

**Universidade Federal do Ceará**  
**Faculdade de Medicina – Fortaleza**  
**Departamento de Patologia e Medicina Legal**  
**Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica – Doutorado**

**RENATO EVANDO MOREIRA FILHO**

**COCCIDIOIDOMICOSE NO ESTADO DO CEARÁ: CARACTERIZAÇÃO  
PROTÉICA, DESCRIÇÃO DE MICROEPIDEMIA, VIRULÊNCIA *IN VIVO* E  
POTENCIAL IMUNOPROTETOR DE ANTÍGENO ISOLADO DE *Coccidioides  
posadasii***

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira  
Brilhante  
Co-Orientador: Prof. Dr. José Julio Costa  
Sidrim

Fortaleza-Ceará

2012

**RENATO EVANDO MOREIRA FILHO**

COCCIDIOIDOMICOSE NO ESTADO DO CEARÁ: CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA, DESCRIÇÃO DE MICROEPIDEMIA, VIRULÊNCIA *IN VIVO* E POTENCIAL IMUNOPROTETOR DE ANTÍGENO ISOLADO DE *Coccidioides posadasii*

Tese de doutorado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

Área de Concentração: Microbiologia Humana e Animal

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Co-Orientador: Prof. Dr. José Julio Costa Sidrim

Fortaleza-Ceará

2012

COCCIDIOIDOMICOSE NO ESTADO DO CEARÁ: CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA, DESCRIÇÃO DE MICROEPIDEMIA, VIRULÊNCIA *IN VIVO* E POTENCIAL IMUNOPROTETOR DE ANTÍGENO ISOLADO DE *Coccidioides posadasii*

Tese submetida à apreciação da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde da mencionada instituição, bem como, em seu banco digital de teses e dissertações. A citação de qualquer trecho desta tese é permitida desde que seja feita em consonância com as normas da ética científica.

Defesa formal aprovada em 26 / 11 / 2012 pela banca examinadora constituída por:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante - Orientadora  
Departamento de Patologia e Medicina Legal  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira  
Faculdade de Veterinária  
Universidade Estadual do Ceará

---

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Bezerra Fachine  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – Unilab

---

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha  
Faculdade de Veterinária  
Universidade Estadual do Ceará

---

Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim  
Departamento de Patologia e Medicina Legal  
Universidade Federal do Ceará

À Tania Vicente Viana e Sávio Moreira Viana –  
responsáveis, nos insondáveis domínios do afeto,  
pela soltura das amarras desse navio chamado  
coração – Dedicó.

## AGRADECIMENTOS

Uma obra dessa natureza, certamente, não é edificada pela diligência de um só. Expresso meu reconhecimento e agradecimento aos que contribuíram direta ou indiretamente, com maior ou menor ímpeto, para que o esforço despendido se concretizasse neste trabalho. O que ele possui de relevante, divido os méritos com os infracitados, os eventuais equívocos, assumo-os sozinho.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tania Vicente Viana, esposa e companheira de primeira hora, pelo amor, desprendimento, compreensão e estímulo contínuos em todos os momentos da realização desse Doutorado, além de me servir como norte de educadora e formadora científica;

À Universidade Federal do Ceará (UFC) através do Departamento de Patologia e Medicina Legal, Centro de Ciências, Faculdade de Farmácia e Centro de Biomedicina, pela estrutura física e de material de laboratório, em geral e, em especial, no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM). Como membro do corpo docente da instituição, percebo, mais que nunca, que os esforços despendidos desde os verdes anos da graduação ecoam na minha formação como pesquisador e certamente me acompanharão nos tempos vindouros;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) - órgãos fomentadores da pesquisa científica - pela possibilidade de execução deste trabalho, por meio do auxílio financeiro que permitiu, entre outros, a aquisição de material para análise laboratorial;

Ao Hospital São José de Doenças Infecciosas da Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, personificado em sua administração e corpo clínico, pela possibilidade de busca ativa, diagnóstico e seguimento dos pacientes portadores de coccidioidomicose;

Aos caçadores de tatu cearenses, presentes neste e em outros estudos do CEMM, que, ao seu modo, contribuíram para o aperfeiçoamento científico e humanístico da coccidioidomicose;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica – Doutorado, pelo compartilhamento de experiências e sugestões, indispensáveis à boa formação do pesquisador;

Ao prof. Dr. José Julio Costa Sidrim, por quem fui “lapidado” desde os idos anos 90, como monitor de iniciação a docência na então disciplina de “Microbiologia Médica” e bolsista de iniciação científica na graduação em Medicina e, *a posteriori*, na confiança depositada como mestrando e doutorando do programa de pós-graduação em Microbiologia Médica; Caro mestre, obrigado pelas possibilidades construídas e exemplos firmados;

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rda. Sâmia Nogueira Brilhante, minha orientadora, pelo estímulo contínuo, disposição incansável e disponibilidade permanente em todos os momentos da execução dessa pesquisa. Sinto que, mais que uma orientadora, tive, desde o período do Mestrado, uma entusiasta fiel que não mensurou esforços para obtermos êxito neste estudo;

Ao prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pela contínua solidariedade, ininterrupto equilíbrio e exemplar devoção à formação ética e técnica de novos pesquisadores, desde os bancos da graduação até o doutoramento;

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rossana Aguiar Cordeiro, pelas sugestões pragmáticas e bom humor, absolutamente necessários na formação de graduandos e pós-graduandos;

Ao prof. Dr. José Ajax Queiroz, meu mestre (ético e técnico), colega de docência, de Conselho Regional de Medicina e Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital das Clínicas/UFC, pelas imediatas e prestigiosas colaborações em vários momentos da pesquisa em geral e, em especial, quanto aos aspectos imunológicos e manuseio dos animais;

Ao prof. Dr. Roberto Wagner Bezerra de Araújo, colega de docência, de Conselho Regional de Medicina e Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital das Clínicas/UFC, pelas valiosas orientação e ponderação junto a análise histopatológica do modelo murino;

Ao prof. Dr. André Jalles Monteiro, responsável pela análise estatística dos trabalhos executados junto ao CEMM, pela disponibilidade, orientação e entusiasmo em face do nosso estudo;

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, Márcio Viana e Ilka Vasconcelos, além do então doutorando Jefferson Oliveira, pelo inestimável e decisivo auxílio nos experimentos bioquímicos deste trabalho;

Ao prof. Dr. Airton Rocha do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias (LIO) da UFC e seus pós-graduandos, em especial, Ana Caroline e Aryana Feitosa, pelas possibilidades de troca de experiências e execução do teste ELISA em nossos experimentos, sempre preches de simpatia e polidez;

Aos meus pais, Evando Moreira e Margarida Lopes Moreira, pelo estímulo e acesso à educação de qualidade que sempre me proporcionaram;

Aos colegas de Doutorado (Joyce Fonteles, Tereza Bandeira, Débora Castelo Branco, Jakelyne Marques, Eduardo Teixeira e Rita Amanda) pelas oportunidades de compartilhamento de ideias e experiências no árduo caminho da formação científica;

Aos colegas graduandos e pós-graduandos do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), pela salutar convivência e auxílio mútuo nos procedimentos laboratoriais;

Aos servidores do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC, Terezinha de Jesus, Daniel Lima e Carolinda Vilma S. Oliveira pela prontidão de seus préstimos, sempre que solicitados.

## RESUMO

Pesquisas científicas buscando a utilização de antígenos de *Coccidioides posadasii* são comuns na literatura especializada, uma vez que, são instrumentos relevantes para diagnóstico e possível efeito imunoprotetor em humanos. Diante do exposto, foi realizada caracterização bioquímica de antígeno protéico oriundo de *C. posadasii*. busca ativa de casos humanos de coccidioidomicose no Estado do Ceará, bem como, avaliação da resposta imunológica *in vivo*. Para concretizar tais objetivos, a caracterização bioquímica do antígeno foi realizada por meio de eletroforese (SDS-PAGE e 2D-PAGE), detecção de proteases, glicoproteínas e sequenciamento N-terminal e foram buscados, ativamente, quadros de coccidioidomicose em três caçadores de tatu com a respectiva descrição clínica e avaliação laboratorial. Ademais, foi descrito modelo murino de coccidioidomicose com testagem de possível efeito imunoprotetor do antígeno *in-house*. Quanto a análise bioquímica, observou-se delimitação de bandas nas faixas de 45-67 kDa e 67-97 kDa (SDS-PAGE), detecção de glicoproteínas, proteases e sequenciamento N-terminal demonstrando serem as bandas uma  $\beta$ -glucosidase e uma glutamina sintetase. Nos casos clínicos, foram encontrados queixas pneumônicas, exame micológico direto, cultivo de escarro, imunodifusão radial dupla (com antígeno *in-house*) e PCR positivos para *C. posadasii*. No modelo murino, o grupo infectado, na presença de antígeno e adjuvante, apresentou, na análise histopatológica, menores alterações pulmonares que os demais grupos, além de maior estímulo linfóide esplênico. No que concerne a dosagem de citocinas (IL-6, IL-12 e TNF $\alpha$ ), não se observou diferença significativa entre os grupos, mas uma tendência à resposta imunoprotetora. O grupo infectado, sem imunoproteção, apresentou maior perda ponderal. Na análise macroscópica, o máximo comprometimento foi a presença de 2 granulomas, neste último grupo. Na análise dos hemogramas, a série branca demonstrou maiores diferenças entre os grupos. Em conclusão, o antígeno *in-house* se mostrou tratar-se de uma  $\beta$ -glicosidase e uma glutamina sintetase que tenderam a estimular a imunidade celular em modelo murino. Além disso, a descrição de casos humanos contribui para a difusão do diagnóstico precoce da coccidioidomicose e requer investigações laboratoriais complementares.

**PALAVRAS-CHAVE:** coccidioidomicose, microepidemia, modelo murino, antígeno.



## ABSTRACT

Scientific researches seeking to use *Coccidioides posadasii* antigens are common in the literature, as relevant instruments to diagnosis and possible immunoprotector effect in humans. Thus, we performed biochemical characterization of protein antigen derived from *C. posadasii*, an active search for human cases of coccidioidomycosis in Ceará, as well as evaluation of immune response in vivo. To achieve these goals, the biochemical characterization of the antigen was performed by electrophoresis (SDS-PAGE and 2D-PAGE), detection of proteases, glycoproteins and N-terminal sequencing and we reported three human cases of coccidioidomycosis in armadillo hunters with its clinical description and laboratory evaluation. Further, a murine model was described testing a possible immunoprotector effect with an in-house antigen. For biochemical analysis, it was observed delimitation bands in ranges 45-67 kDa and 67-97 kDa (SDS-PAGE), detection of glycoproteins, proteases and N-terminal sequencing demonstrating the bands being a  $\beta$ -glucosidase and a glutamine synthetase. In clinical cases, it was found pneumonic disease, direct mycological examination, sputum culture, double radial immunodiffusion (antigen in-house) and PCR positive for *C. posadasii*. In the murine model, the infected group, in the presence of antigen and adjuvant, showed, histologically, lung disorders smaller than the other groups, and increased splenic lymphoid stimulus. Regarding the cytokines (IL-6, IL-12 and TNF), there was no significant difference between groups, but a trend toward immunoprotective response. The infected group, without immunoprotection, showed greater weight loss. In the macroscopic analysis, the maximum commitment was the presence of 2 granulomas in the latter group. In the analysis of blood counts, the white run showed major differences between groups. In conclusion, the in-house antigen showed that it was a  $\beta$ -glucosidase and a glutamine synthetase which tended to stimulate cellular immunity in a murine model. Moreover, the description of human cases contributes to the spread of early diagnosis of coccidioidomycosis and requires additional laboratory investigations.

