (BORGES - WALMSLEY, 2002).

Indivíduos que exercem atividades agrícolas constituem a maioria dos pacientes com a micose ativa, mas a infecção, que era praticamente rural, vem atingindo zonas urbanas, atacando todas as profissões, mesmo em indivíduos que nunca saíram dos grandes centros (LACAZ, 1982; BRUMMER *et al.*, 1993). Pode acometer indivíduos de todas as faixas etárias (LACAZ, 1991), mas as formas progressivas da doença ocorrem, mais freqüentemente, em adultos entre 30 e 50 anos (HAMDAN; ROCHA, 1987; LONTERO; MELO, 1998).

A porta de entrada mais freqüente do fungo é o trato respiratório superior, através da inalação dos conídios, sendo os pulmões e as vias aéreas superiores os primeiros locais acometidos. A partir daí, pode haver disseminação do fungo para outros locais, tanto por via hematogênica quanto linfática (VERONESI, 1997).

Qualquer órgão do corpo pode ser acometido; porém, as manifestações mais importantes são observadas nos pulmões, linfonodos, supra-renais, ossos, tubo digestivo e sistema nervoso (COSTA, 2005).

Na maioria dos indivíduos, os mecanismos naturais de defesa podem eliminar o agente ou estabelecer um equilíbrio entre o hospedeiro e o agente. Neste último caso, o fungo pode permanecer no foco primário viável na forma latente. Entretanto, em uma minoria dos casos, a doença progride a partir do foco pulmonar (MARQUES, 1995).

Um estudo sobre a mortalidade por paracoccidiodomicose no Brasil, realizado por Coutinho (2002) entre os anos 1980 e 1995, mostrou que, nesse período, essa micose apresentou a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas.

Segundo Coutinho (2002), a taxa de mortalidade média anual foi de 1,45/milhão de habitantes e a distribuição espacial não foi homogênea entre as diferentes regiões e estados. A doença prevaleceu como endemia nas áreas não metropolitanas.

A taxa de mortalidade predominou em indivíduos do sexo masculino, com 84,75% dos óbitos e na proporção de 5:1. A faixa etária entre 30 e 59 anos foi a mais atingida, seguida de indivíduos com 60 anos ou mais. É uma doença rara em pediatria, sendo descritos aproximadamente 5% dos casos nessa faixa etária (CASTRO; DEL NEGRO, 1976; FARHAT *et al.*, 1986).

O estudo mostrou que a taxa de mortalidade pode ser considerada como indicador para definir a doença como importante agravo de saúde no Brasil (COUTINHO *et al.*, 2002).

As doenças que possuem taxa de mortalidade maior que da paracoccidiodomicose (1,45/milhão de habitantes) são: doença de Chagas (42,39), tuberculose (42,39), AIDS (31,23), malária (5,53), esquistossomose (4,77), sífilis (1,84) e hanseníase (1,81). As taxas de mortalidade por milhão de habitantes de outras micoses sistêmicas durante o mesmo período foram: cryptococcosis (0,33); pneumocystosis (0,13) e histoplasmosis (0,04) (COUTINHO *et al.*, 2002).

Permanecem, até o momento, vários problemas a serem solucionados, tais como o micro habitat exato do *P. brasiliensis*, o modo de viver saprofítico na natureza e a relação do fungo com o seu ambiente (RESTREPO, 1985).

Essas questões são importantes e, até que elas se esclareçam, a prevenção da paracoccidiodomicose continuará sendo uma tarefa difícil.

Por não ser de notificação compulsória, a prevalência e incidência reais da doença são desconhecidas, assim como suas formas latentes (LACAZ, 1982) e os dados disponíveis se baseiam em publicações independentes (HAMDAN; ROCHA, 1987).

Sua importância em saúde coletiva relaciona-se a custos sociais e econômicos derivados, não apenas da doença em atividade, que ocorre em indivíduos na sua fase mais produtiva de vida, mas também das freqüentes seqüelas secundárias a essa micose, motivo comum da incapacitação para o trabalho. De forma geral, a história natural dessa doença sem intervenção terapêutica específica evolui para o óbito.

É relatada maior prevalência no sexo masculino, sendo sugerida uma proteção das mulheres à doença relacionada ao estrógeno, que inibe a transformação do micélio em levedura (MARTINEZ, 1997). Esse fato é, entretanto, questionado por alguns autores (ANDRADE, 1983) que acreditam que um fator ocupacional de exposição ao fungo seja responsável por essa diferença do acometimento entre os sexos. É importante notar, entretanto, que na primeira década de vida, quando não há maturidade sexual, tanto a infecção quanto a doença ocorrem em ambos os sexos e não se observa diferença significativa entre os membros nessa faixa etária quanto à reação à paracoccidiodina (HAMDAN; ROCHA, 1987).

I-3 - *Paracoccidioides brasiliensis*

O *P. brasiliensis* é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose. É um fungo termodimórfico que passa por mudança complexas *in vivo*. O fungo apresenta-se filamentosos (micélio) quando cultivado à temperatura ambiente ou a 25°C, e leveduriforme quando cultivado a 35-37°C ou em parasitismo. A transformação de uma fase para outra é reversível.

A forma micelial do fungo apresenta-se no meio ambiente como conídios de diferentes tipos (intercalares, septadas, pedunculares e terminais).

Os conídios são uninucleados, mas, quando incubados a 37°C, transformam-se em leveduras, resultando em células multinucleadas. O pequeno tamanho dos conídios (3,5 a 5,0µm) é compatível com a disposição alveolar.

A forma infectante (micelial), apresenta-se em forma de conídio, que se reproduz por formação de vesículas (DUARTE *et al.*, 1997). No homem, o fungo apresenta-se na forma de células arredondadas (leveduriforme), com ou sem gemulação, podendo atingir 1 a 3 micrômetros (BAZAN *et al.*, 1991).

As colônias da fase leveduriforme são compostas por células de tamanho variado, geralmente ovaladas. A forma mais característica dessas células possui múltiplos brotamentos ao redor de uma célula mãe, sendo esse aspecto conhecido como roda de leme, o que permite a identificação do fungo em culturas ou amostras clínicas (lavado bronco-alveolar e secreção ganglionar) (BRUMMER *et al.*, 1993; REIS; COLOMBO, 1999).

A infecção tem início com a penetração do conídio pelos pulmões, por inalação, causando a infecção primária, geralmente assintomática, embora alguns pacientes manifestem sinais e sintomas clínicos. Eventualmente, a infecção primária pode ocorrer pela penetração do conídio

através de lesões na pele ou mucosas. A infecção atinge o sistema monocítico-fagocitário, por via hematogênica ou linfática, e se espalha, estabelecendo-se a fase de latência. Essa fase pode variar de um curto espaço de tempo a décadas, até o fungo se tornar invasivo e provocar a doença (BAZAN *et al.*, 1991).

A doença só poderá aparecer, agora na sua forma crônica, por reativação de focos quiescentes, onde permanecem fungos viáveis, com propagação para outros órgãos. Os fatores envolvidos na reativação do foco residual ou quiescente ainda não foram plenamente estabelecidos.

Os conídios ou partículas infectantes têm tamanho diminuto e atingem facilmente os alvéolos pulmonares em 12 horas, quando ocorre sua transformação em leveduras que passam a se multiplicar por brotamento múltiplo. A partir do pulmão acontece a disseminação, que pode ser linfática ou hematogênica e, na dependência da imunidade do hospedeiro, vai ou não desenvolver a doença. Estima-se que 10% da população brasileira tenha contato com o fungo, mas apenas uma minoria irá desenvolver a doença (BRUMMER *et al.*, 1993; REIS; COLOMBO, 1999).

O *P. brasiliensis* afeta o pulmão, a língua, a mucosa da nasofaringe e da orofaringe, a pele, os nódulos linfáticos, o fígado, o baço, o rim, as glândulas adrenais e até osso e olhos (CAMPOS *et al.*, 1996). Na fase crônica, o fungo pode atingir o sistema nervoso (BAZAN *et al.*, 1991).

O homem era tido como o único hospedeiro do *P. brasiliensis*, até o recente reconhecimento de tatus (*Dasypus novemcinctus*), naturalmente infectados em regiões endêmicas para essa micose (LACAZ, 1991). A relevância desse achado na epidemiologia da PCM ainda não foi completamente elucidada.

Ainda hoje se desconhece o *habitat* natural desse fungo. Contudo, os dados epidemiológicos indicam que o mesmo está presente na natureza (BRUMMER *et al.*, 1993; REIS; COLOMBO, 1999). O *P. brasiliensis* já foi isolado de forma esporádica em amostras de solo do Brasil e em outros países (NEGRONI, 1966; ALBORNOZ, 1971; FERREIRA *et al.*, 1990; VERGARA *et al.*, 1996).

I-4 - Formas Clínicas

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa que apresenta duas formas distintas: a forma juvenil ou subaguda e a tipo adulta ou crônica (COLOMBO, 1999). Acomete especialmente os adultos jovens, sendo que o pulmão é o principal órgão afetado.

A doença apresenta uma ampla gama de manifestações clínicas e patológicas que vão, desde as formas localizadas ou benignas, até àquelas graves e disseminadas.

A PCM pode manifestar-se associada a outras doenças. Merece destaque a associação com tuberculose, que acontece em torno de 10% dos casos (DEL NEGRO, 1982; LONDERO; RAMOS, 1990; BORGES – WALMSLEY, 2002).

A forma aguda ou subaguda representa 3% a 5% dos casos e caracteriza-se pela rápida disseminação do fungo para órgãos do sistema retículo-endotelial. (CASTRO; DEL NEGRO, 1976; RESTREPO, 1992; REIS; COLOMBO, 1999). Ocorre hipertrofia do baço, fígado, linfonodos e disfunção da medula óssea. A maioria dos doentes são jovens, sendo essa forma mais grave e com alta taxa de mortalidade, em torno de 10% (LONDERO; MELO, 1983; TERRA *et al.*, 1991). Lesões cutâneas podem ocorrer, demonstrando disseminação hematogênica (BRUMMER *et al.*, 1993).

A forma crônica (do adulto) da doença, na maioria dos casos, inicia-se com lento e progressivo envolvimento pulmonar. Ocorre em mais de 90% dos casos de PCM, sendo mais

freqüente em indivíduos masculinos na faixa de 29 a 49 anos. Nessa forma, a doença pode levar anos até ser diagnosticada (LONDERO, 1986; FRANCO *et al.*, 1989; LONDERO; RAMOS, 1990). Pode ter apresentação uni ou multifocal. Em 25% dos casos, o único órgão envolvido é o pulmão (unifocal) e no restante dos casos o acometimento pode ser sistêmico (multifocal) (RESTREPO *et al.*, 1976; LONDERO; SEVERO, 1981; LONDERO, 1986; FRANCO *et al.*, 1989; LONDERO; RAMOS, 1990).

Além dos pulmões, pele e mucosas são atingidas freqüentemente. Por ser uma doença polimórfica, acomete qualquer órgão ou sistema (RESTREPO *et al.*, 1976; LONDERO, 1986; FRANCO *et al.*, 1989; LONDERO; RAMOS, 1990). Na forma pulmonar localizada, o quadro clínico é semelhante ao da tuberculose (BRUMMER *et al.*, 1993).

É importante destacar que o homem é um hospedeiro resistente ao *P. brasiliensis*, uma vez que o número de pacientes expostos ao fungo é bem maior que o número de pacientes que desenvolve a doença. Alguns fatores como idade, sexo ou fatores genéticos, podem estar relacionados ao processo de reativação (LACAZ, 1991).

I-5 - Diagnóstico

O diagnóstico é baseado na demonstração do fungo, seja pelo exame direto ou por cultura, não havendo dificuldades para o isolamento do agente em amostras clínicas. O exame direto permite a visualização de formas leveduriformes com múltiplos brotamentos. A positividade desses métodos é de 85% a 100% (BRUMMER *et al.*, 1993). O crescimento em cultura é lento, 20 a 30 dias. É necessário que o cultivo seja feito à temperatura de 37°C para se demonstrar o dimorfismo do fungo (REIS; COLOMBO, 1999). Durante o crescimento em cultura pode ocorrer contaminação por bactérias, especialmente escarro e lavado bronco-alveolar, dificultando a identificação do *P. brasiliensis*. Os exames de histologia revelam reação granulomatosa, sendo

possível visualização de elementos leveduriformes com múltiplos brotamentos (REIS; COLOMBO, 1999).

Os testes cutâneos (paracoccidina) podem ser negativos nas formas disseminadas de doença. Podem tornar-se positivos durante o tratamento, indicando uma recuperação da imunidade celular; contudo, têm grande valor quando são usados para demarcar áreas endêmicas nos estudos populacionais (MARTIN; LOPEZ, 1989; SANTOS; PEDROSA, 1990; MUSSATTI, PERAÇOLI, SOARES, 1994; REIS; COLOMBO, 1999).

I-6 - Tratamento

Até 1940, a paracoccidiodomicose era considerada uma doença incurável.

Atualmente, são empregadas três drogas principais no tratamento da PCM: as sulfonamidas, a anfotericina B e derivados de imidazol (BRUMMER *et al.*, 1993).

O tratamento proposto é prolongado, não existindo um consenso de qual deve ser a duração ideal do mesmo.

Na ausência de tratamento a doença é, geralmente, fatal. A suspensão precoce causa altos índices de reativação da doença e isso tem feito com que o tratamento seja demorado (em média, de seis meses a dois anos). Atualmente, sugere-se que o tratamento seja dividido em duas fases: (i) ataque - que visa ao controle dos sinais clínicos e (ii) manutenção - que visa reduzir as chances de recidiva da doença. Podem ser utilizados os derivados sulfamídicos, derivados azólicos e, nas formas graves, a anfotericina B (BRUMMER *et al.*, 1993; MENDES, NEGRONI, ARECHVALA, 1994; REIS; COLOMBO, 1999).

Os derivados sulfamídicos são usados, com sucesso, desde a década de 40 (RIBEIRO, 1940). Atualmente, a forma mais amplamente utilizada é a associação de sulfametoxazol-

trimetoprim, que apresenta boa tolerância e poucos efeitos colaterais (urticária, náusea vômitos, leucopenia e anemia megaloblástica) (RESTREPO; ARANGO, 1980; STEVEN; VO, 1982). Estudos demonstram que a eficácia dessa combinação supera os 80% e que o insucesso está relacionado à não adesão ao tratamento (BARRAVIERA *et al.*, 1989; REIS; COLOMBO, 1999).

A anfotericina B é usada nas formas graves de PCM, desde a década de 50 (LACAZ; SAMPAIO, 1958). Geralmente, é utilizada no início do tratamento desses casos e, posteriormente, é substituída pela associação sulfametoxazol-trimetoprina, embora nem todos os autores concordem com esse esquema (DEL NEGRO, 1974; DILLON *et al.*, 1986; BORELLI, 1987). É a droga de escolha nos casos de resistência clínica às outras drogas utilizadas. Apresenta eficácia comprovada, embora sejam freqüentes as reações adversas: náuseas, vômitos, febre, tremor, nefrotoxicidade, hipocalcemia, alterações eletrocardiográficas, anemia e disfunção hepática (BRUMMER *et al.*, 1993; REIS; COLOMBO, 1999).

O tratamento da PCM com cetoconazol foi iniciado em 1978 com excelentes resultados, com taxa de cura em 90% dos casos, mas com efeitos colaterais (ginecomastia e diminuição da libido) que restringem seu uso (RESTREPO *et al.*, 1985; NEGRONI, 1987). É sugerido que novos estudos são necessários para avaliar a eficácia dessa droga em prevenir recidivas (REIS; COLOMBO, 1999).