**KEY-WORDS:** coccidioidomycosis, outbreak, murine model, antigen.

## LISTA DE FIGURAS

1	Cabeça preservada de Domingo Escurra, o primeiro paciente documentado com coccidioidomicose.....	17
2	Ciclo no hospedeiro humano <i>Coccidioides immitis/posadasii</i> .....	30
3	Forma saprofitica e parasitária <i>Coccidioides immitis/posadasii</i> .....	32
4	Aspecto de uma esférula de <i>C. posadasii</i> em exame direto, por microscopia óptica, em escarro de paciente hospitalizado.....	46
5	Locais do estudo: A - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC; B - Centro de Biomedicina – UFC.....	89
6	2D-PAGE: A – Focalizador Isoelétrico; B – Image Scanner UTA 110.....	92
7	Ensaio de imunoproteção em coccidioidomicose experimental: A – Inoculação da cepa fúngica; B – Inoculação do antígeno; C – Punção retrorbitária.....	101
8	Eletroforeses do antígeno protéico extraído: A – SDS-PAGE: B – 2D-PAGE (pH 4-7): as setas apontam diversos <i>spots</i> protéicos visibilizados .....	110
9	Eletroforese unidimensional demonstrando a presença de banda de proteases no antígeno extraído.....	111
10	Imunodifusão radial dupla (Ouchterlony) do antígeno extraído.....	112
11	Aspecto macroscópico e histopatológico de vísceras dos camundongos infectados (grupo 2). (A) granulomas renais; (B) histopatologia de tecido pulmonar revelando infiltrados inflamatórios, microhemorragia e necrose focal, na coloração de hematoxilina-eosina (Aumento original – 100X).....	116

## LISTA DE GRÁFICOS E TABELA

1	Gráfico 1 – Peso e macroscopia visceral nos grupos experimentais. (A) Pesagem dos animais, em gramas, no início e no final do experimento; (B) Análise da média de comprometimento macroscópico das vísceras, conforme escores de infecção do órgão.....	114
2	Gráfico 2 – Hemogramas e análise histopatológica nos grupos experimentais. (A) Hemograma: contagem média de leucócitos (LEU) e de linfócitos (LINF) por mm <sup>3</sup> em cada grupo observado; (B) Análise histopatológica das vísceras, conforme média de escores de lesão tecidual promovida.....	115
3	Gráfico 3 - Dosagem da concentração sérica de IL-6 nos grupos de camundongos.....	116
4	Gráfico 4 - Dosagem da concentração sérica de IL-12 nos grupos de camundongos.....	117
5	Gráfico 5 - Dosagem da concentração sérica de TNF- $\alpha$ nos grupos de camundongos.....	117
6	Tabela 1 - Comparação das sequências de aminoácidos N-terminal das bandas 45-67 kDa e 67-97 kDa presentes no antígeno extraído com sequências protéicas similares.....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
BSA	Albumina Sérica Bovina
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CEP-	Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital São José de Doenças
HSJ	Infecciosas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay - Ensaio imune ligado a enzima</i>
IL	Interleucina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase</i>
SDS-	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato
PAGE	de sódio
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1</b>	<b>Revisão da literatura</b> .....	16
1.1.1	Coccidioidomicose – Conceito e abordagem histórica.....	16
1.1.2	Aspectos epidemiológicos.....	23
1.1.3	<i>Coccidioides</i> spp: aspectos biológicos gerais.....	28
1.1.4	Patogenia e aspectos imunológicos.....	34
1.1.5	Aspectos clínicos.....	38
	Lesões cutâneas e mucosas.....	40
	Lesões torácicas.....	40
	Lesões no sistema nervoso.....	42
	Lesões ósseas e articulares.....	42
	Lesões em órgãos intrabdominais.....	43
	Lesões generalizadas.....	43
1.1.6	Diagnóstico laboratorial e radiológico.....	44
	Microscopia.....	44
	Cultura.....	45
	Imunodiagnóstico.....	46
	Histopatologia.....	49
	Diagnóstico molecular.....	50
	Provas fisiológicas.....	52
	Exames hematológicos.....	52
	Exame radiológico.....	52
	Exame líquórico.....	52
	Inoculação experimental.....	53
1.1.7	Diagnóstico diferencial.....	54
1.1.8	Tratamento.....	55
1.1.9	Profilaxia.....	58
<b>1.2</b>	<b>Perguntas de Partida</b> .....	61
<b>1.3</b>	<b>Hipóteses</b> .....	62

<b>1.4</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>63</b>
1.4.1	Objetivo geral.....	63
1.4.2	Objetivos específicos.....	63
<b>2</b>	<b>ARTIGOS PUBLICADOS.....</b>	<b>64</b>
	ARTIGO 1	
	ARTIGO 2	
	ARTIGO 3	
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>87</b>
	<b>A - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>88</b>
	Tipo de pesquisa.....	88
	Locais do estudo.....	88
	Seleção da cepa fúngica.....	89
	Obtenção do antígeno protéico.....	89
	Análise bioquímica.....	90
	Busca ativa, caracterização clínica e laboratorial de casos de coccidiodomicose humana no Estado do Ceará .....	93
	Ensaio de imunoproteção em coccidiodomicose experimental.....	97
	<b>B - MANIPULAÇÃO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO.....</b>	<b>102</b>
	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>109</b>
	Análise bioquímica do antígeno protéico extraído.....	109
	Análise laboratorial frente aos casos humanos de coccidiodomicose.....	112
	Ensaio de imunoproteção em coccidiodomicose experimental.....	113
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>118</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>119</b>
	APÊNDICE A.....	120
	APÊNDICE B.....	121

# 1 INTRODUÇÃO

A coccidioidomicose se apresenta como um desafio frente a distintos prismas abordados nos compêndios de Microbiologia Médica, em geral ou de Micologia Médica, em particular. Estudos que versam sobre a necessidade de aprofundamento dos aspectos moleculares intrínsecos aos seus agentes etiológicos (*Coccidioides immitis* ou *Coccidioides posadasii*), bem como o vislumbre de novas técnicas de diagnóstico visando evitar a arriscada manipulação do agente *per se*, são assíduos na literatura especializada. Somando-se às pesquisas do microrganismo e do diagnóstico mais célere e eficaz da doença, surgem modelos de infecção experimental que buscam antever certas e determinadas situações que possam atuar como auxílio à abordagem terapêutica, além de estabelecer o prognóstico na prática da clínica médica humana e/ou veterinária.

Com o evoluir das observações e investigações, tornou-se evidente que a coccidioidomicose se manifesta como micose sistêmica das mais intrigantes e, por isso mesmo, instigante tanto no que concerne ao diagnóstico semiológico quanto na avaliação em laboratórios de análise clínica ou, ainda, em instituições voltadas exclusivamente para a pesquisa. Essas últimas, comumente localizados em centros de Biomedicina, inseridas nas Faculdades de Medicina e/ou de Ciências Biomédicas. Apesar do esforço dessas instituições, a literatura especializada ainda carece de maior volume de resultados que permitam estender seus achados a efetiva aplicação nas lides diárias dos diversos serviços de saúde (v.g. hospitais ou centros de referência) que lidam com doenças infecciosas, pacientes imunodeprimidos (e.g., portadores de SIDA/AIDS, usuários de imunodepressores, transplantados, portadores de doenças auto-imunes e correlatos) além dos expostos em áreas de risco epidemiológico (escavadores de solos semi-áridos). Tal situação denota a necessidade de maiores investigações e a contínua interação dos achados da pesquisa básica com as descrições e acompanhamentos de casos clínicos em humanos e animais.

Um dos temas que pode tornar-se alvissareiro é o da utilização de antígenos com o escopo de estimular a resposta imune do hospedeiro e promover a primeira vacina aplicada a um agente fúngico em escala industrial. Não se deve olvidar, em tais pesquisas, as diferenças de caráter epidemiológico e filogenético que possam conduzir a respostas diferenciadas frente aos dois agentes conhecidos da coccidioidomicose. É certo que muito já foi publicado, entretanto ainda vislumbra-se um longo caminho a ser conhecido no que concerne ao grupo das micoses profundas, em geral e da coccidioidomicose, em particular.

## 1.1 Revisão de Literatura

### 1.1.1 Coccidioidomicose - Conceito e abordagem histórica

A coccidioidomicose recebe várias sinonímias, entre as quais destacamos: granulomatose coccidióidica, granuloma coccidióico, febre do Deserto, doença de Posadas-Wernicke, doença de Gilchrist, reumatismo do deserto, febre do Vale de São Joaquim e *California disease*. Trata-se de uma doença infecciosa; sem predileção por raça, sexo ou idade; endêmica nas Américas; de decurso agudo, subagudo ou crônico; de natureza fúngica e determinada por duas espécies desse grupo de microrganismos: *Coccidioides immitis* e *Coccidioides posadasii* (ODDS, 2003; LACAZ et al, 2002).

A classificação das doenças fúngicas, conforme o local de desenvolvimento primário do agente patogênico ou dos tecidos que são inicialmente colonizados, inclui a coccidioidomicose no grupo das micoses profundas, sistêmicas ou sistêmicas dimórficas. Essas são causadas por microrganismos inerentemente virulentos, que causam doenças em seres humanos saudáveis ou, comumente, imunodeprimidos. Frequentemente, essas infecções se instalam inicialmente nos pulmões após a inalação dos respectivos conídios, podendo evoluir para quadros disseminados (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; JAWETZ; MELNICK; ALDENBER, 2001).

Os casos iniciais da coccidioidomicose foram descritos em publicações isoladas. De fato, essa infecção fúngica é uma das raras doenças na história da Medicina, nas quais é possível obter registros seguros do caso pioneiro. Inicialmente, na Argentina, no ano de 1892, em um paciente portador de tumores cutâneos, o estudante de Medicina Alejandro Posadas em conjunto com o professor de Patologia Geral da Faculdade de Medicina de Buenos Aires, Robert Wernicke, descrevem o primeiro caso como sendo de *mycosis fungoides*. Tratava-se de um homem de 32 anos, Domingo Escurra, procedente da região do Pampa Central (no limite com a região do Charco, nordeste argentino), membro da cavalaria. Escurra acreditava ter sido vítima de uma picada de aranha, na face, onde observou a lesão inicial, com posterior desenvolvimento de lesões na região inguinal e na pele do tronco. Relatava ter tentado medicar-se utilizando tabaco e removendo as lesões com o uso de uma faca. Posteriormente, procurou assistência médica sendo instituído tratamento infrutífero com ácido nítrico, mercúrio e iodeto de potássio. Quando, finalmente, foi atendido no Hospital Universitário da capital argentina, queixava-se de lesões progressivas na pele da face e membros, evoluindo há um ano e acompanhadas de perda de peso, adinamia, aumento dos gânglios linfáticos e



distúrbios pulmonares. Posadas realizou uma biópsia de uma das lesões da pele e observou, ao microscópio óptico, células esféricas de tamanho diverso, com aparente membrana externa dupla e de conteúdo granular. Sendo assim, Posadas se tornou o primeiro a visualizar as esférulas do fungo que ele denominou *psorospermiae*. Desta forma, imaginou tratar-se de um protozoário capaz de provocar tumores, publicando o caso, com esse entendimento, anos mais tarde. O tratamento instituído para o paciente, por Posadas, não logrou êxito, vindo o mesmo a falecer cerca de cinco anos mais tarde, com grande sofrimento e após um período de cerca de nove anos de evolução do quadro (COX; MAGEE, 2004). Nos anos que se sucederam, Posadas, que se tornou cirurgião, realizou inúmeros experimentos – incluindo inoculação em animais - com o “protozoário”, pois acreditou até sua morte, em 1902, tratar-se de uma doença com etiologia parasitária. A cabeça de Domingo Escurra permanece, desde então, preservada no Instituto de Parasitologia de Buenos Aires, de forma que, os micologistas hodiernos possuem a invulgar oportunidade de observar um pedaço da história após mais de 110 anos da descrição do caso pioneiro (DICAUDO, 2006; RESTREPO, 2006; ODDS, 2003) (Figura1). Isso posto, embora tenham descrito o caso inicial e sejam considerados precursores na história da doença, esses pesquisadores não reconheceram tratar-se de um fungo o agente etiológico.



Figura 1 – Cabeça preservada de Domingo Escurra, o primeiro paciente documentado com coccidioidomicose (Fonte: ODDS, 2003)

Posteriormente, nos Estados Unidos, em 1896, Rixford e Gilchrist publicam sobre essa entidade mórbida descrevendo o primeiro caso norte-americano, mais precisamente no Vale de San Joaquin. Em julho de 1893, no hospital do condado de São Francisco, California, Estados Unidos, o Dr. C. N. Ellingwood examinou o paciente Joas Furtado-Silveira. Este era um emigrante das ilhas Açores, em 1886, residente na zona do Vale de San Joaquin, onde se

dedicava à agricultura. Queixava-se de lesões múltiplas na pele, do tipo tumorais, progressivas, com cinco anos de evolução. Ademais, apresentava-se com lesões oftálmicas e nasais, todas progredindo até provocarem sua morte, ocorrida dois anos mais tarde. Na sua autópsia, foi observado que a infecção estava disseminada pelos pulmões, glândulas suprarrenais, fígado, peritônio, baço e linfonodos. Foi estudado por Rixford (cirurgião radicado onde hoje se localiza a Faculdade de Medicina de Stanford) e por Girchrist (patologista da Faculdade de Medicina Johns Hopkins, em Baltimore). Foram esses pesquisadores - em publicação conjunta e auxiliados por um eminente parasitologista da época, C. W. Stiles - que cunharam o nome *Coccidioides* no microrganismo que visualizaram nas biópsias das lesões de Silveira (HIRSCHMANN, 2007). Reconheceram que se tratava do mesmo agente descrito por Posadas e, dessa forma, também acreditaram tratar-se de um protozoário, morfológicamente semelhante aos representantes da classe Sporozoa, gênero *Coccidia* e, por analogia, decidem denominá-lo *Coccidioides immitis* (RESTREPO, 2006; LACAZ et al, 2002).

No deitar das raízes do século XX, em 1905, os médicos William Ophus e Herbert Moffit, fizeram o cultivo de material de outro caso fatal de coccidioidomicose, na Califórnia. Inocularam tecido e pus do paciente no peritônio de porcos, o que desenvolveu infecção com evidências da disseminação do microrganismo para vários órgãos, incluindo uma proeminente orquite, com posterior isolamento de um agente filamentosos em meio de cultura. Realizaram, ainda, inoculações do micélio isolado em coelhos, o que promoveu, uma vez mais, o surgimento de vários órgãos afetados. Outros experimentos desses pesquisadores demonstraram que o agente se apresentava em duas formas: uma filamentosos – desenvolvida em temperatura ambiental e uma outra, esferular, quando no tecido do hospedeiro. Afastaram, desse modo, a etiologia parasitária da doença e demonstraram como sendo causada por um agente micológico. Descreveram, também, alguns pacientes cujas lesões cutâneas estavam ausentes, mas que apresentavam lesões pulmonares. De fato, as lesões dermatológicas em alguns animais inoculados não surgiam de imediato. Desta forma, sugeriram que alguns casos assomaram-se pela inalação do agente. Nas duas décadas subsequentes, vários artigos descrevem casos da doença enfatizando a via respiratória como a principal entrada do agente causal no hospedeiro (HIRSCHMANN, 2007).

Sem perder de vista o risco de contaminação por inalação, em 1914, iniciam-se estudos sobre a imunologia do agente da coccidioidomicose. Cook, utilizando um extrato seco de cultura do microrganismo, aplicou um antígeno do fungo para execução de testes cutâneos e testes sorológicos de precipitação e fixação do complemento. Tais experimentos, somados a

outros que o sucederam até o final da década de 20, incluindo a primeira realização de provas intradérmicas com filtrado de *C. immitis* – ocorrida em 1927 (HIRSCH;BENSON, 1927), proporcionaram a utilização de um antígeno (“coccidioidina”) para testes cutâneos e inquéritos epidemiológicos com o escopo de demarcar as áreas de prevalência da doença (COOK, 1914 apud HIRSCHMANN, 2007).

Até este momento, a coccidioidomicose somente fora descrita na sua forma disseminada, conhecida como “granuloma coccidióidico” (COX, MAGEE; 2004). Em 1929, um estudante da Faculdade de Medicina da Universidade de Stanford, Harold Chope, aspira, acidentalmente, uma placa contendo um cultivo de *C. immitis* no laboratório do prof. Ernest Dickson. Nove dias após o incidente, o aluno de 26 anos inicia um quadro de dor torácica associada com tosse e expectoração purulenta, eventualmente com presença de sangue, associado, posteriormente, com eritema nodoso. Sua radiografia de tórax demonstrava um processo de pneumonite de lobo superior. Foi observado, à microscopia, presença de esférulas na secreção pulmonar além da demonstração do cultivo do agente em meio de cultura e em infecção induzida em porco – o que confirmou o diagnóstico. Sendo examinado pelos médicos do serviço, sua situação clínica foi considerada grave e de prognóstico sombrio. A despeito do quadro, Chope melhorou progressivamente e recebeu alta médica. O caso do estudante foi emblemático, uma vez que, anos após, em visita ao Condado de Kern, Califórnia; Dickson – responsável pelo laboratório onde ocorreu o acidente – promoveu um estudo em cooperação com o departamento de Saúde Pública do Condado que resultou no entendimento de relevantes aspectos epidemiológicos e clínicos da doença (fundamentados na descrição de diversos casos adquiridos na região, além de outros acidentes em laboratórios de pesquisa), sua confirmação como sendo a mesma entidade nosológica conhecida como “febre do Vale” ou “febre de San Joaquin”, seu isolamento em solo ambiental, além da possibilidade de desenvolvimento de quadros clínicos limitados ao sítio pulmonar, de prognóstico mais favorável (HIRSCHMANN, 2007). Além disso, propõe o termo “coccidioidomicose” para designar todas as apresentações da doença causada pelo fungo *Coccidioides immitis* (COX; MAGEE, 2004). Registra-se, ainda no decênio de 30 do século XX, a descrição do primeiro isolamento em solo do *Coccidioides immitis* (STEWART; MEYER, 1932).

Na década de 40 do século passado, pouco tempo antes do ingresso dos Estados Unidos na Segunda Grande Guerra (1939-1945), a força aérea norte-americana decide realizar treinamentos na área do Vale do San Joaquin, por tratar-se de região com adequadas condições climáticas além da ampla disponibilidade de locais para possíveis pousos emergenciais. Charles E. Smith - ex-aluno do professor Dickson e que promoveu importantes

contribuições aos estudos da doença - tenta, infrutiferamente, demover os militares da ideia. A despeito disso, realiza avaliações nos membros das forças armadas envolvidos no treinamento militar e descreve mais alguns relevantes achados sobre aspectos epidemiológicos e clínicos da coccidioidomicose relacionados à resposta do hospedeiro a infecção, bem como fatores prognósticos da morbi-mortalidade (HIRSCHMANN, 2007). Resalte-se, ainda, a concomitante descrição de casos em animais – silvestres ou domésticos – como os estudos de Maddy, em 1958, que, em uma revisão de cem cães enfermos, observou que a forma disseminada da doença nestes é mais frequente que em humanos. De fato, numerosos animais podem, espontaneamente, infectar-se e evoluir com coccidioidomicose, a exemplo de roedores, carneiros, cavalos, macacos diversos e mesmo lhama (*Lama glama*) (LACAZ et al, 2002). Ratificando tais descrições, há relatos de achados de esférulas do microrganismo em restos esqueletizados de um bisão (*Bison antiquus*) datado de 9.000 anos e que teria habitado o estado norte-americano do Nebraska (FISHER et al, 2001).

Ao longo da centúria passada, inúmeros trabalhos e relatos em publicações internacionais especializadas permearam a abordagem da coccidioidomicose sob os mais variados prismas. Encontram-se estudos desde a avaliação dignóstico-terapêutica até, mais recentemente, sua participação nas infecções de imunodeprimidos (v.g. SIDA/AIDS), usuários de próteses, pesquisa de vacinas, além da utilização como potencial arma no bioterrorismo (DICAUDO, 2006; ODDS, 2003). Desde então, observa-se a elevação da incidência de casos em certas regiões dos Estados Unidos, como no Arizona, que no período de 1995 a 2001, verificou uma elevação de 186% no registro da doença (CENTER OF DISEASES CONTROL, 2003). O CDPH (*California Department of Public Health*) registrou 20.931 casos de coccidioidomicose, no período de 2001 a 2009, com pico de 3.043 casos em 2006 (HECTOR et al, 2011). Tal fato denota a relevância dada, pela literatura científica, ao estudo deste microrganismo.