O itraconazol vem sendo usado com excelentes resultados, iguais ou superior aos do cetoconazol, e com menos efeitos colaterais, sendo considerado, por diversos autores, a droga de escolha, embora estudos mais longos sejam necessários para avaliar a incidência de recidiva com seu uso (NEGRONI *et al.*, 1987; MUNERA *et al.*, 1989; NARANJO *et al.*, 1990; BRUMMER *et al.*, 1993; REIS; COLOMBO, 1999).

O fluconazol é outra alternativa, com resultados promissores, principalmente nos casos com acometimento do sistema nervoso central, por sua penetração no tecido cerebral (DIAZ *et al.*,1992;REIS;COLOMBO,1999).

II - Justifivativa

A imunidade protetora para o *P. brasiliensis*, assim como para outros fungos, tem sido correlacionada à presença de uma resposta imune celular. Nenhum antígeno capaz de conferir proteção foi ainda descrito, embora o principal antígeno, uma glicoproteína de 43 kDa (gp43), tenha demonstrado atividade potencial como antígeno protetor. Resultados preliminares indicam que a imunização com esse antígeno reduz as lesões e a gravidade da inflamação nos pulmões (DIXON et al., 1998). A imunização com um peptídeo de 15 aminoácidos derivado da gp43 (TABORDA et al., 2004) ou com vacina de DNA, construída a partir do gene da gp43 (PINTO et al., 2000), também produziu redução significativa da infecção nos pulmões.

Em adição a gp43, frações obtidas por cromatografia de troca iônica de extrato de *P. brasiliensis*, denominadas F0 e FII, foram capazes de conferir proteção a camundongos (DINIZ et al., 2004). Mas, até o momento, nenhuma vacina eficaz foi reportada para a paracoccidiodomicose, nem para qualquer outra micose de importância médica (DEEPE, 2004).

Muitas vacinas bem sucedidas foram obtidas utilizando-se patógenos atenuados, hipovirulentos ou avirulentos. A vacina BCG utilizada na prevenção da tuberculose é um dos exemplos mais conhecidos. A vacina é constituída de uma cepa atenuada do *Mycobacterium bovis*. A atenuação foi obtida acidentalmente após 231 passagens *in vitro*, durante um período de 13 anos, quando alterações da morfologia e a perda gradual da virulência foram verificadas. Entretanto, a imunogenicidade não foi alterada. Após a demonstração da segurança essa vacina tem sido largamente utilizada para a imunização em humanos, sem complicações sérias (ANDRADE, T.C.B. et al., 2005).

O potencial da radiação ionizante como uma tecnologia capaz de atenuar patógenos para utilização como vacina é conhecida desde os anos 50 (TAYLOR *et al.*, 1986). A atenuação pela radiação ionizante é uma alternativa atraente, pois parasitas e microrganismos, adequadamente

irradiados, freqüentemente perdem sua capacidade patogênica, mantendo seus aspectos morfológicos e conseguindo estimular uma resposta imunológica específica. Em alguns casos, os patógenos radioatenuados são, por razões ainda não esclarecidas, mais imunogênicos que os controles não irradiados (WALLES; KUSEL, 1992).

Um exemplo instrutivo é o da vacina preparada a partir de cercarias radioatenuadas de *Schistosoma mansoni*. Esta estimula um nível de imunidade e proteção que supera qualquer formulação baseada em proteínas purificadas ou recombinantes (COULSON, 1997). A vacina análoga de esporozoítos irradiados de *Plasmodium falciparum* apresenta resultados similares (SILVIE et al., 2002). Esta foi testada em voluntários humanos e estimulou o desenvolvimento de imunidade protetora (HOFFMAN et al., 2002).

As vacinas citadas permitiram que os mecanismos que induzem e mantêm uma resposta imune protetora, bem como os antígenos protetores, fossem conhecidos. Além do mais, elas podem formar a base para o desenvolvimento de vacinas recombinantes (COULSON, 1997).

O paradigma de uma vacina radioatenuada bem sucedida é a empregada para o *Dictyocaulus viviparus*, que provoca bronquite parasitária em bovinos. Essa vacina tem sido utilizada com êxito desde sua introdução, em 1958 (TAYLOR et al., 1986).

Em escala comercial, em adição a vacina de *D. viviparus*, larvas irradiadas têm sido empregadas no controle da bronquite parasitária provocada por *D. filaria sp* em carneiros e cabras (SHARMA et al., 1988), e na imunização contra *Ancylostoma caninum* em cães (VINAYAK et al., 1981).

A imunização protetora tem sido obtida em animais de laboratório para vários parasitas. HIRAMOTO et al. (2002), utilizaram para imunização de camundongos taquizoítos de

Toxoplasma gondii irradiados. Os autores obtiveram, após o desafio com cistos, um aumento no período de sobrevivência dos animais imunizados. Os taquizoítos irradiados perderam sua capacidade de reprodução, mas mantiveram seu metabolismo respiratório, a capacidade de invadir células e de sintetizar proteínas e ácidos nucléicos.

RIVIER et al. (1993), demonstraram que a inoculação subcutânea, em camundongos, de promastigotas de *Leishmania major*, irradiadas com 1500Gy, conferiu um alto grau de proteção contra novo desafio com linhagens de *L. major*. Para alcançar a máxima imunoproteção, as *leishmanias* irradiadas deviam permanecer viáveis, mantendo a capacidade de transformação da forma promastigota para amastigota.

BONETTI et al. (2002), demonstraram que cepas de *Leishmania amazonensis* irradiadas com a dose de 1500Gy, apresentaram total destruição do material nuclear e citoplasmático, gerando perda de capacidade metabólica e impedindo o parasita de respirar ou de se reproduzir. No entanto, sua membrana plasmática não sofreu alterações morfológicas. Bonetti realizou um ensaio de produção de anticorpos em camundongos, inoculando parasitas irradiados com a dose de 1500Gy, parasitas irradiados com uma dose menor (800Gy) não eficiente para a esterilização das *leishmanias*, e parasitas normais. Os camundongos que foram inoculados com parasitas irradiados com a dose de 1500Gy apresentaram uma produção de anticorpos mais eficiente dos que os camundongos que receberam imunização com parasitas irradiados com dose de 800Gy. Além do que, os camundongos inoculados com parasitas irradiados com a menor dose adoeceram antes mesmo do desafio, enquanto que os camundongos imunizados com o outro grupo de protozoários não adoeceram em momento algum do ensaio. Esses resultados apresentaram a radiação gama como uma ferramenta para esterilizar protozoários para estudos posteriores de tratamentos e vacinas contra a leishmaniose cutânea.

CREANEY et al. (1995), tentaram a imunização de carneiros contra *Fasciola hepática*, utilizando metacercárias irradiadas. Quando desafiados, nenhuma redução quanto ao número de vermes e produção de ovos foi verificada nos animais vacinados. Além disso, a vacinação parece ter afetado o desenvolvimento da população de parasitas, resultando em reduzido dano hepático durante a migração.

JENKINS et al. (1997) irradiaram oocistos de *Eimeria máxima* com a dose de 170Gy. Essa dose não afetou a capacidade de penetração do esporozoíto na mucosa intestinal das aves, mas impediu a sua divisão por reprodução assexuada. Os oocistos irradiados, acondicionados em cápsulas de gelatina, foram utilizados para alimentar um grupo de galinhas. Um segundo grupo de galinhas, controle, recebeu a gelatina com oocistos não irradiados. Ambos os grupos apresentaram uma proteção dose dependente em relação às aves não imunizadas. Entre os grupos, que receberam os dois tipos de oocistos, não foi observada diferença na redução do tamanho das lesões. Além disso, as aves que receberam os parasitas irradiados tiveram um ganho de peso maior.

RIBEIRO et al. (1997), utilizaram a irradiação gama com o intuito de abolir a replicação de cepas do *Plasmodium falciparum* no interior de eritrócitos. Para isto, utilizaram duas doses, 200Gy e de 100Gy. A dose maior foi capaz de abolir a replicação das cepas; já a com menor dose houve uma diminuição da parasitemia, mas não houve a inativação do parasita.

Em adição aos exemplos citados, resultados satisfatórios foram obtidos para *Onchocerca volvulus* (PRINCE et al., 1992), *Brugia malayi* (YATES; HIGASHI, 1986), *Brugia pahangi* (CHUSATTAYANOND; DENHAM, 1986), *Toxocara canis* (ABO-SHEHADA et al., 1991), *Nippostrongylus brasiliensis* (WEDRYCHOWICZ et al., 1984), *Trichinella spiralis* (AGYEI-FREMPONG; CATTY, 1983) e *Ascaris suum* (URBAN; TROMBA, 1982).

Atualmente não existem vacinas aprovadas para prevenção ou tratamento de micoses de importância médica. Somente uma vacina profilática, que consistia de esférulas de *Coccidioides immitis* inativadas por formalina, foi testada em humanos. Infelizmente, essa vacina não conferiu proteção em uma triagem randomizada (PAPPAGIANIS, 1993). A necessidade de vacinas para as micoses humanas determina a necessidade de se pesquisar novas alternativas e a utilização de fungos radioatenuados nunca foi explorada para esse propósito.

Nosso objetivo neste trabalho foi verificar a possibilidade de se obter a atenuação de células leveduriformes do *P. brasiliensis* por irradiação gama, para posterior utilização na pesquisa de vacina contra a paracoccidioidomicose.

III-1- Objetivo geral

Atenuar a forma leveduriforme do *Paracoccidioides brasiliensis* por irradiação gama para posterior utilização na pesquisa de vacina contra a paracoccidioidomicose.

III-2 – Objetivos específicos

- Determinar a dose absorvida necessária para eliminar a capacidade de reprodução das leveduras
- Avaliar a viabilidade celular das leveduras irradiadas
- Avaliar o metabolismo de síntese de proteínas das leveduras irradiadas.
- Avaliar a secreção de proteínas *in vitro* das leveduras irradiadas
- Verificar a integridade do DNA das leveduras irradiadas.
- Comparar o perfil antigênico nas leveduras irradiadas e controle.
- Verificar a presença de alterações na morfologia das leveduras irradiadas.
- Avaliar a perda de virulência das leveduras irradiadas.
- Verificar a estabilidade das leveduras irradiadas.

IV – Materiais e Métodos

IV-1-Cultura

A cultura do *P. brasiliensis* virulento, Pb 18, foi mantida em meio sólido ágar BHI. do com 1% de glicose. O fungo foi mantido a 35°C, em tubos inclinados, e repicado a cada 10 dias.

A virulência do fungo foi recuperada após a três passagens em camundongos Balb/c. As passagens são de 30 dias de infecção, com recuperação das unidades formadoras de colônias (UFC) dos pulmões, em meio BHI ágar suplementado com soro fetal bovino (4%) e gentamicina (5%)

IV-2-Irradiação gama

As culturas de *P. brasiliensis*, em meio sólido e em placas de Petri, foram irradiadas com doses variando de 0,5 a 8,0kGy. As irradiações foram realizadas no Laboratório de Irradiação Gama do CDTN (LIG), na presença de oxigênio, em fonte uniforme de ⁶⁰Co. A taxa de dose foi de 954Gy/hora.

IV-3-Contagem das células

Após cada dose de irradiação, as placas, foram removidas do irradiador e as culturas ressuspensas em PBS.

A solução de células (20µL) foi misturada com 20µL da solução de contagem (NaCl 0,9%,formaldeído 4%,tween 20%), vigorosamente agitada no vortex e o número de células contado em câmara de Neubauer.

IV-4-Avaliação da capacidade de reprodução (crescimento) das leveduras

Após cada dose de irradiação, as placas, em duplicata, foram removidas do irradiador e as culturas ressuspensas em 1mL de PBS. As células foram contadas, em câmara de Neubauer e inóculos com concentrações crescentes, variando de 10³ a 10⁷ células foram plaqueadas. As

placas foram incubadas por 10 dias a 35°C e as unidades formadoras de colônias (UFC) contadas (Figura 1). O meio utilizado para o plaqueamento foi o BHI ágar suplementado com 4% de soro fetal bovino e 5% de extrato de *P. brasiliensis*. Para preparação do extrato, 5 mL de pellet de cultura, de 5 dias de crescimento, foram transferidos para 45 mL de água destilada e autoclavados por 15 minutos a 121°C. O material foi deixado 3 dias em repouso. Após este período o material foi centrifugado a 1000 rpm a 4°C, por 15 minutos e o sobrenadante recolhido.

IV.5-Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade foi verificada pelos métodos descritos a seguir:

IV-5.1- Método modificado de coloração com verde Janus

A solução de células (20µL) foi incubada com 20µL da solução do corante (verde Janus 0,05 %). Após 8 minutos de incubação a proporção de células viáveis foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Por este método as células viáveis permanecem descoradas e as células mortas se coram em azul (SANO *et al.*, 1994).

IV-5.2-Método de coloração com o Azul de Metileno

A solução de células (20µL) foi incubada com 20µL da solução do corante (azul de metileno 0,05mM , diluído em PBS, pH 7,2). Após 10 minutos de incubação a proporção de células viáveis foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Por este método as células viáveis permanecem descoradas e as células mortas se coram em azul (MILLS, 1941).



Figura 1-Colônias de *P. brasiliensis* crescendo no meio de plaqueamento BHI ágar suplementado com 4% de soro fetal bovino e 5% de extrato de *P. brasiliensis*.

IV-6-Acompanhamento da viabilidade das leveduras irradiadas

A viabilidade foi acompanhada durante 30 dias. As colônias foram mantidas a 35°C, em meio sólido ágar BHI suplementado com 1% de glicose.

O método utilizado para verificar a viabilidade foi o método modificado de coloração com verde Janus (descrito no item IV-5-1).

IV-7-Avaliação do metabolismo de síntese de proteínas

Para estimar a capacidade de síntese de proteínas das leveduras irradiadas, estas foram ressuspendidas em PBS e inoculadas em meio líquido (BHI) contendo ³⁵S- Metionina. Para 10 mL de meio com inóculo inicial de 10⁷ células foram acrescentados 10 µCi de ³⁵S- Metionina . As células foram incubadas por 16 horas a 35°C. Após essa etapa, a cultura foi centrifugada, á 3000 rpm, a 4°C por 15 minutos, e as leveduras coletadas. As células foram lavadas por 3 vezes em PBS e rompidas com pérolas de vidro, no tampão Tris (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0), contendo 1 mM de PMSF, 1 mM de iodoacetamida, 1 mM de EDTA e 1mM de pepstatina. Para a lise foram realizados seis ciclos de 30 segundos no vortex, com o material permanecendo 1 min no gelo entre cada ciclo. Logo em seguida, a cultura foi centrifugada, á 3000 rpm, a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e a quantidade de proteína determinada pelo método de Lowry (LOWRY, 1951).

A radioatividade incorporada às proteínas foi determinada pela contagem em cintilador líquido. Para tal uma solução contendo 0,7 mg de proteína foi adicionados a 4,5mL de líquido de cintilação (Insta-Gel Plus). As contagens foram realizadas no analizador de cintilação líquida e expressas em contagens por minuto (cpm).

A contagem por cintilação líquida é um dos métodos mais sensíveis e amplamente utilizados para detecção e quantificação da radioatividade. O termo contagem por cintilação

líquida é empregado porque os cintiladores usados estão dissolvidos em um solvente apropriado contendo o material radioativo a ser ensaiado.

O processo de cintilação líquida é baseado na conversão de parte da energia cinética de uma partícula ionizante em fótons. De uma maneira muito simplificada, a absorção de energia pelo cintilador resulta na formação de moléculas excitadas que liberam fótons de luz retornando rapidamente ao seu estado fundamental. O número de fótons emitidos é linearmente relacionado à energia da radiação absorvida.

O material foi também concentrado e submetido à eletroforese (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida 7,5%. A coloração foi realizada pelo corante comassie blue. Em seguida, o gel foi seco e analisado para a visualização das bandas protéicas com radioatividade incorporada. A análise da radioatividade incorporada foi analisada pelo sistema de “Phosphoimage”; e o tempo de exposição do gel no cassete foi de 20 dias. Em ambos os procedimentos foram utilizadas leveduras não irradiadas como controle, submetidas ao mesmo processo.

IV-8-Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS- PAGE)

A análise eletroforética das proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida na concentração de 12,5%. As amostras com 20 µg de proteína foram fervidas por 5 minutos em tampão da amostra (SDS 6%; Glicerol 30%; Azul de bromofenol 0,006%; Tris/HCL 0,1875M; pH 7.0). Foi preparado o gel de separação contendo 10mL de acrilamida (50%), 0,4mL de SDS (10%), 15mL de Tris-HCl 1 M (pH 8.8), 13,7mL de água destilada, 0,5mL de persulfato de amônio (1,5%) e 25µL TEMED. Logo após a polimerização deste, preparou-se o gel de concentração 5% constituído de 1,9mL de poliacrilamida (50%), 0,1mL de SDS (10%), 1,25mL de Tris-HCl 1 M (pH 6.8), 7,3mL de água destilada, 0,35mL de persulfato de amônio (1,5%) e 10µL TEMED. Após a polimerização do gel as amostras foram aplicadas nas canaletas do gel e a

separação foi feita utilizando-se o tampão de corrida constituído de Tris (0,025 M), glicina (0,192 M) e SDS (0,1%), pH 8.3 em uma voltagem constante de 80 V, por aproximadamente 90 minutos. As placas de gel foram coradas com Coomassie Blue.

O gel foi submerso em solução do corante Coomassie Blue 0,1% (1g de Coomassie Blue, 50 mL de metanol, 5 mL de ácido acético para 100 mL de água). Após 1 hora, o gel foi lavado uma vez com água destilada e logo em seguida submerso na solução descorante (100 mL de metanol, 200 mL de ácido acético para 2 L de água destilada). Após a visualização das bandas, lavou-se o gel 2 vezes com água destilada.

IV-9-Avaliação da secreção de proteínas *in vitro*

As leveduras controle e irradiadas foram transferidas para 10 mL do meio Yeast Nitrogen Based (SIGMA), 0,65%, suplementado com 2% de glicose. O inóculo inicial foi de 10^7 células/mL. As células foram incubadas por 4 dias, a 35°C sob agitação constante. Depois foram sedimentadas por centrifugação e o sobrenadante coletado. Este foi liofilizado e o pó resultante dissolvido em 0,5mL do tampão borato 0,01 M (pH 8,0). A solução foi dialisada contra o mesmo tampão utilizando-se uma membrana de diálise de corte 1000 Da. Finalmente, a concentração de proteína na solução foi determinada pelo método de Lowry.

IV-10-Avaliação do perfil antigênico nas leveduras irradiadas

O perfil anigênico das leveduras irradiadas foi avaliado através do Western Blot utilizando-se soro de pacientes com paracoccidioidomicose (PCM). As leveduras irradiadas e controles foram rompidas e centrifugadas como descrito no item IV-7. O sobrenadante foi coletado e 20µg de cada amostra foi submetida a eletroforese (SDS-PAGE), com subsequente transferência para membranas de nitrocelulose.

O gel foi retirado da cuba de eletroforese e incubado duas vezes durante 30 minutos com o tampão Tris/Glicina/Metanol. Durante a segunda incubação de 30 minutos, iniciou-se o preparo da membrana de nitrocelulose (NCM). Equilibrou-se a NCM com o tampão Tris/Glicina/Metanol durante 10-20 minutos.

O cassete de transferência foi preparado depois que as membranas, papéis de filtro (Mini-trans blot Bio Rad) e esponjas ficaram em repouso durante 15 minutos em tampão de transferência (15,5 mM de Tris base, 120 mM glicina e metanol 20%).

O gel foi colocado em contato com a membrana pré-umidecida evitando formação de bolhas de ar. O sistema (esponja, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro, esponja) foi montado dentro do cassete. O conjunto foi colocado dentro da cuba de transferência e submerso no tampão. No fundo da cuba foi colocada uma barra magnética. O sistema foi submetido a 37 V durante 16 horas, dentro de câmara fria sob agitação. Após esse período, a transferência foi confirmada, corando a membrana com solução de Ponceau S (Sigma) 1%. Após a verificação da transferência, a membrana foi descorada imediatamente com água destilada.

Uma vez que as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose, a detecção das proteínas específicas foi processada usando-se anticorpos de soro de pacientes com PCM.

Antes da adição dos anticorpos, a membrana foi coberta com agente de bloqueio (PBS 0,15 M, 2% Caseína durante 1 hora a temperatura ambiente sob agitação). Depois do bloqueio de sítios inespecíficos a membrana foi lavada três vezes durante 5 minutos com água destilada sob agitação.

Depois das 3 lavagens, a membrana foi incubada com soro que sofreu diluição 1:100 em PBS 0,15M. Foi utilizado um pool de 12 soros, onde retirou-se 30µL de cada, totalizando 360µL que foram adicionados a 36mL PBS. A membrana foi incubada durante 1 hora sob agitação com a solução de soro diluída. Após essa etapa, a membrana foi lavada 3 vezes com água destilada sob agitação a temperatura ambiente.

Após a etapa de lavagem, a membrana foi incubada com o anticorpo conjugado a peroxidase (ovelha anti IgG humana) diluído em PBS 1:10.000. A incubação durou 1 hora, a temperatura ambiente e foi feita sob agitação. A membrana foi lavada 3 vezes como descrito nas etapas anteriores.

Para revelação das bandas, a membrana foi recoberta por uma solução contendo: tampão PBS (0,15M) 10mL, 6mg DAB, 100µL de cloreto de níquel 5,5% e 10µL de peróxido de hidrogênio. A reação foi realizada no escuro e a membrana foi lavada com água destilada para que a reação fosse paralisada.

IV-11-Avaliação a atenuação da virulência

Foi realizada utilizando-se dois procedimentos diferentes: em um utilizamos camundongos C₅₇BI/J6 e no outro experimento utilizamos camundongos Balb/c.

IV-11.1- Avaliação a atenuação da virulência utilizando camundongos C₅₇BI/J6

Camundongos machos, C₅₇BI/J6 foram inoculado pela via intra traqueal, com 50µL de PBS contendo 10⁵ leveduras irradiadas com 6,5kGy. Os controles foram inoculados com o mesmo número de leveduras não irradiadas virulentas. Após 30 dias os animais foram sacrificados e os órgãos (pulmão, fígado e baço) foram removidos, pesados, homogeneizados e lavados 3 vezes em PBS. O macerado foi ressuspendido em PBS e a solução final foi plaqueada

no meio descrito no item IV-1. As placas foram incubadas durante 20 dias a 35°C e as unidades formadoras de colônias contadas. O resultado foi expresso em número de unidades formadora de colônias (UFCs) de *P. brasiliensis* por grama de tecido por camundongo em cada grupo experimental (n=3).

IV-11.2- Avaliação a atenuação da virulência utilizando camundongos Balb/c

Camundongos machos, Balb/c foram inoculado, através da artéria ocular, com 50 µL de PBS contendo 10^5 leveduras irradiadas com 6,5kGy. Os controles foram inoculados com o mesmo número de leveduras não irradiadas. Após 45 dias os animais foram sacrificados e os órgãos (pulmão, fígado e baço) foram removidos, pesados, homogeneizados e lavados 3 vezes em PBS. O macerado foi ressuspensionado em PBS e a solução final foi plaqueada no meio descrito no item IV-1. As placas foram incubadas durante 20 dias a 35°C e as unidades formadoras de colônias contadas. O resultado foi expresso em número de unidades formadora de colônias (UFCs) de *P. brasiliensis* por grama de tecido por camundongo em cada grupo experimental (Grupo 1 n=4 contendo as leveduras irradiadas e Grupo 2 n=3 contendo as leveduras controle).

IV-12-Dosagem de proteína

Primeiramente foi construída uma curva padrão para dosagem de proteína com o reagente de Folin-fenol (Lowry et al 1951). As soluções de albumina bovina foram preparadas nas concentrações preparadas em concentrações crescentes de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; e 1,0mg de proteína por mL

Juntamente com a curva padrão, 100µL da amostra a ser dosada foi adicionada 1mL do reagente c (100 mL de solução A (Na₂CO₃, NaOH); 1 mL de solução B1(CuSO₄.5H₂O) e 1 mL de solução B2 (Tartarato de Na e K) e incubada por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 100µL reagente Fenol (Folin-ciocalteau 1:2 em água destilada) e a solução foi

novamente incubada por 30 min. A leitura das amostras foram realizadas no espectrofotômetro a 550nm.

IV-13-Avaliação da fragmentação do DNA nas leveduras irradiadas

A extração DNA nas células irradiadas e controles foram realizadas seguindo o protocolo do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). Foi extraído o DNA das leveduras, controle e irradiadas . As leveduras foram irradiadas com doses de 2,0kGy - 4,0kGy - 6,5kGy. Na dose de 6,5kGy, o DNA foi extraído duas horas após a irradiação e 48 horas após a irradiação.

A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria utilizando-se comprimento de onda de 260 nm. O DNA das leveduras foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (5µg/mL). Utilizou-se o tampão TAE 1X (0,4M Tris/HCl pH 8,0; 50mM acetato de sódio; 10mM EDTA) e a corrida eletroforética se deu à voltagem constante de 100 Volts por 40 minutos. As bandas de DNA foram visualizadas em um trasiluminador de luz ultravioleta.

IV-14-Microscopia eletrônica de Varredura

As análises foram realizadas no Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou - CPqRR/FIOCRUZ.

Amostras do fungo irradiado com a dose de 6,5kGy (imediatamente após a irradiação e 48 horas após a irradiação) e controle foram preparadas da seguinte maneira:

As placas de petri contendo o os fungos irradiados e o fungo nativo, foram lavada em PBS 3 vezes e logo em seguida foram fixadas em glutaraldeído 2,5%. O material foi deixado no fixador durante 18 horas, e em seguida lavado 3 vezes em PBS. Em seguida, vários fragmentos foram cortados contendo o ágar e o fungo.

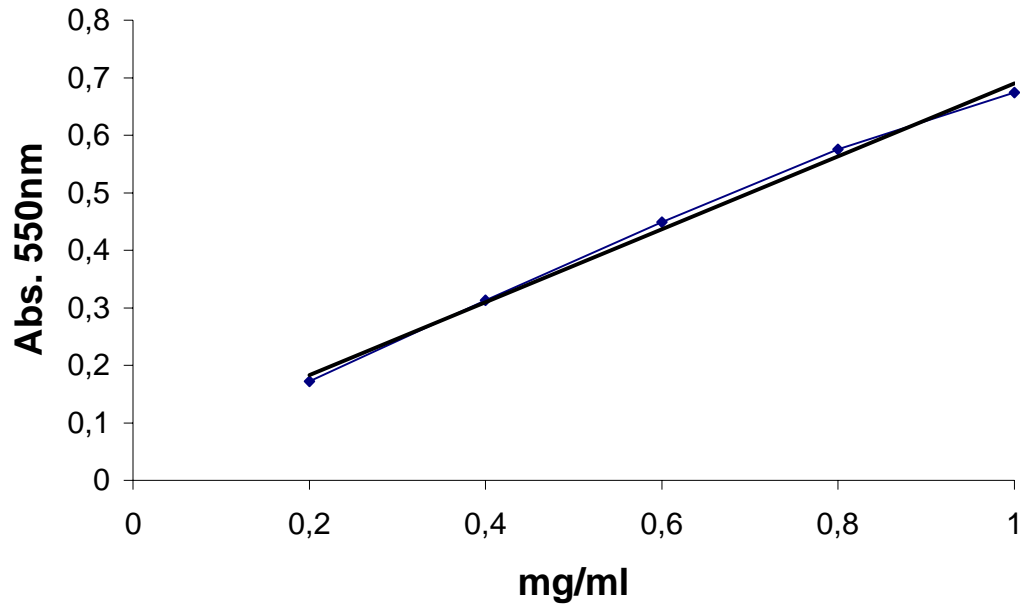


Figura 2- Curva padrão dosagem de proteína A equação da reta obtida $y=0,63335x + 0,0568$ e o $R^2=0,9958$.

Esses fragmentos foram lavados em PBS 1M; e em seguida fixadas com tetróxido de ósmio 2,5% diluído em água destilada e 1,6% de ferricianeto de potássio durante 2 horas. Após esta etapa os fragmentos foram lavados em PBS e subsequentemente desidratados em uma série de etanol. Primeiramente os fragmentos foram desidratados durante 10 minutos em concentrações crescentes de 20% a 90%, e finalmente desidratados por 3 vezes na concentração de 100% durante 10 minutos. Após essas desidratações os fragmentos foram desidratados em acetona 100% e levados para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs*, com a ajuda de uma fita de carbono colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura JSM-5600.

IV-15-Microscopia Eletrônica de Transmissão

As análises foram realizadas no CEMEL – Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG.

Após o cultivo do fungo em meio apropriado, as células foram lavadas por três vezes em PBS. Entre cada lavagem as células foram centrifugadas a 1500rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Amostras do fungo irradiado com a dose de 6,5kGy (duas horas após a irradiação e 48 horas após a irradiação) e controle foram preparadas da seguinte maneira:

Primeiramente o pellet foi lavado por 3 vezes, em seguida o mesmo foi ressuspendido e fixado em Karwosky nud (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5%) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 e deixado “overnight”. A solução foi lavada por 3 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4 e centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm. Incluiu no ágar a 4% e cortou os fragmentos. Os fragmentos foram fixados em seguida com tetróxido de ósmio 1%, tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4 por 1 hora a 4°C.

Após esta etapa os fragmentos foram lavados por 3 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4 e subsequentemente desidratadas em uma série de álcool. Primeiramente os fragmentos foram desidratados durante 15 minutos em concentrações crescentes de 50%, 70% e 80%, em seguida desidratados por 2 vezes na concentração de 95%, durante 10 minutos. Finalmente desidratados 3 vezes na concentração de 100% por 10 minutos . Após essas desidratações os fragmentos foram desidratados 2 vezes em acetona 100% durante 15 minutos. Após essas etapas os fragmentos foram infiltrados em mistura Epon/acetona (2:1) “overnight”.

IV-16-Animais Experimentais

Os camundongos machos Balb/c e C₅₇BI/J6, com 7 semanas, foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os experimentos feitos com estes animais foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Imunologia Celular do Dr. Prof. Alfredo Góes do ICB da UFMG, onde este possui licença para trabalhar com os mesmos.

V-Resultados

Primeiramente, determinou-se a dose em que as leveduras perdem a capacidade de reprodução. A capacidade de reprodução das leveduras foi monitorada através do método de plaqueamento. Nesse método, as colônias formadas pelo crescimento de células individuais são visualizadas e contadas. Obviamente, somente células com capacidade de reprodução preservada podem formar colônias.