No Brasil, previamente a descrição dos primeiros casos clínicos, vários pesquisadores moveram esforços no sentido de conhecer a situação epidemiológica da circulação do *Coccidioides* spp em algumas regiões do território brasileiro. Em um primeiro momento, Versiani (1946) e Lacaz (1948), por meio do emprego de testes cutâneos com “coccidioidina”, verificaram a inexistência de reação cruzada quando da utilização deste antígeno em portadores de paracoccidioidomicose. Posteriormente, em 1960, foi avaliada a positividade ao teste em cerca de 750 pacientes, procedentes de diversos lugares do país, internados nos serviços do Hospital das Clínicas e Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Esse último estudo encontrou somente um dos pacientes com evidência de positividade

(LACAZ et al, 1960). Na década seguinte, Fonseca et al (1973) com 500 pacientes e Lacaz et al (1978) com 393, realizaram nova avaliação com testes cutâneos em grupos provenientes, respectivamente, da região Norte e em internos de um hospital geral de São Paulo. Fonseca não encontrou positividade em nenhum dos indivíduos avaliados, ao passo que Lacaz observou em somente um, proveniente do Estado da Bahia.

Frente a estes resultados, os autores mencionados concluíram que a coccidioidomicose não era endêmica nas áreas pesquisadas, é dizer, a região Amazônica e o sudeste brasileiro. Não obstante, Lacaz advertiu da necessidade de estender tais inquéritos imunoalergênicos para outras áreas do país, a exemplo da região Nordeste, uma vez que, encontram-se condições geoclimáticas favoráveis para isolamento do *Coccidioides* sp, em certos sítios (MARTINS et al, 1997).

Os primeiros casos clínicos de coccidioidomicose, no Brasil, foram descritos por Gomes et al, em publicação de 1978, e por Vianna et al, em 1979. Gomes e colaboradores descrevem um paciente oriundo de Piratininga, no semi-árido da Bahia, com queixas de hemoptise e apresentando opacidades pulmonares associadas com cavitação em lobo inferior esquerdo. A confirmação diagnóstica ocorreu por meio de estudo histopatológico de peça cirúrgica (lobectomia). Vianna et al (1979), reivindicando a primazia do relato do primeiro caso de nativo do Brasil, descrevem um paciente de 35 anos, lavrador, natural do Piauí, trabalhando no Distrito Federal e com queixa de epigastralgia. Ao realizar-se uma radiografia de tórax, foram observados múltiplos nódulos pulmonares. Realizaram-se biópsias do material suspeito e envio, incontinente, para estudo histopatológico com coloração pela hematoxilina-eosina, PAS e prata metenamina. Desta maneira, foi confirmado que tratava-se de infecção por *Coccidioides immitis*.

Descritos os casos iniciais, uma ampla lacuna temporal foi percorrida até que novos casos da doença fossem diagnosticados no país. Destaca-se o trabalho de Kuhl et al (1996) que faz referência a uma ocorrência de 1989, com instalação de localização rara da doença (laríngea), em um paciente cearense, agricultor, 74 anos, proveniente do município de Jaguaribara e que iniciou seu quadro clínico com queixa de disfonia. Considerando as semelhanças geoclimáticas entre a região cearense do caso descrito de 1989 e as áreas reconhecidamente endêmicas da infecção – sudeste dos Estados Unidos e norte do México – foi realizado um inquérito epidemiológico, em 1993, avaliando 87 nativos daquela localidade e utilizando, como antígeno, a “esferulina” em testes intradérmicos (detentora de maior sensibilidade que a “coccidioidina”). Verificou-se positividade, após leitura de 24 horas, em

26,4% dos indivíduos submetidos à prova cutânea. Tal achado aventou a possibilidade da ocorrência endêmica da doença em terras alencarinas (DIOGENES et al, 1995).

Registra-se, ainda, a descrição de surto epidêmico, em 1991, envolvendo três casos humanos, acompanhados de oito cães envolvidos em caçada de tatu (*Dasypus novemcinctus*) e ocorridos na localidade de Oeiras, no Estado nordestino do Piauí (WANKE et al, 1999). Um novo surto epidêmico, ocorrido em 1995, foi descrito por Sidrim et al (1997) e Silva et al (1997) como sendo o segundo surto brasileiro, no município de Aiuaba – sudoeste cearense, desta feita com a participação de quatro homens e dois cães novamente em caçada de tatu. Eulálio em 2000, em pesquisa direcionada para estudo exclusivo de tatus nas localidades de Oeiras, Paulistana, Aroazes e Passagem Franca – Estado do Piauí – verificou o isolamento de *Coccidioides* em 3 de 26 animais analisados (11,54%), o que demonstra a presença do microrganismo em reservatório animal no Nordeste brasileiro.

Desta forma, no lapso temporal compreendido entre 1982 e 1998, foram descritos doze casos clínicos de coccidioidomicose humana no Brasil com confirmação, de forma individual ou associada, com achados histopatológicos, sorológicos ou de cultura - publicados ou apresentados em congressos médicos. Os mencionados casos ocorreram nos Estados do Ceará, Bahia, Maranhão e Piauí – uma vez mais, em áreas favorecidas pelas características geoclimáticas propícias ao desenvolvimento da coccidioidomicose (WANKE et al, 1999; MORAES et al, 1998).

Desde então, a descrição de casos desta micose sistêmica vem se somando em relatos de diversos autores, dentre os quais citamos: Costa et al, 2001 (agricultor de 19 anos, proveniente do município de Boa Viagem, Ceará, diagnosticado em 2000), Veras et al, 2003 (agricultor de 20 anos, proveniente do município de Bertolândia, Estado do Piauí, diagnosticado em 2002), Bandeira, 2008 (em revisão de casos no Ceará, relata no período de dezembro de 2003 a março de 2007, a ocorrência de oito casos em vários municípios: Santa Quitéria, Solonópolis, Arneiroz, Ibiapina, Sobral e Jaguaribe) e Brilhante et al, 2012 (três caçadores de tatu, dois deles pai e filho; com idade de 48, 46 e 13 anos; provenientes do município cearense de Santa Quitéria, com quadro pulmonar e internados em hospital especializado na assistência a doenças infecciosas).

Questão difícil é a de determinar se o agente da coccidioidomicose existia previamente em solo nordestino ou trata-se de veiculação, via correntes aéreas, procedente de zonas endêmicas da micose (LACAZ et al, 2002). Isso posto, considerando as semelhanças edafoclimáticas de outros sítios do mundo, hodiernamente a região Nordeste do Brasil se configura como de interesse epidemiológico para a presença de coccidioidomicose (WANKE

et al., 1999; COX; MAGEE, 2004) e, dessa forma, assume importância ímpar no interesse dos estudos em Micologia Médica.

### 1.1.2 Aspectos epidemiológicos

A coccidioidomicose é tida como doença endêmica em várias regiões do continente americano. Dá-se a denominação de endemia à ocorrência coletiva de uma determinada doença que, no decorrer de um longo período histórico, acometendo sistematicamente grupos humanos distribuídos em espaços delimitados e caracterizados, mantém a sua incidência constante, permitidas as flutuações de valores, tais como as variações sazonais. Percebe-se que o termo endemia refere-se à doença habitualmente presente entre os membros de um determinado grupo, em uma determinada área, é dizer, presente em uma população definida (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003).

A despeito da descrição inicial da coccidioidomicose ter se efetuado na Argentina – conforme abordado nos aspectos históricos – a maior parte dos casos descritos hodiernamente, encontram-se concentrados nos Estados Unidos da América (EUA), mais precisamente nos estados do Texas, Arizona, Novo México, Califórnia, Nevada e Utah. De mais a mais, esta micose é tida como relevante problema de saúde pública nos EUA (HECTOR et al, 2011; CHILLER et al, 2003). Estima-se que a quantidade de casos descritos corresponda a menos de 25% dos existentes. A fim de elevar os índices de diagnóstico, é recomendável que egressos de regiões endêmicas, portadores de pneumonia comunitária, sejam submetidos a testes diagnósticos a fim de determinar ou afastar a presença do agente fúngico (STERN; GALGANI, 2010).

As demais áreas de registro de casos parecem convergir para regiões endêmicas nas Américas, a exemplo do México, Honduras, Nicarágua, El Salvador, Guatemala, Venezuela, Colômbia (GODOY, 1990), Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil (DIXON, 2001).

Casos diagnosticados fora das áreas endêmicas são, em sua maioria, importados (DE HOOG et al, 2000). Realmente, o transporte de artroconídios para além das regiões consideradas como endêmicas pode ocorrer por meio de artefatos (*e.g.*, vestes, produtos agrícolas, peças arqueológicas) o que origina o diagnóstico de casos em países com condições geoclimáticas inteiramente díspares das áreas endêmicas, a exemplo da Ásia Central, Índia (OBEROI et al, 2012; VERGHESE et al, 2002), Rússia, Nigéria, Europa (Inglaterra, Itália, Bélgica e Alemanha) e Canadá (GOBBI et al, 2012; SEKHON et al, 1991). De fato, o aumento recente da descrição de casos de coccidioidomicose humana está melhor relacionado

com questões ambientais e não com características genéticas do hospedeiro. O aumento do turismo e de negócios em áreas reconhecidamente endêmicas está elevando a chance de diagnóstico da doença em áreas externas as tradicionais, com estimativas de 150.000 novos casos relacionados com viajantes, fato este que deve ser questionado nas anamneses e inquéritos destes pacientes (SAUBOLLE et al, 2007).

Isso posto, micologistas e clínicos devem manter-se atentos para a ocorrência da doença em locais de descrição tradicionalmente atípicos além de pacientes com quadros de imunodepressão, pelos mais distintos motivos, imigrantes das áreas endêmicas (v.g., usuários crônicos de corticoesteróides, transplantados) (DESAI, et al, 2001).

É preciso ter em mente, ainda, a situação epidemiológica dos viajantes (turísticos ou por motivos profissionais). Considerando que o quadro clínico da coccidioidomicose pode manifestar seus sinais e sintomas após semanas do contato com o agente fúngico, é possível que o surgimento da doença ocorra quando do retorno de tais migrantes a seus sítios de origem, onde, via de regra, o diagnóstico dessa micose sistêmica não é considerado (PANACKAL et al, 2002). Observe-se casos como a cidade de Nova Iorque, nos Estados Unidos da América, uma região não endêmica da doença mas que, pelo caráter cosmopolita de seus habitantes, dispõe de um significativo número de casos clínicos de infectados com *C. immitis* com as mesmas características de fenotipagem dos microrganismos próprios do sudoeste norte-americano, é dizer, de área reconhecidamente endêmica. Tal situação pode contribuir para erros diagnósticos quando se considera simplesmente as características clássicas de risco em certas regiões das Américas (CHATUVERDI et al, 2000).