As culturas receberam doses de irradiação que variaram de 0,5 a 8,0kGy. Através do método de plaqueamento, verificou-se que as leveduras perdem sua capacidade de reprodução com dose de 6,5kGy, ou seja, a partir de 6,5kGy não houve mais crescimento ou formação de colônias (Figura 3). Esse experimento foi repetido diversas vezes e nunca obteve-se colônias com essa dose, mesmo utilizando grandes inóculos (10^7 células) e tempos de incubação (40 dias). Em doses abaixo dessa, foi observada a formação de colônia de forma dose-dependente. A dose de 6,0kGy provocou uma redução de 5 ciclos log₁₀ no número de colônias. O segmento final da curva apresentou um comportamento não linear, “cauda”, freqüentemente descrita em curvas de sobrevivência com radiação e outros tipos de estresse (DICKSON, 2001). Esse segmento representa uma sub-população de leveduras com resistência aumentada à radiação.

Para analisar a viabilidade das células irradiadas foram utilizados os corantes verde Janus e azul de metileno. Pode-se observar que, segundo essas metodologias, as células que foram irradiadas até 6,5kGy permaneceram viáveis (Figura 4).

O corante verde Janus avalia a integridade da membrana plasmática. Quando esta se encontra intacta, as células excluem o corante e permanecem descoradas. Quando a membrana perde sua integridade, a permeabilidade seletiva também é perdida; assim o corante penetra na célula e esta passa a apresentar uma coloração verde azulada.

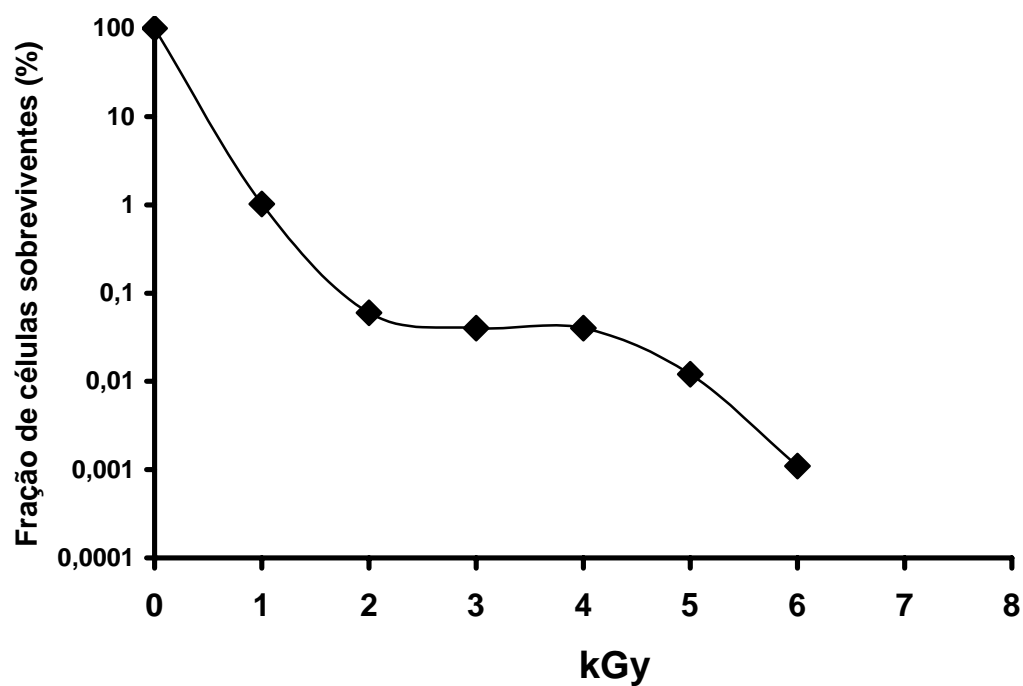


Figura 3-Curva de sobrevivência das leveduras do *P. brasiliensis* em função da dose de radiação gama.

As culturas foram irradiadas com doses variando de 0,5 a 8,0kGy. A partir de 6,5kGy não foi observado o crescimento de colônias. Para maiores detalhes, consulte Material e Métodos.

O azul de metileno avalia o metabolismo celular energético. Este corante muda sua coloração em função do seu estado de oxidação. Quando está reduzido, permanece incolor e quando oxidado adquire a coloração azulada. Portanto, quanto a célula está respirando ou fermentando, são produzidas coenzimas reduzidas, $\text{NADH} + \text{H}^+$ e FADH_2 na respiração e $\text{NADH} + \text{H}^+$ na fermentação, que reduzem o corante mantendo as células incolores. Quando estas estão mortas, ficam coradas em azul.

Podemos verificar, pelas curvas de viabilidade da figura 4, que houve uma concordância entre as duas metodologias.

O próximo parâmetro avaliado foi o metabolismo de proteínas nas leveduras irradiadas. Foi medida a capacidade de síntese e secreção de proteínas. A síntese de proteínas foi analisada através da incorporação de ^{35}S metionina (Figura 5). Os resultados mostraram que as leveduras irradiadas com até 6,5kGy mantiveram o metabolismo de síntese de proteínas em níveis similares ao controle não irradiado.

A incorporação de ^{35}S - Metionina nas proteínas da levedura irradiada com 6,5kGy foi confirmada pela visualização das bandas radioativas em gel de poliacrilamida através do sistema “Phosphoimage” (Figura 6).

A secreção de proteínas (Figura 7) foi avaliada incubando as leveduras irradiadas e controles em meio de cultura sem proteínas e outras macromoléculas, e após 4 dias foi determinada a concentração de proteína no meio. Foi verificado que as leveduras irradiadas com 6,5kGy secretaram 40% menos proteínas que o controle não irradiado.

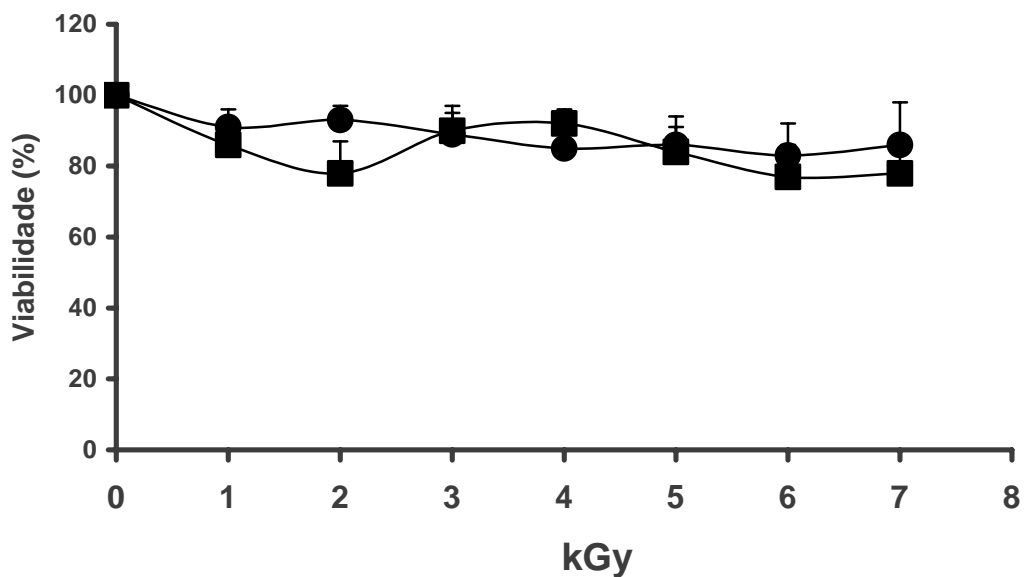


Figura 4-Curva de viabilidade das células de *P. brasiliensis* em função da dose de radiação gama.

As barras indicam desvio padrão. ● Verde Janus, ■ azul de metileno. Para maiores detalhes, consulte Material e Métodos.

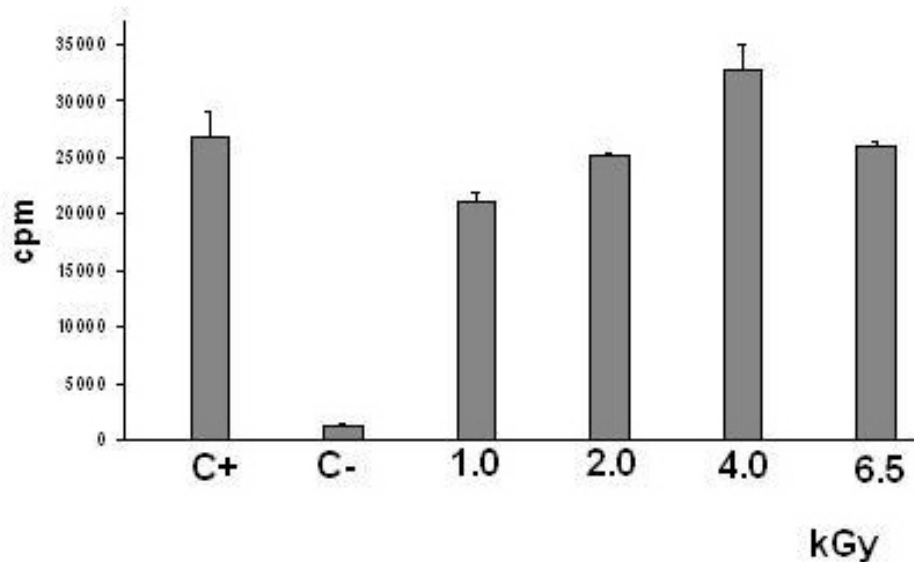


Figura 5-Incorporação ^{35}S metionina nas células de *P. brasiliensis* em função da dose da radiação

C+ controle não irradiado, C- células mortas pelo calor. As barras representam o desvio padrão. Maiores detalhes em Material e Métodos.

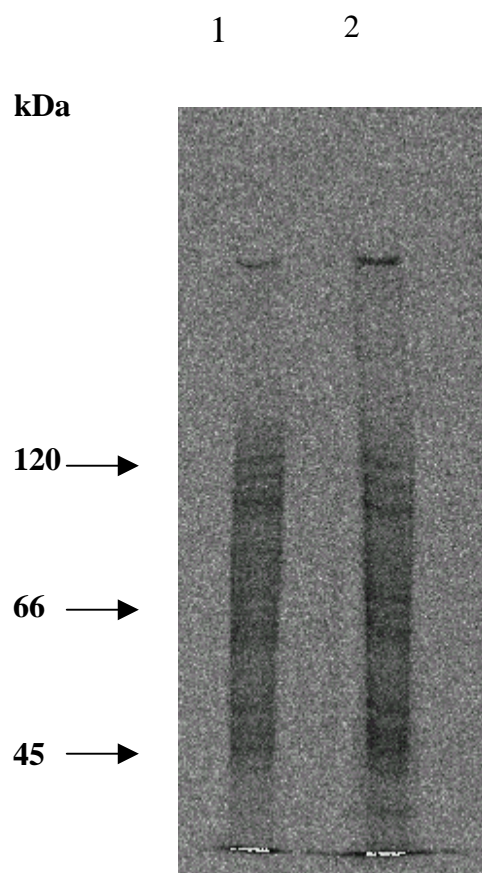


Figura 6-Visualização da radioatividade incorporada nas proteínas do *P. brasiliensis*.

1- Leveduras não irradiadas; 2- Leveduras irradiadas com a dose de 6,5kGy. As amostras foram submetidas ao SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 7,5% e a visualização das bandas radioativas analisadas através do sistema “Phosphoimage”. Maiores detalhes em Material e Métodos.

A comparação entre o perfil antigênico das leveduras irradiadas com a dose 6,5kGy e os controles não irradiados foi realizado por Western blot. Neste experimento foram utilizados soros de pacientes com paracoccidioidomicose. Os resultados mostraram claramente que as leveduras irradiadas retêm a expressão dos mesmos antígenos presente nos controles não irradiados (Figura 8).

O efeito da radiação gama sobre O DNA das leveduras irradiadas foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose (figura 9). Os resultados mostraram que as leveduras irradiadas apresentaram aumento da fragmentação do DNA de forma dose-dependente. À medida que foi aumentada a dose de radiação, verificou-se uma diminuição da intensidade da banda correspondente ao DNA genômico e um aumento da presença de fragmentos de baixo peso molecular na parte inferior do gel. Na dose de 6,5kGy verificou-se o desaparecimento dessa banda, indicando um alto grau de fragmentação do DNA. Já as leveduras controle não apresentaram fragmentação no DNA.

Na figura 10 é analisado o grau de fragmentação no DNA por um período de até 48 horas após a irradiação. Pode-se verificar que fragmentação ocorrida no DNA não foi reparada neste período, visto que o aspecto do gel é o mesmo, duas e 48 horas após a irradiação. Nos dois casos, verificou-se o desaparecimento da banda correspondente ao DNA genômico e a presença de material fragmentado de menor peso molecular ao longo da canaleta. Como será discutido posteriormente, essa fragmentação não reparada está na base da perda da capacidade reprodutiva das leveduras irradiadas com a dose de 6,5kGy.

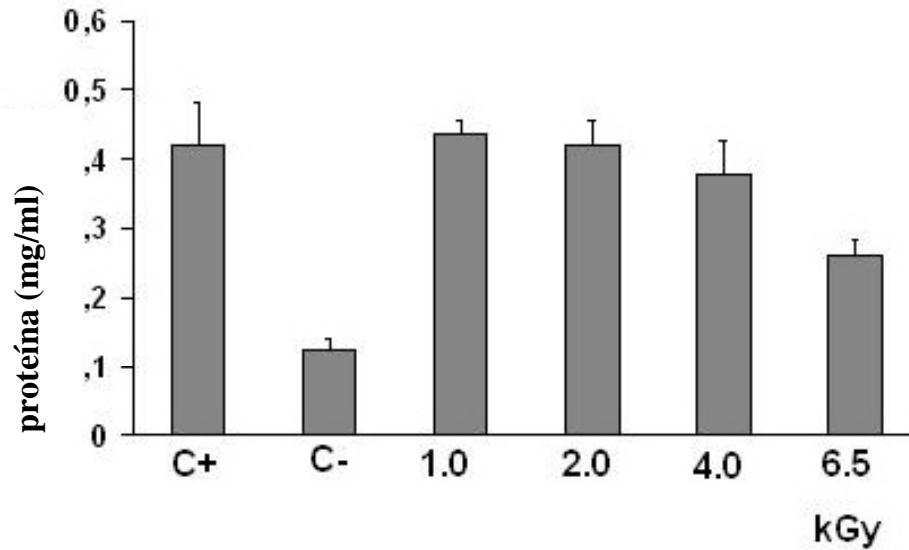


Figura 7- Avaliação da secreção de proteínas em função da dose de radiação

Barras indicam o desvio padrão. C+ controle não irradiado, C- células mortas pelo calor.

Houve redução de 40% na secreção de proteínas na dose de 6,5kGy ($p < 0,001$).

Maiores detalhes em Material e Métodos.

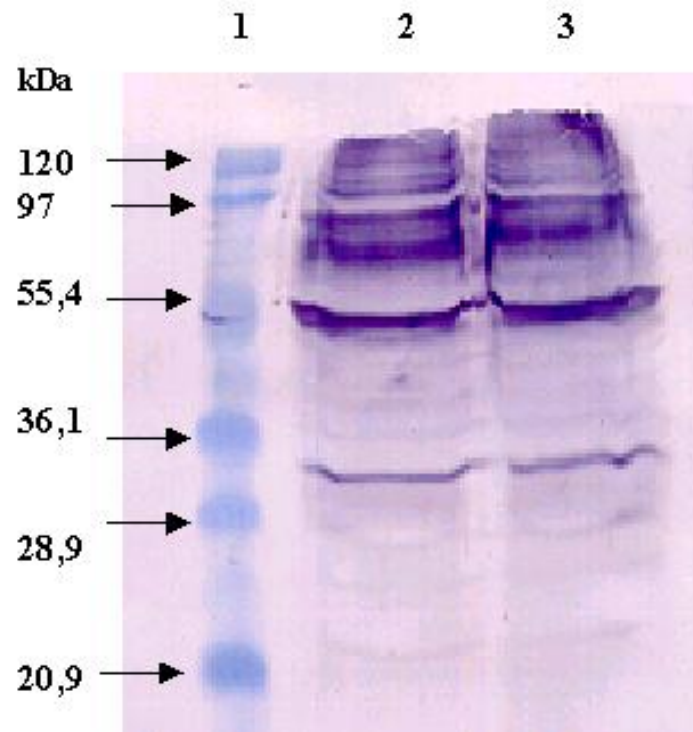


Figura 8- “Western – Blot”.

1- Padrão de peso molecular; 2- Leveduras não irradiadas; 3-Levedura irradiada com a dose de 6,5kGy. Foi utilizado soro de pacientes com paracoccidioidomicose. Maiores detalhes em Material e Métodos.

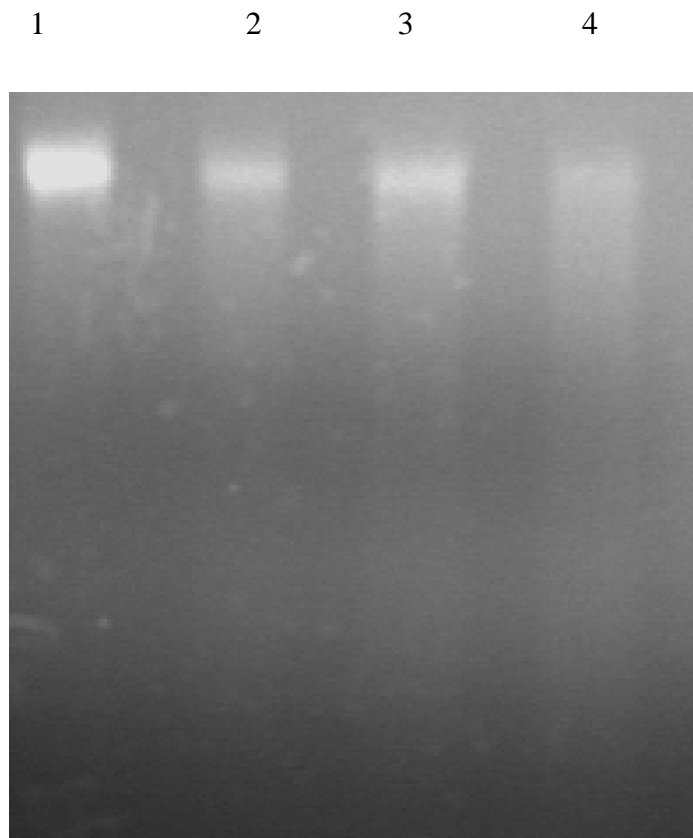


Figura 9- Avaliação da integridade do DNA em função da dose de radiação gama

Foi utilizado gel de agarose 1%. 1- Levedura não irradiada; 2- Levedura irradiada com 2,0kGy, 3- Levedura irradiada com 4,0kGy , 4- Levedura irradiada com 6,5kGy. A análise foi realizada duas horas após cada irradiação. Maiores detalhes em Material e Métodos.

A análise de atenuação da virulência foi realizada através da inoculação em camundongos das leveduras atenuadas com a dose de 6,5kGy. Dois tipos de camundongos foram utilizados: C₅₇Bl/J6 (resistente) e Balb/c (susceptível). Os resultados estão apresentados nas tabelas 1 e 2. Pode-se verificar que não foram recuperadas UFCs dos tecidos dos camundongos infectados com o fungo irradiado. Já os controles infectados com a cepa virulenta apresentaram grande quantidade de UFCs em todos os órgãos examinados, com maior quantidade nos pulmões. Esses resultados obtidos em dois modelos animais diferentes demonstraram que as leveduras radioatenuadas perderam a virulência, sendo incapazes de produzir infecção.

A presença de alterações ultraestruturais nas leveduras radioatenuadas foi verificada por microscopia eletrônica. Foram utilizadas a microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

O aspecto geral de uma levedura não irradiada do *P. brasiliensis* vista pela microscopia eletrônica de transmissão é apresentada na figura -11. Observa-se a parede celular, que pode ser dividida em interna e externa (nem sempre vista), a membrana plasmática, muitas mitocôndrias, a presença de um vacúolo central e o núcleo.

A figura -12 apresenta o aspecto geral da levedura irradiada com a dose de 6,5kGy. A parede celular e a membrana plasmática estão preservadas, resultado este que comprova os obtidos com o teste de exclusão com o corante verde Janus. As mitocôndrias estão presentes, porém com a morfologia levemente alterada, apresentando as cristas mitocondriais distorcidas. A alteração mais significativa observada ocorreu no núcleo, que freqüentemente apresentou-se muito eletrodenso, indicando um elevado grau de condensação da cromatina. Esse resultado corrobora aqueles das figuras 9 e 10 que evidenciaram um grau elevado de lesões no DNA.

1 2 3

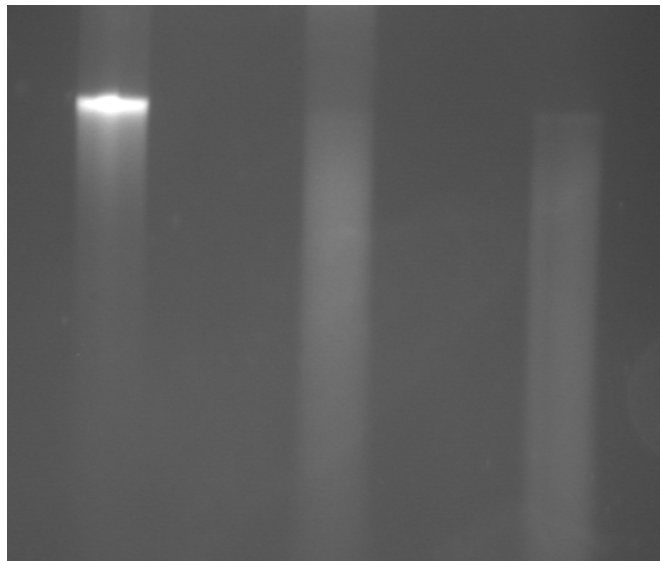


Figura 10- Avaliação da integridade do DNA após a irradiação

Foi utilizado gel de agarose 1%. 1- Levedura não irradiada; 2-Levedura irradiada com a dose de 6,5kGy analisada 2 horas após a irradiação, 3- Levedura irradiada com a dose de 6,5kGy analisada 48 horas após a irradiação. Para maiores detalhes consulte Material e Métodos.

Tabela 1- Recuperação das UFCs de camundongos C₅₇Bl/J6 infectados com leveduras radioatenuadas com a dose de 6,5kGy e controles de *P. brasiliensis*.

Órgão	Leveduras Controle (UFC*)	Leveduras Radioatenuadas (UFC *)
Pulmão	4750 (± 1041)	0
Baço	417 (± 158)	0
Fígado	123 (± 44)	0

* UFCs por grama de tecido do camundongo ($n = 3$)

Tabela 2- Recuperação das UFCs de camundongos Balb/c infectados com leveduras radioatenuadas com a dose de 6,5kGy e controles de *P. brasiliensis*.

Órgão	Leveduras Controle (UFC *)	Leveduras Radioatenuadas (UFC *)
Pulmão	1409(± 774)	0
Baço	900(± 300)	0
Fígado	582 (± 388)	0

* UFCs por grama de tecido do camundongo ($n = 7$)

As figuras 13 e 14 destacam, em maior aumento, detalhes da parede celular, membrana plasmática e mitocôndrias das leveduras controles e radioatenuadas, respectivamente. Como comentado anteriormente, constata-se a integridade da parede e da membrana celular na levedura irradiada. Nessa maior ampliação, pode-se observar com mais detalhes a aparência alterada das mitocôndrias irradiadas, apresentando as cristas mitocondriais distorcidas e em menor número.

As figuras 15 e 16 tem como objetivo destacar, em maior aumento, o núcleo das leveduras controle e radioatenuadas. A figura 15 apresenta dois núcleos das leveduras controle com seu aspecto característico. A figura 16 mostra uma levedura radioatenuada apresentando o núcleo eletrodenso e em formato de meia lua, aparência com a qual foi freqüentemente encontrado nas preparações irradiadas com a dose de 6,5kGy.

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para a observação da morfologia externa das leveduras do *P. brasiliensis*.

As imagens das leveduras controle (figuras 17 e 18) mostram as células mãe com uma aparência arredondada, ou alongada, com seus respectivos brotamentos. As células leveduriformes irradiadas com a dose de 6,5kGy e analisadas 2 horas após a irradiação apresentaram uma morfologia alterada em relação ao controle. A grande maioria se apresentou colapsada ou com depressões na sua superfície (Figuras 19 e 20). Porém, quando as imagens foram realizadas 48 horas após a irradiação (Figuras 21 e 22), a grande maioria da leveduras retornou à sua morfologia original, indicando que a lesão foi reversível.

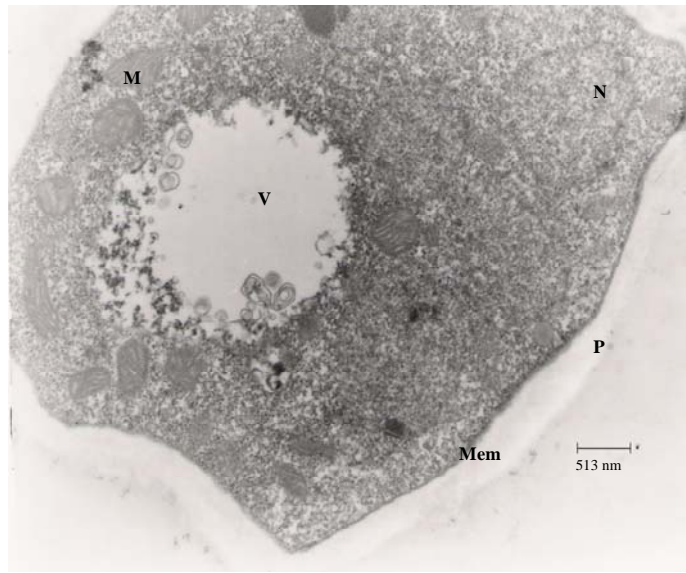


Figura 11 -Microscopia eletrônica de transmissão de célula não irradiada do *Paracoccidioides brasiliensis*. PE – Parede Externa, P – Parede interna, N – núcleo, Mem – Membrana Plasmática, M – Mitocôndria, V - Vacúolo 19.600x.



Figura 12- Microscopia eletrônica de transmissão da célula irradiada do *Paracoccidioides brasiliensis* com a dose de 6,5kGy. Núcleo da célula apresenta eletrodenso. 36.000x.

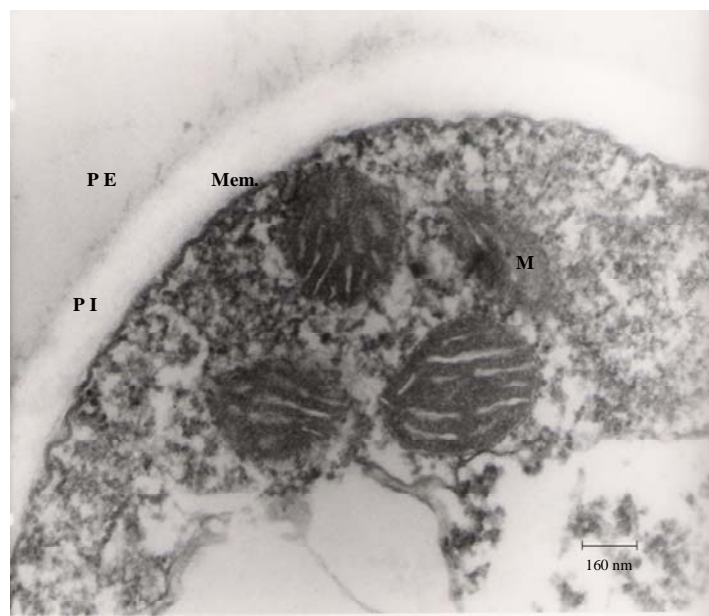


Figura 13- Microscopia eletrônica de transmissão da célula não irradiada do *P. brasiliensis*. P E – Parede Externa, P I – Parede Interna, Mem – Membrana Plasmática, M – Mitocôndria, N – Núcleo. A foto destaca as mitocôndrias e a parede celular com sua morfologia inalterada.62.600x.

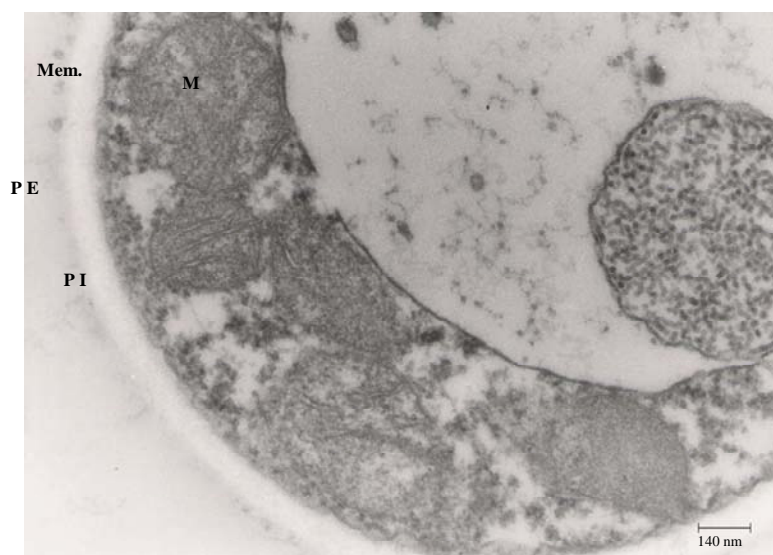


Figura 14- Microscopia eletrônica de transmissão da célula irradiada com a dose de 6,5kGy do *P. brasiliensis*. P E – Parede Externa, P I – Parede Interna, Mem – Membrana Plasmática, M – Mitocôndria 63.000x.

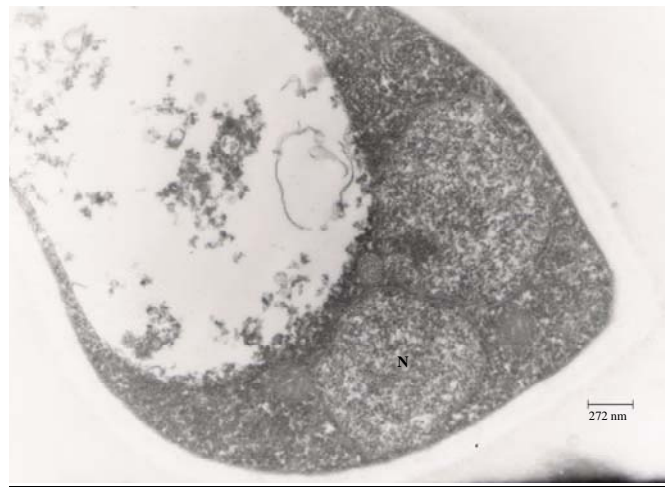


Figura 15- Microscopia eletrônica de transmissão da célula controle do *P. brasiliensis*. 36.700x.



Figura 16- Microscopia eletrônica de transmissão da célula irradiada com a dose de 6,5kGy do *P. brasiliensis*. O núcleo da célula apresenta-se com a forma de meia lua e bastante eletrodense. 30.800x.