A característica descrição dos casos clínicos em sítios de clima semi-árido, índices pluviométricos inferiores a 800 mm/ano, elevadas temperaturas, extensos períodos de estiagem além de solos alcalinos e vegetação xerófila, parece favorecer o diagnóstico em áreas com tais peculiaridades biogeográficas e que costumam ser encontradas entre 34° de latitude Norte e 40° de latitude Sul no continente americano, típicas da zona bioclimática chamada *Lower Sonoran Life Zone* (SAUBOLLE et al, 2007). A mencionada zona se caracteriza pelos quentes meses de verão, frio pouco intenso no inverno além de solos alcalinos (CHILLER et al, 2003). Dessa forma, se a compreensão e monitoração dos fatores climáticos forem melhor explorados nos estudos epidemiológicos da doença, incluindo o tratamento dos solos e o desenvolvimento de um sistema avançado de vigilância epidemiológica no serviço público, pode-se vislumbrar um possível controle mais eficaz da micose (COMRIE, 2005).



Parte das razões do atual estado de conhecimento sobre os fatores climáticos e sua interferência na coccidioidomicose reside na pobre disponibilidade de séries regulares e de longo prazo comparando condições climáticas e a existência de determinados microrganismos em certa região. Isto é particularmente verdade no que se refere a informações referentes ao solo e condições atmosféricas (v.g., pela análise da PCR para detecção do fungo em amostras de solo). Pelo exposto, a mera descrição da incidência de casos diagnosticados é o único parâmetro de longa análise disponível para verificação de sua intensidade em certa área. Não obstante, o uso de dados da doença humana para investigação da relação clima-microrganismo pode introduzir uma série de vieses. Descrições de incidência não promovem uma série homogênea devido a variações nas informações que alimentam os serviços de vigilância epidemiológica a exemplo das mudanças no perfil demográfico de certas populações e a introdução de novos testes diagnósticos em certo agrupamento. Soma-se a isso a imprecisão diagnóstica no que concerne a intersecção de sinais e sintomas clínicos em várias doenças dos sítios respiratórios além da ampla variação no período de incubação e início dos sintomas de caso a caso (COMRIE, 2005).

Curiosamente, embora a região Nordeste brasileira disponha de uma conjuntura de características edafoclimáticas que criam condições de crescimento para fungos do gênero *Coccidioides* (áreas com índice pluviométrico de 850 mm/ano, altitude entre 700 e 900 m, solo bruno não-calcáico e fitoecologia de floresta caducifólia espinhosa, é dizer, caatinga arbórea), os casos descritos até o momento não somam muitos, em termos absolutos, e restam concentrados nos Estados do Ceará, Piauí, Maranhão e Bahia. Destaque-se a estimativa de ocorrência nos Estados Unidos da América com 150.000 novos casos por ano, além da estimativa de dois terços não diagnosticados. Somam-se a esses os quadros de resolução espontânea da infecção, sem instituição de terapia, em mais de 90% dos pacientes (HECTOR et al, 2011; BIALEK et al, 2004).

Acrescentam-se às condições biogeográficas, certas e determinadas características epidemiológicas da doença como: participação em caçadas de tatus, falta de cuidados com biossegurança em operários da construção civil (DAS et al, 2012), escavação de poços artesanais, ocorrência no homem e em um largo espectro de animais - incluindo os domésticos, além de golfinhos (REIDARSON et al, 1998; MORAES et al, 1998), tigres, coiotes, raposas, texugos, leões (ADASKA, 1999) e até koala (BURGDORF-MOISUK; STALIS; PYE, 2012). O cão é o de principal ocorrência, sucedendo, em frequência, ao homem. Nestes animais, a forma assintomática é a mais cediça, com evolução quase sempre favorável e tendência a cura espontânea, embora possam eventualmente evoluir para formas

disseminadas e graves, inclusive com lesões oftalmológicas, o que gerou diversos testes de detecção de antígeno, nesses animais (KIRSCH et al, 2012).

Durante certo tempo, ratos do deserto (especialmente do gênero *Peromyscus*), além de outros pequenos roedores de regiões desérticas foram tidos como reservatórios deste gênero fúngico, mas, conforme posteriormente demonstrado, tratava-se de vítimas desta micose sistêmica. Em verdade, o *C. immitis* pode sobreviver por períodos variáveis sobre a pelagem desses animais de áreas endêmicas, podendo contribuir para a dispersão do agente. Não obstante, no Brasil, a descrição dos casos em cães ter relação intrínseca com a participação em caçada de tatus, em outros países, a exemplo da Nigéria, tal ocorrência é mais larga e considerada como relevante problema de saúde pública. Destacam-se, ainda, estudos pioneiros promovidos nos EUA, em 1957, quando em inquérito epidemiológico no Estado do Arizona foi detectada positividade em 201 cães com 49,3% destes, assintomáticos. Soma-se a este, outro trabalho que descreve testes intradérmicos reagentes em cerca de 18,6 a 47% de cães que habitam áreas endêmicas da coccidioomicose. Alguns autores chegam a sugerir o cão como possível animal sentinela para detecção de áreas de risco para exposição humana ao fungo (GAUTAM et al, 2012).

No Ceará, registra-se a descrição de 19 casos no período de 1996 a 2008 com a prática esportiva da caçada de tatu detentora de relevância epidemiológica, uma vez que, é a responsável pela maior parte dos casos clínicos descritos (BANDEIRA, 2008). Tal fato pode justificar a descrição, por certos autores, do sexo masculino como de maior incidência da doença (CRUM et al, 2004b) uma vez que, relaciona-se com maior risco ocupacional. Os tatus são mamíferos de hábitos terrestres (com grande habilidade para escavar o solo), fossoriais (habitam a toca escavada, facilitando, desta forma, o contato com os artroconídeos fúngicos), associais (solitários) e crepusculares/noturnos (maior atividade ao final do período vespertino e no período noturno). Dentre as espécies de tatu observadas no Ceará assumem destaque: *Dasyus novemcinctus* ou tatu-galinha e *Euphractus sexcinctus* ou tatu-peba (Figura 4). O consumo de sua carne ocorre, predominantemente, pela população da zona rural (Sertão Central, Inhamuns, Noroeste do estado e Médio Jaguaribe), além de ter a carapaça utilizada para confecção de utensílios domésticos (PEREIRA JUNIOR et al; 2003). O revolver do solo, tipicamente realizado no momento da caçada, em busca das tocas do tatu, acabam por dispersar os artroconídios fúngicos presentes no local e, dessa forma, promover a inalação pelos caçadores humanos e cães acompanhantes.

Uma vez que a infecção não se adquire pelo contato interpessoal e sim pela aspiração dos artroconídios fúngicos – alguns autores acreditam na possibilidade de infecção pela via digestiva. Convém distinguir, ainda, os grupos de maior frequência epidemiológica descritos na literatura. Nesses estão incluídas as seguintes categorias de risco: idosos residentes em áreas endêmicas (LEAKE et al, 2000), portadores de doenças crônico-degenerativas (v.g., *diabetes mellitus*, doença pulmonar obstrutiva crônica, neoplasias malignas), transplantados (BLAIR, LOGAN, 2001), grupos étnicos (e.g., filipinos, hispânicos, negros), tabagistas (devido sua atuação no sistema imune das mucosas)(WHEAT, 2009), imunossuprimidos (v.g., hematopatas, usuários de quimioterápicos, imunossupressores e/ou corticoesteróides) (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS et al, 2004) além de indivíduos do grupo sanguíneo A, B ou HLA classe II DRB1\*1301 (CRUM et al, 2004a; LOUIE et al, 1999) além da ocorrência do estado gravídico. Convém destacar que o uso de agentes antifúngicos orais pode prevenir a doença pulmonar severa em grupos considerados de alto risco a exemplo dos idosos, diabéticos e fumantes (ROSENSTEIN et al, 2001).

A presença da gestação é observada, na Medicina humana, como relevante risco para coccidioidomicose disseminada, em particular no curso do 2º e 3º trimestre da gravidez, a despeito da taxa de mortalidade materna e dos quadros de abortamento não se apresentarem com frequência elevada (CALDWELL et al, 2000). Conforme bem demonstrado na literatura obstétrica especializada, o período gestacional se caracteriza por alterações hormonais significativas (v.g., produção placentária hormonal, elevação dos níveis de progesterona) além de depressão da imunidade celular (CUNNINGHAM et al, 2009), o que pode beneficiar o desenvolvimento da micose sistêmica. Um outro aspecto curioso da associação gestação/coccidioidomicose diz respeito ao favorecimento de um bom prognóstico destas gestantes infectadas quando desenvolvem, concomitantemente, quadros de eritema nodoso (ARSURA; KILGORE; RATNAYAKE, 1998). Por outro prisma, a associação gestação/*diabetes mellitus* torna mais gravoso o desenlace gestacional (PETERSON et al, 1993). Outro ponto a considerar é que embora tenha sido demonstrado a presença do fungo na cavidade uterina e na placenta das gestantes infectadas, os casos de doença perinatal são de baixa frequência (CRUM; BALLON-LANDA, 2006). Não obstante, a terapêutica no período gravídico é complicada pela possibilidade de teratogenia frente a derivados azólicos (BERCOVITCH et al, 2011).

É oportuno mencionar a associação deste agente micótico com outras doenças infecto-contagiosas de comum diagnóstico. Inicialmente, o paciente portador do Vírus da

Imunodeficiência Humana (HIV). *A priori*, constata-se pequena taxa de mortalidade, relacionada com a coccidioidomicose, em pacientes com quadro de SIDA/AIDS. Embora a morbidade por infecção fúngica neste grupo de pacientes não seja incomum, a frequência de óbitos, no Brasil, apresentam-se com maior relevância em portadores de outras micoses sistêmicas a exemplo da paracoccidioidomicose, criptococose e histoplasmose (PRADO et al, 2009).

Ressalte-se, também, a possibilidade de coinfeção em pacientes portadores de tuberculose ou, ainda, possíveis erros diagnósticos promovidos pela semelhança entre os quadros clínicos, na apresentação pulmonar, das duas entidades mórbidas. Soma-se a este fato a realização de tratamentos empíricos para a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* sem a confirmação radiográfica e/ou laboratorial dos casos além de possíveis efeitos das drogas antituberculose frente ao crescimento do fungo (CORDEIRO et al, 2006b).