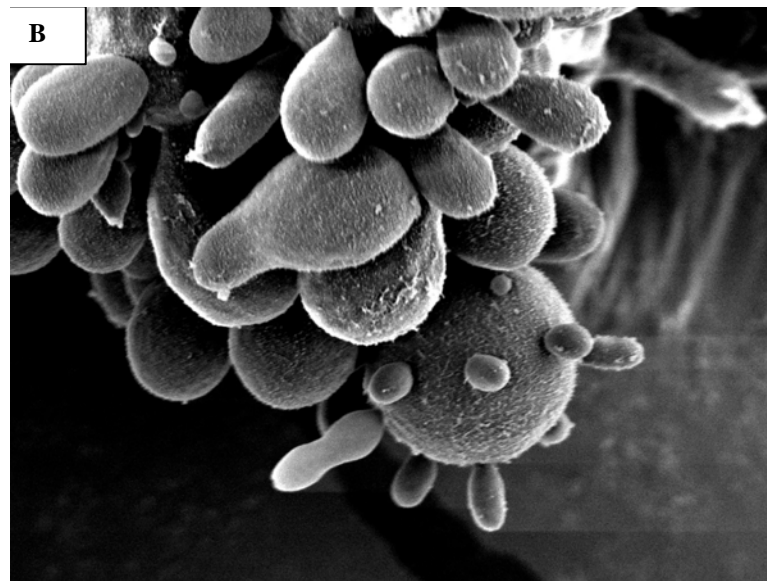
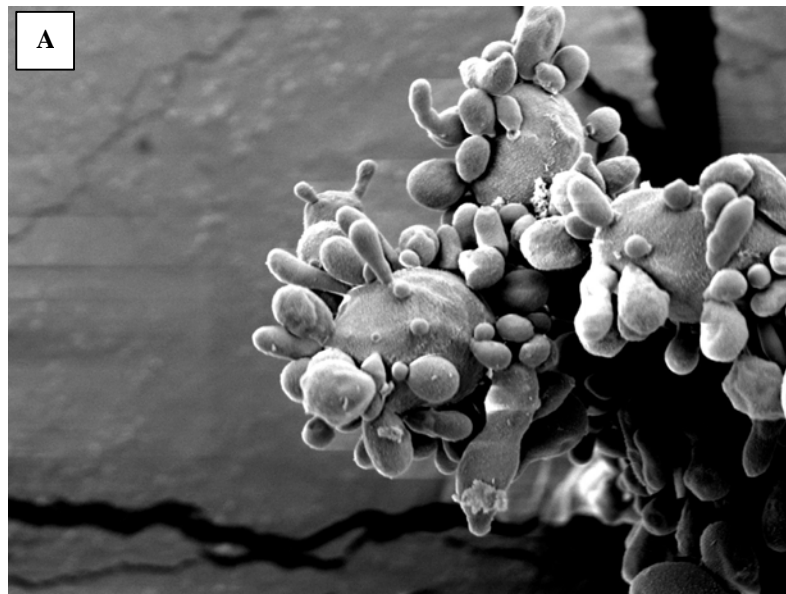


Figura 17- Microscopia eletrônica de varredura das células não irradiadas do *P. brasiliensis*.

A - 2000x. B - 4000x.

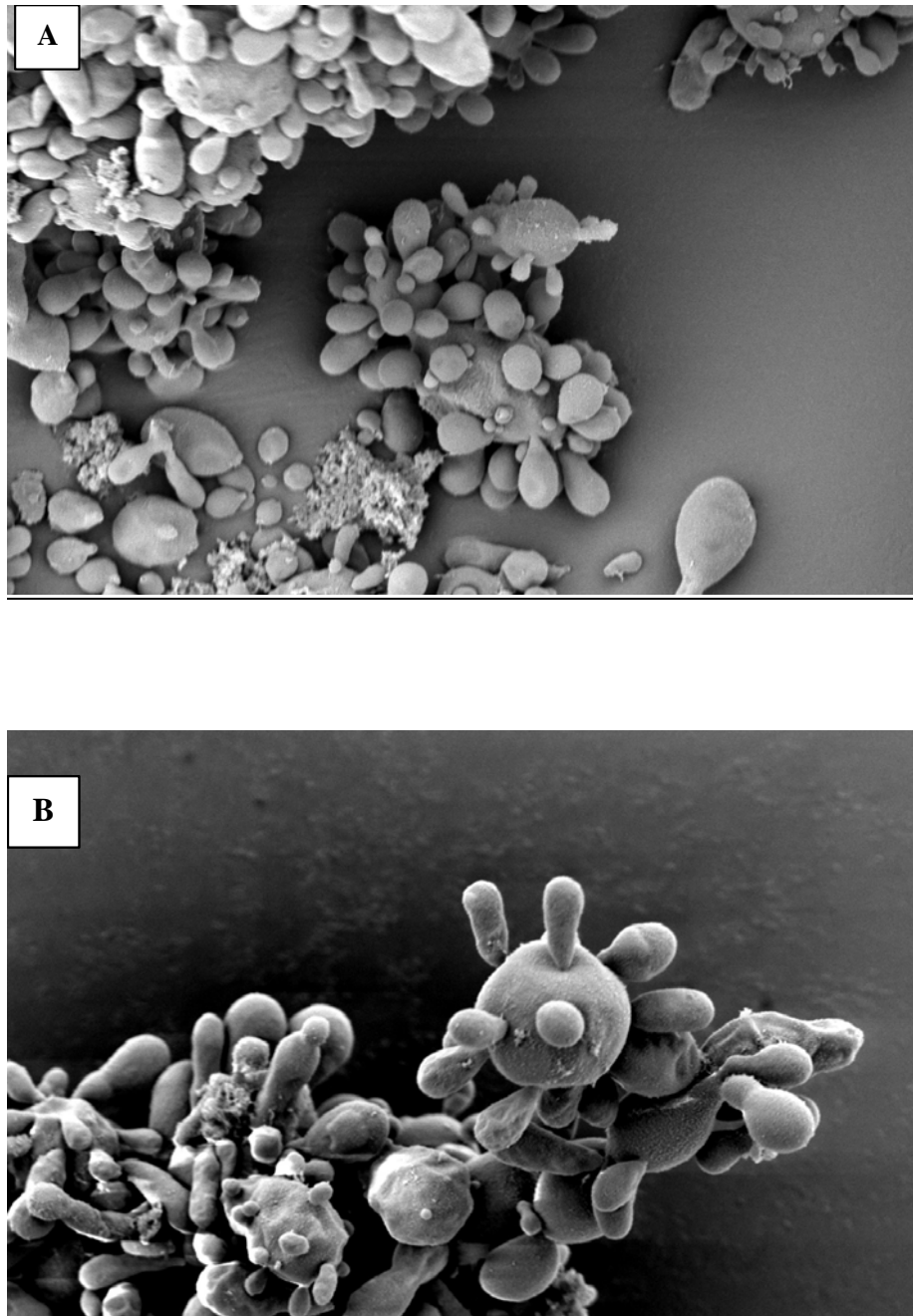


Figura 18- Microscopia eletrônica de varredura das células não irradiadas do *P. brasiliensis*.

A - 1000x. B - 2000x.

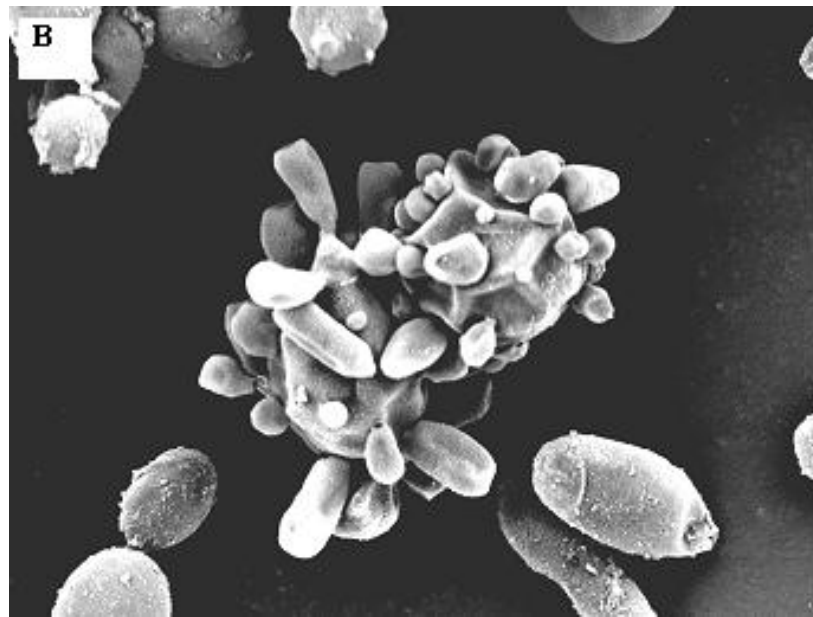
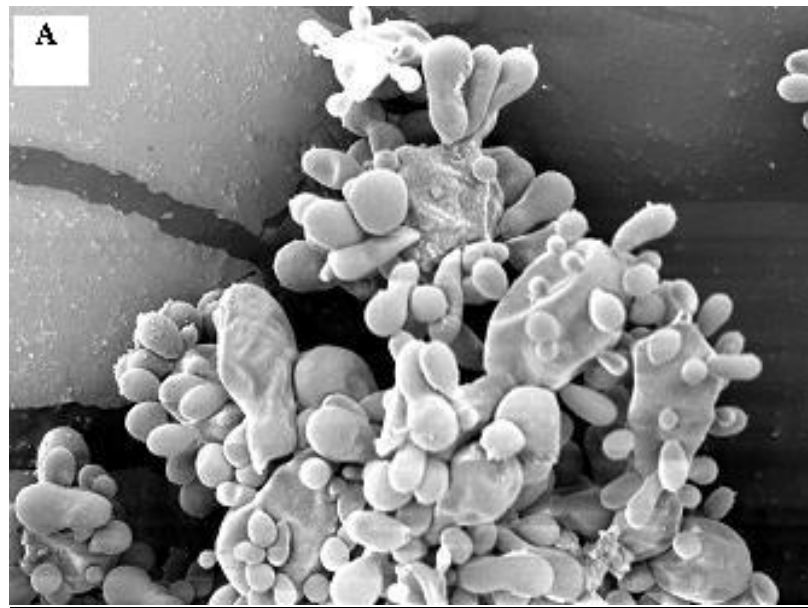


Figura 19-Microscopia eletrônica de varredura das células *P. brasiliensis* analisadas 2 horas após a irradiação com a dose de 6,5kGy. A - 2000x. B – 3000x.

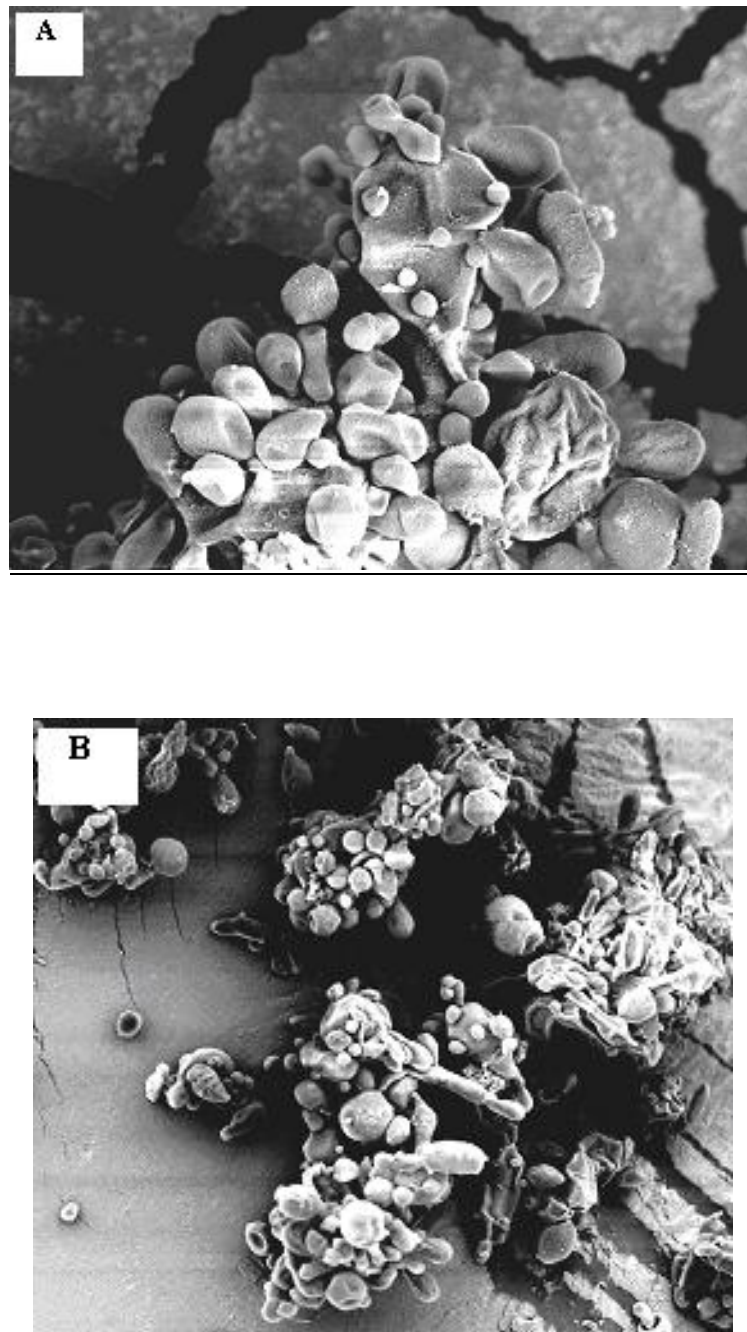


Figura 20- Microscopia eletrônica de varredura das células *P. brasiliensis* analisadas 2 horas após a irradiação com a dose de 6,5kGy. A - 3000x. B - 1000x.