A coccidioidomicose é considerada, nos Estados Unidos, doença endêmica de notificação compulsória, sendo classificada no ICD-9-CM (*International Classification of Diseases, Ninth Revision, Clinical Modification*) sob o código: 114.0 ao 114.5 e 114.9 (AMPEL et al, 1998). Nesse país, o Estado do Arizona respondeu por 60% dos casos sintomáticos descritos, com incidência em torno de 5000 casos/ ano, nos anos de 2006 e 2007, sem considerar o aumento contínuo das manifestações clínicas em animais como cães e gatos (AMPEL, 2009).

No Brasil, não é parte do rol das doenças com notificação compulsória, tendo sido removida da lista de agravos para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Contudo, por tratar-se de doença inusitada, deve sempre ser notificada (GARCIA et al, 2000).

### 1.1.3 *Coccidioides* spp: aspectos biológicos gerais

Sendo, provavelmente, o mais virulento de todos os patógenos fúngicos que afetam o homem (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010), os membros do gênero *Coccidioides* se caracterizam como sendo ascomicetos haplóides inseridos no reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Onygenaceae - a mesma de outros patógenos fúngicos respiratórios como *Histoplasma*, *Blastomyces* e *Paracoccidioides*. Esses microrganismos se destacam por apresentarem uma fase saprofítica (detentora de um micélio que produz arthroconídios enterotáticos) e uma fase parasitária (evidenciada por esférulas endosporulantes) (COX; MAGEE, 2004).

O gênero *Coccidioides*, até 2002, albergava somente uma espécie: *Coccidioides immitis*. Com o trabalho de Fischer et al (2002), reconhece-se a existência de uma segunda espécie ainda mais disseminada que a primeira descrita e denominada *Coccidioides posadasii* ou ainda *Coccidioides immitis* não-californiano. Por meio de análises filogenéticas, avaliação de polimorfismos de nove sequências de microssatélites no ácido desoxirribonucleico (DNA), além do estabelecimento de ritmos diversos de crescimento (*C. immitis* é melhor adaptado a meios de elevada concentração salina), verificaram-se relevantes diferenças funcionais, embora sejam indistinguíveis sob o prisma macromorfológico.

De fato, as diferenças entre as duas espécies são somente genéticas, consideradas crípticas, conforme já descritas em fungos patogênicos e de vida livre com proximidade filogenética ao *Coccidioides* sp como *Auxarthron zuffianum* e *Uncinocarpus reesii* (KOUFOPANOU et al, 2001; PAN et al, 1994). Não obstante, o isolamento reprodutivo das duas espécies do gênero *Coccidioides* parece ter ocorrido há mais de onze milhões de anos (FISHER et al, 2002a; FISHER et al, 2002b). Não se pode olvidar o trabalho pioneiro de Zimmermann e colaboradores, em 1994, ao demonstrar que, apesar de indistinguíveis sob o prisma morfológico, as duas espécies poderiam ser classificadas em grupos distintos conforme sua origem biogeográfica: um restrito à região da Califórnia, nos Estados Unidos, e um outro estranho a esta área. Fisher et al (2001), por meio de análises da sequência de três genes – desoxigenase, serina protease e quitinase – sugerem que as populações sul-americanas deste fungo teriam surgido a partir das populações da América do Norte, por meio de co-migração em mamíferos susceptíveis, em um período ocorrido entre 9.000 e 140.000 anos. Estudos mais recentes têm demonstrado, de forma mais efetiva, a existência de inúmeras regiões de compartilhamento genético entre as duas espécies, denotando origem comum (NEAFSEY et al, 2010).

Ressalte-se, assim, as desigualdades de natureza biogeográfica na distribuição das duas espécies. Enquanto *C. immitis* parece restrito à região da Califórnia, nos Estados Unidos da América (os ditos isolados “californianos”); *C. posadasii* (anteriormente designado isolado “não-californiano”) apresenta-se em espaço geográfico mais largo a exemplo de outras áreas dos Estados Unidos, México, países da América Central e da América do Sul (FISCHER et al, 2001).

Esse microrganismo se apresenta na natureza e em meios de cultura de uso comum (v.g. ágar-Sabouraud, ágar-batata) na sua forma saprófita, em temperaturas que variam de 25° a 30° C. Tal forma apresenta-se como hifas septadas de 2 a 4 µm de diâmetro que, no período de 5 a 7 dias, formam uma cadeia de artroconídeos, de desenvolvimento enteroártrico,

multinucleados (com, no mínimo, dois núcleos) e alternados por células frágeis, menores, não viáveis e desprovidas de material citoplasmático, denominadas disjuntoras (DE HOOG et al, 2000). Essas últimas se degeneram, liberando os artroconídeos que apresentam em suas extremidades resquícios da parede celular das células disjuntoras e prontamente ficam em suspensão no ar. Esses artroconídeos podem germinar e formar uma nova hifa ou podem servir de forma infectante, comumente no sítio pulmonar, para o homem ou outros hospedeiros (Figura 2).

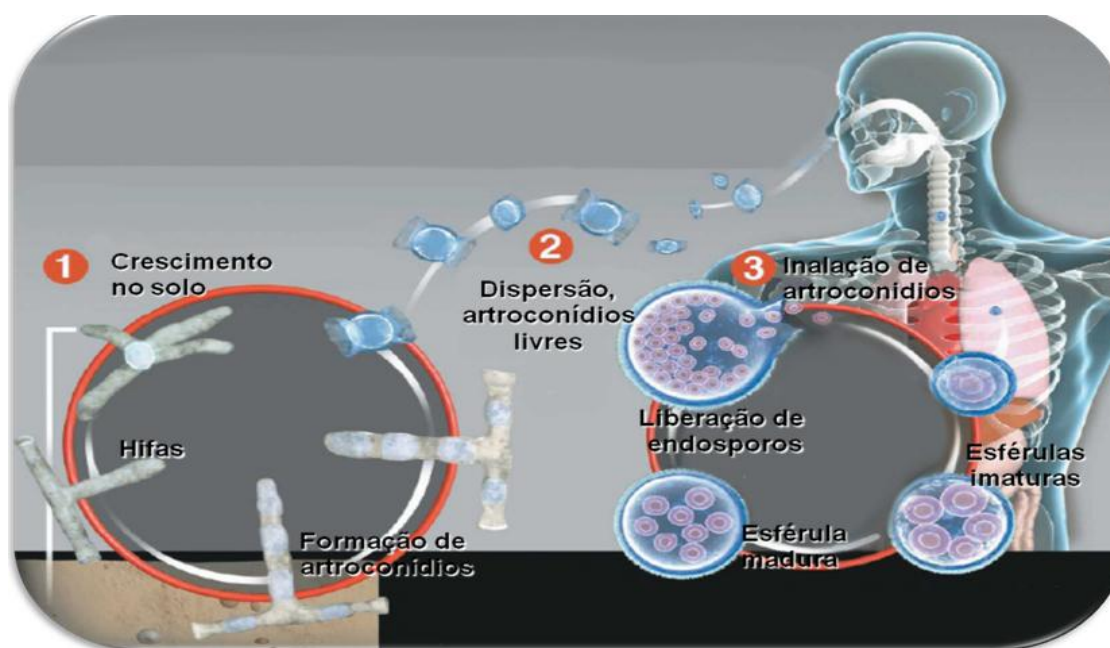


Figura 2 – Ciclo no hospedeiro humano *Coccidioides immitis/posadasii* (Fonte: Adaptado de HECTOR; LANIADO-LABORÍN, 2005).

Medindo cerca de 2,5 a 4  $\mu\text{m}$  de largura e 3 a 6  $\mu\text{m}$  de comprimento (portanto capazes de alcançar os alvéolos pulmonares quando inalados), os artroconídeos, na presença de células fagocíticas, em elevada concentração de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e temperatura em torno dos 36° C, convertem-se numa apresentação morfológica diferente. Envoltos por uma camada externa, os artroconídeos se agrupam, aumentam de volume e produzem uma estrutura esférica imatura, cuja região central é ocupada por um vacúolo. Em seguida, o núcleo se divide e é acompanhado pela partição do citoplasma através da extensão centrípeta da parede celular em múltiplos pontos (KIRKLAND; COLE, 2002). A compartimentalização progressiva do citoplasma, em torno do vacúolo, forma uma região uninucleada que se agrupa e diferencia-se. A divisão e segmentação nuclear se completa pela produção de uma esférula madura, de paredes espessas, que mede, aproximadamente, 80 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro e forma endósporos de paredes igualmente espessas, no seu interior, no período de 48 h, *in vivo*, e de

30 a 96 h, *in vitro*. Dando continuidade a segmentação, os endósporos se tornam arredondados no interior da esférula madura - que pode conter de 200 a 300 endósporos (COX; MAGEE, 2004).

Posteriormente, as esférulas maduras se rompem e liberam os endósporos com diâmetro medindo de 4 a 10  $\mu\text{m}$  e que, *in vivo*, aumentam e originam uma segunda geração de esférulas (que produzem uma média de novos 200 a 300 endósporos) estabelecendo, assim, o ciclo: esférula  $\rightarrow$  endósporo  $\rightarrow$  esférula, em uma reprodução exponencial. No caso das esférulas alcançarem o solo, sofrerão reversão para a apresentação filamentosa, dando continuidade ao ciclo biológico. O mecanismo de liberação dos endósporos das esférulas ainda não foi bem estabelecido, não obstante o fato que níveis elevados de quitinase e glucanase são detectáveis, em cultura, no momento em que os endósporos são liberados (RESNICK et al, 1987). Além disso, à medida que a concentração de glucanase e quitinase é reduzida, eleva-se a de proteases o que pode influenciar a evolução morfológica do agente fúngico. Esse fenômeno não se encontra adequadamente demonstrado embora pesquisadores como Cole e colaboradores (1989) tenham proposto que a protease desempenha algum papel na morfogênese do microrganismo. Ressalte-se que as paredes do endósporo, a exemplo do artoconídeo e do micélio, apresentam, entre outros componentes, glicanos e polímeros de manose, 3-O-metilmanose e galactose, embora em quantidade diversa (COLE et al, 1988; WHEAT et al, 1977). Isso posto, o hospedeiro infectado é exposto, a qualquer tempo, a esférulas maduras, imaturas e a endósporos recém liberados que diferem quantitativamente, quando não qualitativamente, quanto à composição da sua parede celular e membrana citoplasmática (COX; MAGEE, 2004).

Um outro tema sobre a biologia deste gênero fúngico diz respeito aos aspectos genéticos. Demonstrou-se ser o artoconídeo uma célula haplóide com dois núcleos e que o *C. immitis* possui quatro cromossomos, com genoma estimado em 29 Mpb (PAN; COLE, 1992). De mais a mais, foi por meio de estudos genéticos, da averiguação de regiões marcadoras - dois *loci*, GAC2 e 621 - que se conseguiu estabelecer a diferenciação molecular entre as duas espécies do gênero e descrevê-las como alopátricas, é dizer, de ocorrência em áreas biogeográficas distintas (FISCHER et al, 2001).

Os representantes deste grupo fúngico se caracterizam por serem agentes geofílicos, patogênicos e dimórficos térmicos. A bem da verdade, é por meio deste fungo que surge o conceito de “dimorfismo fúngico” (COSTA, 1995; apud SIDRIM; ROCHA, 2004), utilizado para designar os representantes desse grupo que expressam diferenças morfológicas entre suas formas saprofíticas e parasitárias (Figura 3).

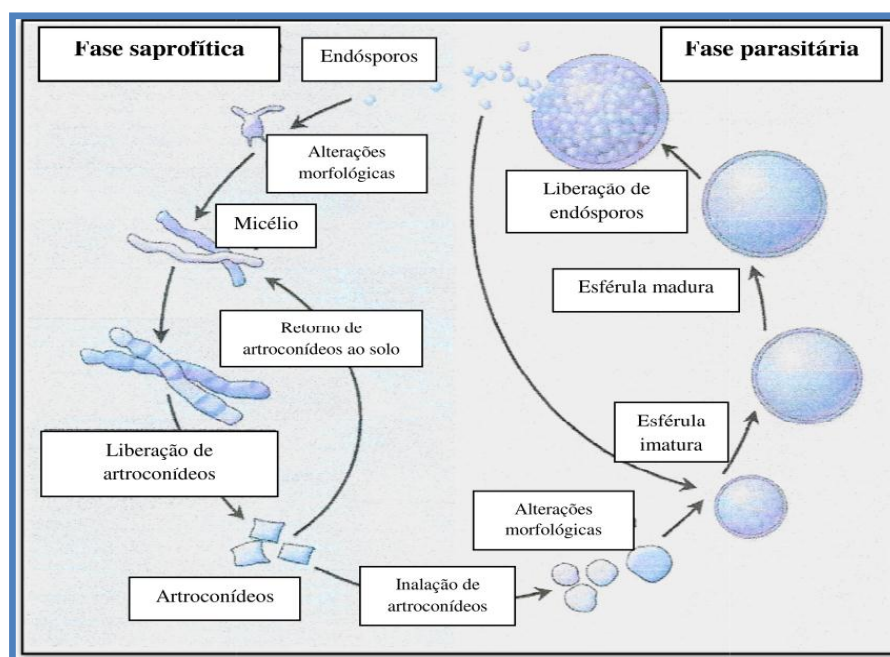


Figura 3 – Forma saprofítica e parasitária *Coccidioides immitis/posadasii* (Fonte: DiCaudo, 2006).

Atribui-se a esta característica não reconhecida entre os microrganismos até então, é dizer, sua capacidade de apresentar-se em formas diferenciadas conforme a temperatura ambiente a qual estejam expostos, o equívoco cometido pelos pesquisadores pioneiros, uma vez que, eram visualizados nos líquidos e tecidos parasitados apenas a apresentação leveduriforme, confundível com a morfologia de um protozoário – cujos estudos eram bastante comuns na época – e, desta forma, não a relacionavam com a forma filamentosa que se apresentava nos meios de cultura, acreditando tratar-se de mera contaminação (SIDRIM; ROCHA, 2004). A compreensão dos fatores que influenciam a conversão da fase saprofítica em esférula se tornou possível com a utilização de meios de cultura adequados. Através de tais estudos, verificou-se que fatores como a elevação da temperatura (estabilizada entre 34° e 41° C), aumento na concentração de CO<sub>2</sub> (10 a 20%) e adição de Tamol N induzem a formação das esférulas em um intervalo de tempo de 72 a 96 h, de forma semelhante *in vivo* e *in vitro* (DRUTZ; HUPPERT, 1983; CONVERSE, 1956).

O caráter geofílico do microrganismo é evidenciado pela sua localização na profundidade do solo (entre 10 e 28 cm da superfície), com a necessidade de existir revolvimento do local ou grandes ventanias a fim de que o agente possa acessar camadas mais externas e, pela veiculação aérea, alcançar seu hospedeiro (PAIXÃO et al, 2004). Dessa forma, é isolado em regiões de clima semiárido, com reduzidos índices pluviométricos,



elevadas temperaturas, baixas altitudes, vegetação xerófila, solos alcalinos e salinos. Assim, a incidência da coccidioidomicose pode depender de precipitações sazonais intercaladas, da severidade de tempestades de vento e poeira, do influxo contínuo para a região de hospedeiros susceptíveis, além da formação de aerossóis promovidos por construções, incêndios e terremotos locais. É encontrado em regiões quentes e secas com inverno relativamente ermo. Estudos mais recentes têm evidenciado uma distribuição mais larga do *habitat* (SABOULLE; McKELLAR; SUSSLAND, 2007). Registra-se o isolamento em áreas desprovidas da macroflora considerada, em um primeiro momento, como indicadora biológica da presença do fungo, a exemplo do arbusto *Larrea tridentata* e de cactáceas do gênero *Opuntia* (LACY; SWATEK, 1974), embora a característica presença de areia fina e solo sedimentado seja comum em todas as regiões onde foram isolados os fungos (KOLIVRAS et al, 2001). Comungando da linha de utilização de indicadores biológicos para indicar a presença do *Coccidioides* spp, Eulálio (2001), detecta o isolamento do fungo em tatus (*Dasypus novemcinctus*), no Estado do Piauí, sugerindo estudos que possam ratificá-los como sentinelas na indicação de regiões de risco.

As características geofísicas das áreas de isolamento têm suscitado pesquisas, com autores distintos, com o escopo de explicar suas especificidades. O desenvolvimento em camadas mais profundas do solo parece estar relacionado à proteção das temperaturas elevadas além da reduzida umidade da superfície (LACY; SWATEK, 1974). A interferência dos índices pluviométricos dos locais aparenta dever-se ao fato que em períodos de elevada precipitação ocorre o crescimento de vários microrganismos competidores do *Coccidioides* sp, ao passo que, em períodos de estiagem, os fungos desse gênero resistem à dessecação e elevada concentração de sais resultantes da evaporação no solo. De fato, seu desenvolvimento em solos de microbiota rica pode encontrar dificuldades, uma vez que, microrganismos como *Bacillus subtilis* e *Penicillium janthinellum* tendem a reduzir a proliferação do fungo. Isso posto, a tolerância dos representantes do gênero *Coccidioides* a elevadas temperaturas e concentrações salinas tende a inibir a flora competitiva. Ressalte-se, também, tratarem-se, esses fungos, de um dos poucos microrganismos que toleram os sais de boro (KOLIVRAS et al, 2001).

Em consonância com as observações elencadas, aventa-se, ainda, a possibilidade de uma distribuição bimodal dos casos de coccidioidomicose fundamentada na variação sazonal, com elevada incidência nos meses mais secos e com maior observação de tempestades de poeira. Tais condições favoreceriam a dispersão dos artroconídios. Estudos como esses podem ser relevantes no desenvolvimento de políticas públicas preventivas nos meses que antecedem

os períodos de reconhecida maior probabilidade de diagnóstico de casos clínicos (COMRIE, 2005).

Destacam-se, também, os resultados com o isolamento do *Coccidioides* spp em material do solo de regiões endêmicas. Greene et al (2000), em estudo envolvendo a análise de 720 amostras do solo e identificação - via biologia molecular - de 2400 isolados, preconizam a utilização de modelo animal, com inoculação da amostra do solo em hospedeiro susceptível, como o método que melhor se adequa à avaliação de amostras dessa natureza. A justificativa de tal recomendação dar-se pela demonstração de estrutura, *in vivo*, específica do fungo, é dizer, a esférula. Ressalte-se, ainda, o trabalho de Cordeiro e colaboradores (2006a), em análise envolvendo solos do nordeste brasileiro, demonstrou a versatilidade de crescimento fisiológico do fungo em condições físico-químicas variáveis a exemplo do pH e de escasso substrato como fontes de carbono e nitrogênio.

Conforme exposto, este gênero fúngico se caracteriza, ainda, como um dos patógenos mais virulentos e infectantes entre os estudados na Micologia Médica, estando inserido no rol dos agentes biológicos do *Anti-terrorist and Effective Death Penalty Act*, que regulamenta o transporte de materiais infecciosos entre países. Tal característica promove um relevante risco ocupacional em técnicos de laboratório, especialmente em regiões onde a doença não é endêmica e as práticas de biossegurança nível 3 - requeridas para a manipulação desse microrganismo - não são adotadas rotineiramente (CHATURVEDI et al, 2000), além de arqueólogos ou cavadores de poço em regiões endêmicas (DE HOOG et al, 2000).

Dessa forma, como as culturas de *Coccidioides* spp são altamente infectantes devem ser manipuladas por profissionais experientes e com equipamentos apropriados de biossegurança. Frente a tais características de virulência, sua utilização como arma biológica já foi considerada por vários autores (WARNOCK, 2007; DERESINSKIOK, 2003; DIXON, 2001). Entretanto, não se deve perder de vista que estudos têm demonstrado a existência de cepas diferentes do *Coccidioides*, com patogenicidade diversa, isoladas em áreas geograficamente distintas (PAPPAGIANIS, 1999).

#### 1.1.4 Patogenia e aspectos imunológicos

Diversos autores têm demonstrado a interferência de distintos fatores que contribuem com o processo patogênico promovido pelos agentes do gênero *Coccidioides*. Embora a coccidioidomicose pareça ser a mais infecciosa das micoses, em animais, sua morbidade não se apresenta elevada. De outro modo, sua letalidade dependerá da espécie animal afetada, uma vez que, em bovinos e ovinos poderá evoluir de maneira localizada, não-progressiva, ao passo

que, em cães e gatos sintomáticos, o *exitus letalis* se aproxima de 100% dos casos descritos (GRAUPMANN-KUZMA et al, 2008; PAIXÃO et al, 2004).

Conforme já exposto, uma vez alcançados os alvéolos pulmonares, os artroconídios, por meio de diversas alterações metabólicas, assumem a forma de esférulas que contêm inúmeros endósporos. Esses últimos, quando liberados da esférula madura, atuam como nova unidade infectante (CHATUVERDI et al, 2000). Dessa maneira, o hospedeiro alberga distintas apresentações fúngicas (v.g. esférulas repletas de endósporos, esférulas com paredes rompidas, endósporos livres). Curiosamente, apesar da diversidade de perfil genético demonstrado pelas duas espécies do gênero (FISHER et al, 2002a), não foram descritas diferenças entre os mecanismos de patogenicidade dos dois fungos (HUNG et al, 2005).