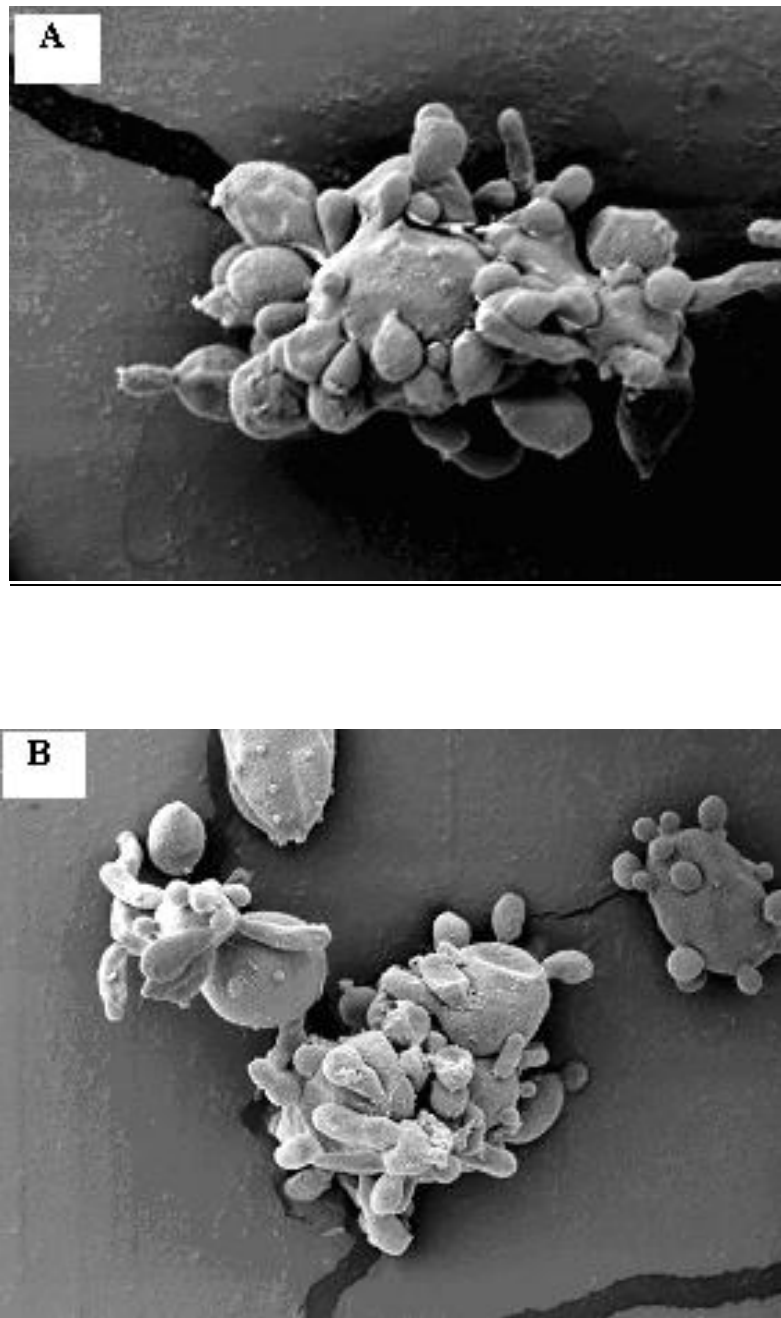


Figura 21- Microscopia eletrônica de varredura das células *P. brasiliensis* analisadas 48 horas após a irradiação com a dose de 6,5kGy. A - 2000x. B - 2000x.

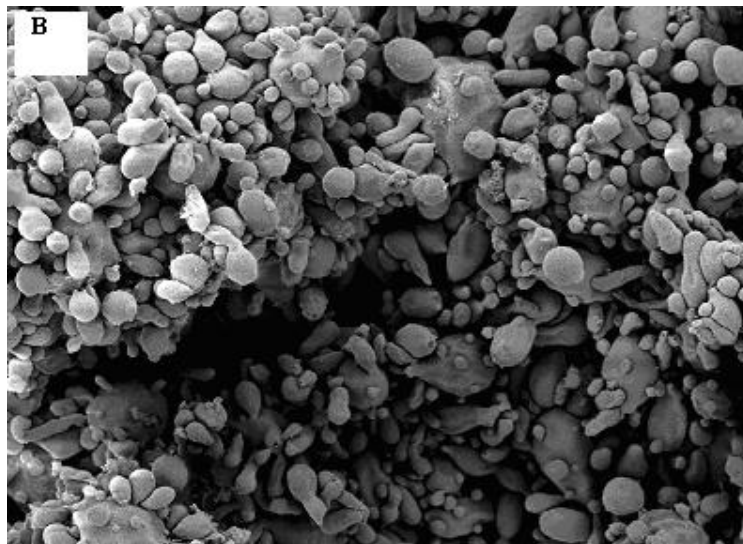
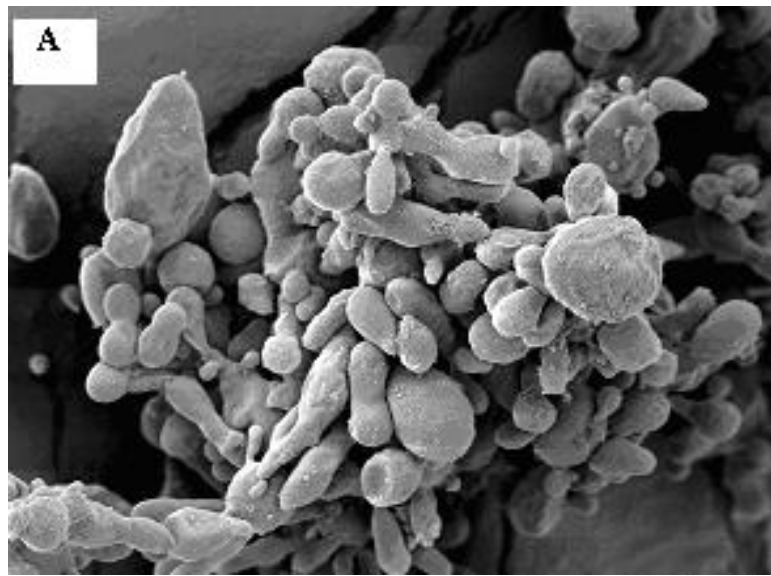


Figura 22- Microscopia eletrônica de varredura das células *P. brasiliensis* analisadas 48 horas após a irradiação com a dose de 6,5kGy. A 2000x. B – 1000x.

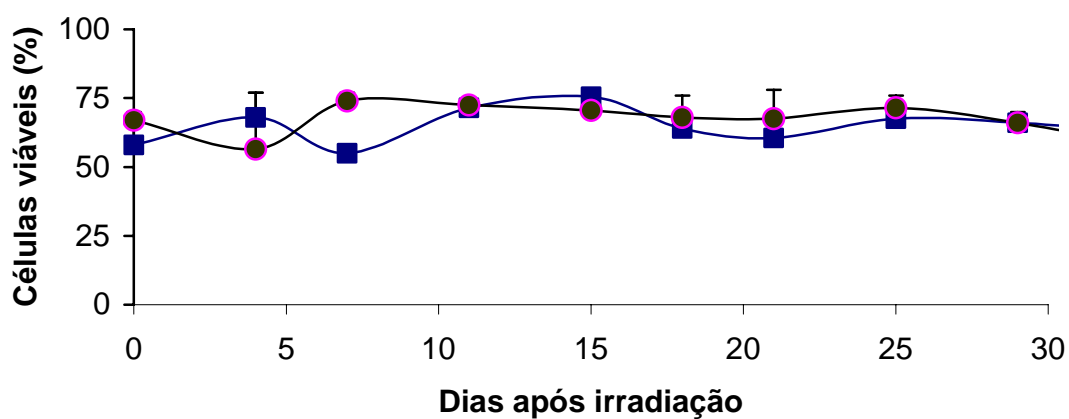


Figura 23- Monitoramento da viabilidade das leveduras de *P. brasiliensis*

A viabilidade foi acompanhada por um período de 30 dias utilizando o corante verde Janus. Controle ■, 6,5kGy ●.

A estabilidade das leveduras irradiadas foi monitorada através da análise da viabilidade utilizando-se o corante verde Janus. A viabilidade celular foi acompanhada por um período de 30 dias. Os resultados estão apresentados na figura –23. Pode-se verificar que a cultura de células irradiadas com a dose de 6,5kGy retiveram a viabilidade durante o período de tempo analisado.

As células leveduriformes do *Paracoccidioides brasiliensis*, assim como a de outros fungos, apresentaram uma radioresistência maior que a outros microrganismos e células de mamíferos (SALEH *et al.* 1988), uma vez que foi utilizada uma dose de vários milhares de grays para incapacitar as células leveduriformes de se reproduzirem, e a dose letal para as células de mamíferos é somente de poucos grays.

A causa dessa maior radioresistência, que depende da linhagem celular, ainda não está esclarecida, mas pode envolver um mecanismo mais eficiente de reparo do DNA dos danos causados pelos raios gama. O fato de o *P. brasiliensis* apresentar poliploidia, possuindo muitos núcleos e, em consequência muitas cópias do seu conjunto de genes, pode também contribuir para esta elevada radioresistência. É conhecido que um dos fatores relacionados à resistência de microrganismos à radiação é o número de cópias dos genes no seu DNA. Esse fato aumenta a chance estatística de pelo menos uma das cópias sobreviver à ação da radiação e continuar a desempenhando suas funções.

A resistência à radiação gama de algumas espécies fúngicas foi avaliada por Saley *et al.* (1998). A dose que inativou a maioria das espécies ficou entre 1,7 e 2,5kGy, sendo que as maiores doses para inativação foram das espécie *Curvularia geniculata* e *C. lunata*, que ficaram entre 17 e 20kGy, respectivamente. Os valores estão apresentados na tabela 3. A maior resistência dessas espécies, segundo o autor, estaria relacionada ao fato apresentarem melanina na parede celular.

Tabela 3 – Resistência relativa de espécies fúngicas à irradiação gama

Espécies	Taxa de dose de inativação (kGy)
<i>Alternaria alternata</i>	>11,5 - <13,9
<i>Aspergillus flavus</i>	>2,5 - <3,0
<i>A. niger</i>	>1,7- <2,5
<i>A. fumigatus</i>	>1,7- <2,5
<i>A. parasiticus</i>	>1,7- <2,5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	>6,0- <6,5
<i>Curvularia geniculata</i>	>17- <20
<i>C. lunata</i>	>17- <20
<i>Fusarium solani</i>	>1,7- <2,5
<i>Penicillium sp.</i>	>1,7- <2,5

Baseado em Saleh *et al.* (1988).

A radiação gama age por duas vias: direta e indireta. A ação direta decorre da transferência da energia para a molécula alvo, provocando ionização e alteração da estrutura química, gerando alteração na função biológica. Na ação indireta, a forma mais freqüente, a radiação age pela interação com a água do meio, molécula mais encontrada nos sistemas biológicos, formando radicais livres. Esses radicais interagem com as moléculas biológicas, alterando suas estruturas e funções, ampliando os efeitos da radiação.

Os ácidos nucleicos são as principais moléculas afetadas. As lesões que podem ser provocadas no DNA são: quebras simples e duplas da fita de DNA, alterações estruturais das bases, eliminação das mesmas, anomalias na desoxirribose e ligações cruzadas (DNA-DNA ou DNA–proteína). A tabela a seguir mostra os principais tipos de danos causados pela radiação gama no DNA de células de mamíferos, com uma estimativa de sua freqüência.

Tabela 4 - Danos causados pela radiação gama no DNA de células de mamíferos

Tipo de dano	Número de defeitos por célula por Gy⁻¹
Quebra simples	1000
Danos nas bases	500
Dupla Quebra	40
Ligações cruzadas DNA - proteína	150

Baseado em LE et al., (1998) e POUGET et al., (1999).

Dentre os danos causados no DNA, as duplas quebras são os mais difíceis de serem reparados, pois necessitam de um mecanismo de reparo mais complexo.

Duplas quebras nas fitas polinucleotídicas do DNA são, provavelmente, a causa da perda da capacidade de reprodução das leveduras irradiadas com 6,5kGy. Como demonstrado na figura-8, a análise em gel de agarose do DNA das leveduras irradiadas mostrou que, na dose de 6,5kGy, este está completamente fragmentado e que esta fragmentação não foi reparada. Esse fato provoca paralisação do ciclo celular ou um desequilíbrio na distribuição da cromatina entre as células filhas, no momento da divisão celular, levando à perda de material genético essencial e conseqüente morte mitótica (FAVAUDON, 2000) (FRANKENBERG et al., 1981) (RHIND et al., 1998).

Contudo, os nossos resultados mostraram que essas lesões no DNA não prejudicaram a síntese de proteína. Provavelmente, a maioria dessas quebras ocorreram fora das regiões de operon, que representam uma fração menor do genoma, permitindo o funcionamento dos genes até o momento da divisão celular, o que explica a retenção da atividade metabólica de síntese de proteínas.

A perda da capacidade reprodutiva com a dose de 6,5kGy parece ser irreversível.

Nenhuma colônia foi observada no experimento de plaqueamento, mesmo quando foram utilizados longos tempos de incubação (40 dias) e grandes inóculos (10^7 células). Além do mais, nenhuma UFC foi recuperada dos camundongos infectados com levedura atenuada.

Contudo, o *P. brasiliensis* têm a capacidade de iniciar uma infecção após períodos prolongados de dormência, uma vez que pode haver persistência desses microrganismos, com formação de um foco latente ou quiescente no hospedeiro (ÂNGULO – ORTEGA, 1972). Existem relatos de pacientes que desenvolvem a doença mais de uma década depois de abandonar a zona endêmica (BRUMER, 1993). Portanto, a hipótese da levedura radioatenuada recuperar sua capacidade de divisão, após longos períodos de incubação no hospedeiro, deve ser cuidadosamente verificada e descartada, antes que possa ser utilizada em humanos.

Mas mesmo que, por motivos de segurança, uma vacina radioatenuada de *P. brasiliensis* não possa ser utilizada em seres humanos, ainda assim essa seria uma valiosa ferramenta para o estudo da imunidade protetora na paracoccidiodomicose experimental em modelos animais. Permitiria que os mecanismos que induzem e mantêm a imunidade protetora, bem como os antígenos protetores, pudessem ser melhor conhecidos.

Verificou-se que a viabilidade do fungo após a atenuação com 6,5kGy foi preservada. A permeabilidade seletiva da membrana plasmática foi conservada como demonstrado pela ausência de incorporação do corante verde Janus, e pela integridade da membrana, quando visualizada pela microscopia eletrônica de transmissão. O metabolismo oxidativo também foi preservado, como indicado pela ausência de coloração como azul de metileno. Em concordância com esse resultado, a microscopia eletrônica de transmissão mostrou a presença de mitocôndrias preservadas na levedura radioatenuada, embora apresentando cristas mitocondriais levemente distorcidas.

A dose 6,5kGy não modificou a expressão dos antígenos conhecidos do *P. brasiliensis*, como indicado no Western blot realizado com soro de pacientes com paracoccidioidomicose. Esse é um resultado que delinea um cenário muito favorável, indicando que o fungo radioatenuado pode estimular o sistema imune do hospedeiro, no mínimo, de maneira similar ao fungo nativo. Assim, o fungo irradiado poderia ser uma ferramenta valiosa para a avaliação, se a interação de antígenos múltiplos é necessária para uma resposta imune eficaz.

Infecções experimentais podem ser obtidas pela inoculação do *P. brasiliensis* em animais de laboratório. Franco (1987) demonstrou que a suscetibilidade ao fungo é variável entre as espécies e entre as raças de camundongos e que amostras diferentes do fungo podem ter diversos graus de virulência. A análise de atenuação da virulência foi realizada com dois grupos de camundongos, C₅₇Bl/J6 (resistente) e Balb/c (susceptível), que foram infectados com as leveduras radioatenuadas e os resultados foram similares nos dois grupos. Não foram recuperadas UFCs dos tecidos dos camundongos infectados com o fungo irradiado. Já os controles infectados com a cepa virulenta apresentaram grande quantidade de UFCs em todos os órgãos examinados, com maior quantidade nos pulmões.

Os resultados demonstraram que foi obtida a atenuação por irradiação gama das leveduras do *P. brasiliensis*. A levedura perdeu a capacidade de reprodução e, simultaneamente, a virulência. Reteve, no entanto, a viabilidade, a atividade metabólica e conservou o mesmo perfil antigênico. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que as leveduras ficaram colabadas após a irradiação, mas esta alteração foi reversível. Alterações morfológicas significativas foram verificadas somente no núcleo celular e que provavelmente estão relacionadas à perda da capacidade reprodutiva.

Uma vacina com estas características é reconhecida pelo hospedeiro como um agente viável, porém sem o risco de uma infecção progressiva. Permite o estímulo simultâneo por vários antígenos que são apresentados sequencialmente ao hospedeiro como na infecção natural. Permite, também, a síntese de antígenos que são produzidos somente durante a infecção.

Portanto, a primeira fase deste trabalho está concluída. As questões que deverão ser respondidas na seqüência serão: verificar a eficácia protetora da vacina radioatenuada em ensaios de proteção, analisar as repostas imune celular e humoral desencadeadas, avaliar a estabilidade da vacina verificando se o perfil antigênico é constante entre diversas preparações e verificar se a virulência das leveduras radioatenuadas pode ser recuperada em animais imunodeprimidos.

VII-Conclusão

Com a dose de 6,5kGy, as leveduras de *P. brasiliensis* perdem sua habilidade reprodutiva, mas permanecem viáveis e metabolicamente ativas.

As leveduras irradiadas permanecem viáveis por, pelo menos, 30 dias após a irradiação.

A dose 6,5kGy não afeta o metabolismo de síntese de proteínas das leveduras.

As leveduras radioatenuadas com a dose 6,5kGy secretam 40% menos proteínas.

A dose de 6,5kGy não modifica o perfil antigênico das leveduras.

As leveduras radioatenuadas não são capazes de provocar infecção, tendo sua virulência atenuada.

Com a dose de 6,5kGy, o DNA das leveduras se encontra fragmentado e esse dano não é reparado. Essa fragmentação é, provavelmente, a causa da perda da atividade reprodutiva.

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou alterações significativas no núcleo das células irradiadas.

A microscopia eletrônica de varredura mostrou que as leveduras, imediatamente após a irradiação, apresentam-se colabadas e com abaulamentos na parede celular. Porém, essas lesões são reversíveis e essas recuperam a morfologia normal 48 horas após a irradiação.

VIII –Referências Bibliográficas

ABO-SHEHAD, M. N., AL. ZUBAIDY, B. A. ; HERBERT, I. V. Acquired immunity to *Toxocara canis* infection in mice. **Vet. Parasitol.** v.38, p. 289- 298, 1991.

AJELLO, L.; POLONELLI, L. - Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. **Europ. J. Epidem.**, v. 1, p.160-165, 1985.

AGYEI-FREMPONG, M ; CATTY, D. The measurement of antigens released by radiation-attenuated *Trichinella spiralis* larvae. **Parasite Immunol.**; v.5, p.289-303. 1983.

ALMEIDA, F. O. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos do Brasil – novo gênero para o parasita brasileiro. **An. Fac. Méd. Univ. de São Paulo**, v.5, p. 125-134. 1930.

ANDRADE, T. C. B. *et al.* BCG Moreau Rio de Janeiro An oral vaccine against tuberculosis: review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.100, n. 5, p. 459-465, 2005.

ANDRADE, A. L. S. S., Paracoccidioidomicose linfático - abdominal. Contribuição ao seu estudo. **Revista de Patologia Tropical**, v.12, p.165-256, 1983.

ÂNGULO ORTEGA, A. Calcifications in paracoccidioidomycosis: are they the morphological manifestation of subclinical infections? **PAHO Scient. Publ.**, v. 254, p.129-33, 1972.

BARBOSA, G.L. Paracoccidioidomicose na criança. **Rev. Pat. trop.**, v. 21, p. 269-383, 1992.

BARBOSA, W ; DAHER, R. R.. Prevalência da Paracoccidioidomicose na América Latina. In: VERONESI, R.;; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 9 ed. São Paulo: Atheneu. 1991. 1107-1116.

BARRY,C. *et al.* Induction of apoptosis in yeast and mammalian cells by exposure to 1,10 – phenanthroline metal complexes. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p.63-10. 2004.

BAZAN, C. *et al.* Fungal infections of the brain. **Neuroimaging Clin. North Am.**, v.1, p. 57-67, 1991.

BENARD, G. *et al.* Severe acute paracoccidioidomycosis in children. **Pediat. infect Dis. J.**, v. 13, p. 510-515, 1994.

BLOTTA, M.H.S.L. *et al.* Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v.61, p. 390-394, 1999.

BONETTI, F.C. *et al.* Aspectos morfológicos da Leishmania amazonensis submetida à ação da radiação ionizante. In: INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE; BRAZILIAN NATIONAL MEETING ON NUCLEAR APPLICATIONS, 6, Rio de Janeiro, 2002. **Proceedings...**Rio de Janeiro: ABEN, 2002. p.3080-3086. (CD-ROM)

BORGES WALMSLEY, D.; CHEN, X. ; SHU A.R. WALMSLEY, The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol.**, v.10, p. 80–87, 2002.

BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E. ; RESTREPO, A. - Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.6, p. 89-117, 1993.

CASTRO, R.M. ; DEL NEGRO, G. - Particularidades clínicas da paracoccidioidomicose na criança. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, v. 31, p.194-198, 1976.

CAMPOS, E.P. *et al.* Itraconazol e fluconazol em 3 pacientes com neuro-paracoccidioidomicose. **Folha Med.**, v.112, p. 173-176, 1996.

CHUSATTAYANOND, W.; DENHAM. D. A. Attempted vaccination of jirds (*Meriones unguiculatus*) against *Brugia pahangi* with radiation attenuated infective larvae. **J. Helminthol.** v.60, p.149-155, 1986.

COSTA, M. A. B. C., *et al.* Manifestações extrapulmonares da paracoccidioidomicose. **Radiol. Bras.** v. 38, n.1, p. 45-52, 2005.

COULSON, S.P. The radiation-attenuated vaccine against Schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine. **Advances in Parasitology**, v.39, p. 271-336, 1997.

COUTINHO, Z. F.. *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública**, v.18, n.5, p.1441-1454, 2002.

CREANEY, J. *et al.* Attempted immunization of sheep against *Fasciola hepática* using gamma-irradiated metacercariae. **Int. J. Parasitol**, v.25, n.7, p. 853-6, 1995.

DE ALBORNOZ MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**. v.9, n.3, p.248–253. 1971.

DEEP Jr., G. S. Preventative and therapeutic vaccine for fungal infections: from concept to implementation: review. **Expert Rev. Vaccines**, v. 3, n. 6, p. 1-9, 2004.

DEL NEGRO, G. et al. Limited adrenal reserve in paracoccidioidomycosis: cortisol and aldosterone responses to 1-24 ACTH. **Clin. Endocrinol.**, v.13, p.553-559, 1980.

DEL NEGRO G. Outras lesões. Formas de ocorrência rara e associação com outros processos. In: DEL NEGRO G., LACAZ C. S., FIORRILO A. M. (eds.) **Paracoccidioidomicose (blastomicose sul -americana)**. São Paulo: Sarvier - Edusp, 1982. p. 229-243.

DIXON, D.M, et al . Development of vaccines and their use in prevention of fungal infections. **J. Med. Vet. Mycol.** v.36 Suppl.1 p.57-67, 1998.

DICKSON, J.S. Radiation inactivation of microorganisms. In MOLIN,R.A., (ed.) **Food irradiation: principles and applications**. New York: John Wiley & Sons, 2001. chapter 2, p. 23-35.

DUARTE, R.D. et al. Paracoccidioidomicose cerebral: relato de um caso e revisão da literatura. **Rev. Pesq. Med.**, v.31, p.37-41, 1997.

FARHAT, C.K. *et al.* Paracoccidioidomicose na criança: relato de dois casos. **J. Pediat**, v.60, p.226-231, 1986.

FAVAUDON, V. Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death. **Cancer Radiother.**, v.4, n.5, p. 355-368, 2000.

FRANCO, M.F. et al. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.20, p. 129-132, 1987.

HAMDAN, J. S.; RESENDE, M. A.. Lipid composition and effect of amphotericin B on yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v.102, p.97-105, 1988.

HAMDAN, J. S.; CASALI, A.. Effect of amphotericin B on the lipids of yeast cells of *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 136, p.125-131, 1996.

HAMDAN, J. S., ROCHA, R. L. Epidemiologia da paracoccidioidomicose. **An Fac Med Univ Fed Minas Gerais**, v. 36, p.52-61. 13, 1987.

HIRAMOTO, R.M. et al.. 200 Gy sterilized *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. **Vaccine**, v.20, n.16, p. 2072-81, 2002.

HOFFMAN, S.L. et al. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. **J. Infect. Dis.**, v. 18, p.1155-1164, 2002.

JENKINS, M.C.; CHUTE, M.B; DANFORTH, H.D. Protection against coccidiosis in outbreak chickens elicited by gamma-irradiated *Eimeria máxima*. **Avian. Dis**, v.41, n.3, p. 702-8. 1997.

LOWRY, O.H., et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p.265-275, 1951.

LACAZ, C. S. Paracoccidoides brasiliensis. Morfologia. Ciclo evolutivo. Manutenção em vida saprofítica biologia. Virulência. Posição sistemática. In: DEL NEGRO G., C. S. LACAZ, M. FIORILLO (ed.), **Paracoccidoidomicose. Blastomicose sul – americana**. São Paulo: EDUSP, 1982. p.11-21

LACAZ, C.S. Impacto das micoses no Brasil. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v.40, p. 190-197, 1985.

LACAZ, C.S. Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidoidomicose. Um pouco de sua história. In: DEL NEGRO G, LACAZ C.S, FIORILLO AM. **Paracoccidoidomicose**. São Paulo: Sarvier, 1982. p.1-9.

LACAZ, C. S., E. PORTO; J. E. C. MARTINS. Paracoccidoidomicose. In: **Micologia Médica**, 8 ed. São Paulo: Sarvier, 1991. p.248-261.

LE, X. C. et al. Inducible repair of thymine glycol detected by an ultrasensitive assay for DNA damage. **Science**. v.280, p. 1066-1069, 1998.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D.. Paracoccidoidomicose: estudo clinico – micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. **J. Pneumol**. v.16. p. 129 – 132, 1990.

LONDERO, A. T.; MELO, I. S.. Paracoccidoidomycosis in childhood. A critical review. **Mycopathologia** v.82, p. 49 – 55, 1983.

LONDERO, A. T.; MELO, I. S.. Paracoccidoidomicose (Blastomicose Sul – Americana. Doença de Lutz – Splendore – Almeida). **J. Bras. Med.**, v.55, p. 96 – 111, 1988.

LONDERO AT, RAMOS CD. Paracoccidioidomycosis. A clinical and mycologic study of forty-one cases observed in Santa Maria, RS, Brazil. **Am J Med.** v.52, n.6, p.771–775, 1972.

LONDERO AT, RAMOS CD, LOPES, JO. Progressive pulmonary paracoccidioidomycosis a study of 34 cases observed in Rio Grande do Sul (Brazil). **Mycopathologia.** v.63, n.1, p.53–57, 1978.

LONDERO A.T; SEVERO LC. The gamut of progressive pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia.** v.75, n.2, p.65–74, 1981.

LONDERO A T; SEVERO L.C. ; RAMOS CD. Small forms and hyphae of paracoccidioides brasiliensis in human tissue. **Mycopathologia**, v.72, n.1, p.17–19, 1980.

MARQUES, S.A., et al. Paracoccidioidomycosis associated with acquired immunodeficiency syndrome. Report of seven cases. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 37:, p. 261–5, 1995.

MENDES, R.P. Treatment and control of cure. In: FRANCO, M. (Ed.) **Paracoccidioidomycosis.** Boca Raton: CRS Press , 1994. p. 373-392.

MILLS, D.R. Differential staining of living and dead yeast cells. **Food Res.**, v.6, p.361-367, 1941.

NEGRONI, R. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el Suelo Argentino. **Prensa Med Arg.**, v. 53, n.39, p. 2381–2382, 1966.

PAPPAGIANIS, D. Evaluation of the protective efficacy of the killed *Coccidioides immitis* spherule vaccine in humans. The Valley Fever Vaccine Study Group. **Am. Rev. Respir Dis.** v. 148, n. 3, p. 656-660, 1993.

PINTO, A. R. et al. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine.** v. 18, n. 26, p. 3050-8, 2000.

PRINCE, A. M. et al. *Onchocerca volvulus*: immunization of chimpanzees with X-irradiated third-stage (L3) larvae. **Exp. Parasitol.**, v.74, n.3, p.239-250.

POUGET, J. P. et al.. Measurement of DNA base damage in cells of exposed to low doses of gama radiation using the comet assay associated with DNA glycosilases. **Int. J. Radiation. Biol.** v.55, p.51-58, 1999.

REIS, J.A.; COLOMBO, A.L. - Paracoccidioidomicose. In: FARHAT, C.K. et al. **Infectologia pediátrica**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 524-528.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.** v.23, p. 323-334, 1985.

RESTREPO, S., et al. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* v.30, p.173 -184., 1992.

RESTREPO, A., et al. The gamut of Paracoccidioidomycosis. **Am. J. Med.**, v. 61, p.33 – 41, 1976.

RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis. In: FEIGIN, R.D.; CHERRY, J.D. **Textbook of pediatric infectious diseases**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1982. p. 1928-1934.

RESTREPO, A. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: MANDELL, G.L.; DOUGLAS, R.G.; BENNETT, J.E. **Principles and practice of infectious diseases**. New York: Churchill Livingstone, 2000. p. 2768-2772.

RESTREPO, A.; ARANGO, M.D. *In vitro* susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to sulfonamides. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.18, p. 190-194, 1980.

RHIND, N.; RUSSEL, P. Tyrosine phosphorylation of cdc2 is required for the replication checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. **Mol. Cell Biol.** v. 18, p: 3782-3787, 1998.

RIVIER, D. et al.. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. **Parasite Immunology**, v.15, p. 75-84, 1993.

SALEY, Y. G., MAYO, M. S.; AHEARN, D. G..Resistance of some common fungi to gamma irradiation. **Applied and environmental microbiology**, v.54, n.8, . p.. 2134 – 2135, 1988.

SANO, A.et al. Comparative study of four different staining methods for estimation of live yeast form cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v.124, p. 157-161, 1994.

SALATA, E.; WIENDL, F.M.; CORRÊA, F.M.A. Efeitos de raios gama sobre *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.15, n.2, p. 66-71, 1973.

SHARMA, R.L.; BHAT, T.K.; DHAR, D.N. Control of Sheep lungworm in India. **Parasitology Today**. v. 4, p. 33-6, 1988.

SILVA VERGARA ML, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med Mycol**, v.38, n. 3, p. 193-9, 2000.

SILVA VERGARA ML, et al.. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol.**, v. 36, p. 37-42, 1998.

SILVIE, O et al. . Effects of irradiation on *Plasmodium falciparum* sporozoite hepatic development: implications for the design of pré-erythrocytic malaria vaccines. **Parasite Immunol**, v. 24, n.4, p. 221-3, 2002.

TABORDA, C. P. Synthesis and Immunological Activity of a Branched Peptide Carrying the T-cell Epitope of gp43, the Major Exocellular Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.59, p. 58, 2004.

TAYLOR, S.M.; MALLON, T.R. ; GREEN W.P. Comparison of vaccination and ivermectin treatment in the prevention of bovine lungworm. **Vet. Rec.**, 119:370-372, 1986.

TERRA, G. M. F. et al. *Paracoccidioidomicose em criança ABP*. **Arq. Bras. Med.**, v.65, p. 8 – 15, 1991.

URBAN, J.F. ;TROMBA, F.G. Development of immune responsiveness to *Ascaris suum* antigens in pigs vaccinated with ultraviolet attenuated eggs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.3, p.399-409, 1982.

VERONESI R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 1997.p.1101-1131.

VINAYAK, V.K. et al. . Efficacies of vaccines against canine hookworm disease. **Parasitology**, v. 82, p.375-82, 1981.

YATES; H. Ultrastructural observations on the fate of *Brugia malayi* in jirds previously vaccinated with irradiated infective stage larvae. **Am J Trop Med Hyg**. v.35, n.5, p.982-7, 1986.

WALES, A.; KUSEL, J.R. Biochemistry of irradiated parasite vaccines; suggested models for their mode of action. **Parasitology Today**, v.8, p.358-363, 1992.