Inicialmente, devem ser considerados os diversos fatores de virulência, descritos pelos autores, deste gênero fúngico. Destaca-se a atuação de enzimas como a urease (promotora da alcalinização do meio e dano tecidual) (MIRBORD-DONOVAN et al, 2006); metaloproteinase (evita o reconhecimento imunológico de proteína imunodominante da parede celular fúngica além de contribuir na imunomodulação de sua virulência), arginase I (acúmulo de uréia com conseqüente alcalinização do meio) (HUNG et al, 2005) além da atuação de proteases (relacionadas com a lise de colágeno além da clivagem de imunoglobulinas como IgG e IgA secretória do hospedeiro) (YUAN; COLE, 1987). Considera-se, ainda, o papel de adesinas (ligação da esférula a proteínas da matriz extracelular do hospedeiro) (HUNG et al, 2002), da melanina (redução da sensibilidade do fungo a mecanismos de defesa do hospedeiro e a drogas antifúngicas, estabilização de radicais livres de oxigênio além de modulação da resposta inflamatória) (LIU; NIZET, 2009; TABORDA et al, 2008) e de um antígeno rico em prolina (PRA) (participação na morfogênese da esférula) (JOHANNESSON et al, 2004) como relevantes na patogenicidade do microrganismo, além de certos compostos de atuação incerta na promoção da coccidioidomicose (v.g. compostos semelhantes a melanina) (NOSANCHUK et al, 2006).

Além dos fatores citados, é possível correlacionar a atuação de uma protease, produzida pelo fungo, clivadora de elastina e envolvida na disseminação do patógeno do sítio alveolar para a corrente sanguínea e, a partir de então, para praticamente qualquer órgão do hospedeiro. Esta enzima facilita a ruptura da esférula, a invasão tissular e a disseminação dos endósporos, podendo promover a destruição tecidual inicial, mais tarde amplificada pela inflamação granulomatosa (RESNICK et al, 1987).

Frente a tais fatores, os leucócitos polimorfonucleares respondem pelo afluxo pioneiro de células do hospedeiro junto ao *Coccidioides* spp, mediado por fatores quimiotáticos

liberados pelo fungo. Não obstante, este encontro promove a inibição de menos de 20% dos artroconídios fagocitados. De fato, alguns estudos sugerem que a fagocitose estimula a conversão dos artroconídios em esférulas maduras. A liberação dos endósporos por essas últimas também estimula o fluxo de polimorfonucleares para o local, mas este encontro não é mais efetivo que o observado entre leucócitos e artroconídios. Ressalte-se que, possivelmente, as esférulas conseguem evadir-se da fagocitose por que simplesmente são muito grandes para serem digeridas por neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (HUNG et al, 2007). Acrescente-se que esta baixa efetividade parece ocorrer, ainda, por um mecanismo de escape comum a patógenos intracelulares: a inibição da fusão lisossomo-fagossomo. Soma-se a isso, a formação de imunocomplexos circulantes, a exemplo da ligação com o fator C1q do sistema complemento, com provável participação na supressão da proliferação linfocitária (COX; MAGEE, 2004). Dessa forma, em um momento inicial, a infecção por *C. immitis* ativa polimorfonucleares, macrófagos, fatores do complemento e quimiotáticos (COX; MAGEE, 2004). Em instante posterior, a formação da esférula, com o contínuo processo inflamatório, promove o surgimento de um persistente infiltrado celular mononuclear que pode irromper em granulomas. Dessa forma, os partícipes da reação inflamatória, incluso os polimorfonucleares, isoladamente não alcançam êxito em eliminar as esférulas maduras (CHILLER et al, 2003).

Não obstante, não se deve perder de vista a resposta de natureza imunológica, do hospedeiro, gerada pela infecção do *Coccidioides* sp. Durante o processo de fagocitose do microorganismo por macrófagos, que apresentam seus antígenos para células linfocitárias, percebe-se uma sensibilização do grupo dos linfócitos T (resposta Th1 - ativação da imunidade celular) (HUNG et al, 2000), bem como de linfócitos B que estimulam, dentre outros, a produção de IgM (imunoglobulina M), IgG (imunoglobulina G) e Ig E (imunoglobulina E), é dizer, ativam a imunidade humoral (COX; MAGEE, 2004). Destaca-se, também, o papel fundamental que as células dendríticas, também apresentadoras de antígeno, parecem exercer para uma efetiva inativação do fungo por meio de liberação de diversas citocinas envolvidas no processo inflamatório, a exemplo de: fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina (IL) - IL-1, IL-6 e IL-8 (RICHARDS et al, 2002). De fato, essas últimas células parecem estimular a resposta Th1 em pacientes com quadro disseminado de coccidioidomicose além de serem de possível utilização como imunoterápicos (RICHARDS et al, 2002).

É necessário salientar que a infecção por *Coccidioides* sp se caracteriza por uma interação tanto extra quanto intracelular com o hospedeiro. Evidências de natureza experimental e clínica têm demonstrado que a imunidade promovida por células T é essencial na defesa contra a coccidioidomicose (HUNG et al, 2007). Dois grupos, funcionalmente distintos, de células T CD4+ foram identificados e se distinguem pela produção diferenciada de citocinas (MOSMANN; COFFMAN, 1989). Os linfócitos T helper 1 (Th1) são produtores de interleucina (IL) 2, IL 12, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e interferon (IFN)- $\gamma$ , ao passo que, os linfócitos T helper 2 (Th2) secretam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Dessas últimas, foi demonstrado, em modelo murino, o papel da IL-4 como redutora da resposta imune do hospedeiro (HUNG et al, 2007). Neste processo, destaca-se a atuação de fatores do hospedeiro (v. g. citocinas e quimiocinas) que guiam a diferenciação dos linfócitos em Th1 e Th2. De fato, muitos receptores e sinais de transdução foram caracterizados e associados a este decurso (HATTON; WEAVER, 2004). Deste modo, é oportuno lembrar que a diferenciação em um grupo Th1 ou Th2 da resposta linfocitária se relaciona com a maior resistência ou susceptibilidade do hospedeiro ao *Coccidioides*, respectivamente (CHILLER et al, 2003). É possível, ainda, a determinação *in vitro* da resposta imunogênica do hospedeiro por meio da mensuração de citocinas, como o interferon- $\gamma$ , quando do contato entre o soro do contactante com antígenos do microrganismo (de forma análoga a realizada em portadores de tuberculose) (AMPEL, HECTOR, 2010).

Pesquisas em modelos com murino têm demonstrado que a resposta imune, via células Th1, é essencial como defesa contra a infecção por *Coccidioides* (COX, MAGEE, 1998). A título de exemplo, observa-se que, na resposta mediada por macrófagos, ocorre um aumento na taxa de fusão entre fagossomo e lisossomo quando aquelas células são expostas a TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  liberados pelas células Th1 (BEAMAN, 1991). Acrescenta-se a isso o fato que estudos clínicos comprovam que pacientes que se recuperam da infecção por estes fungos, sem tratamento antifúngico, desenvolvem títulos baixos de anticorpos contra *Coccidioides* (PAPPAGIANIS; ZIMMER, 1990), ao passo que, a maioria dos pacientes que não se recuperam espontaneamente desenvolvem quadros infecciosos, tanto em sítios pulmonares quanto extra-pulmonares, com elevados títulos de anticorpos patógeno-específico. Estes dados sugerem que o hospedeiro susceptível, que desenvolve doença disseminada, elabora uma resposta precoce e sustentada na via Th2 (liberadora de citocinas que estimulam os linfócitos B a produzirem elevados títulos de anticorpos – pouco efetivos frente à resposta Th1) (PAPPAGIANIS; ZIMMER, 1990).

Ressalte-se, ainda, o potencial da parede esferular de estimular elevados níveis de reatividade tanto da imunidade celular como da imunidade humoral – reação mista (HUNG et al, 2000). Estudos sugerem a participação de antígenos da parede que promovem tais estímulos, a exemplo do PRA (relacionado com a morfogênese da esférula) (JOHANNESSON et al, 2004). De fato, uma glicoproteína da parede celular do fungo, dita SOWgp (*spherule outer wall glycoprotein*) parece estimular as duas vias de reação imunológica. Além do exposto, a SOWgp estimula intensa proliferação de células T CD4+ *in vitro*, sugerindo que esse antígeno imunodominante pode direcionar as células Th2, em especial, a secretarem citocinas que estimulam os linfócitos B a produzirem anticorpos, de reduzida eficácia na resposta do hospedeiro a este patógeno fúngico. Demonstra-se, inclusive, que elevados níveis de anticorpos anti-SOWgp se correlacionam com a severidade da doença (HUNG et al, 2007).

#### 1.1.5 Aspectos clínicos

A maior parte das informações acerca dos aspectos clínicos da coccidioidomicose possui como fonte a descrição de casos nos Estados Unidos da América, região de elevada incidência da doença (DICAUDO, 2006). No Brasil, o diagnóstico e descrição de casos ainda esbarram na dificuldade de considerá-la no diagnóstico diferencial de quadros infecciosos (COSTA et al, 2001). De fato, tendo em mente a “mimificação” que o quadro clínico da doença apresenta com outras infecções de relevante impacto epidemiológico (*e. g.*, tuberculose), o número de casos descritos contrasta com a extensa área endêmica propícia ao desenvolvimento do agente fúngico, além de poder apresentar-se como assintomática ou com variadas manifestações clínicas (BAVA et al, 1999; POLESKY et al, 1999). Embora os agentes etiológicos da doença sejam geneticamente distintos, diferenças nas características clínicas não foram observadas até o momento (BIALEK et al., 2005).

Após a inalação dos artroconídios, o período de incubação - intervalo de tempo que decorre entre a exposição ao agente infeccioso e o surgimento dos sinais e sintomas da doença - varia de 7 a 21 dias (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003; WANKE, 1994). Conforme Galgiani (1993), em torno de 65% dos indivíduos expostos aos artroconídios infectantes não desenvolvem sinais ou sintomas da doença, com detecção restrita aos inquéritos soropidemiológicos ou pelas conversões intradérmicas, pós-exposição antigênica. Cairns et al (2000) descrevem que a exposição à elevada quantidade de artroconídios, associa-se ao maior risco de desenvolvimento de quadros sintomáticos. Nesse sentido, diversos

autores demonstraram que a frequência de indivíduos com quadros da doença pode alcançar níveis de 90% após terremotos, construções ou escavações arqueológicas - quando o revolver do solo expõe vasta concentração de artroconídios ao ambiente (SCHNEIDER et al, 1997; CRUM et al, 2004b).

Quando sintomática, é doença crônica, caquetizante, com progressiva anorexia, comprometimento pulmonar e disseminação para outros órgãos. O exame físico inicial é inespecífico simulando quadro viral respiratório ou tuberculose. Eventual cefaléia presente nesta fase não indica, com precisão, disseminação meníngea. Não obstante, presentes outros fatores corroboradores, indica-se a punção lombar para pesquisa de seu agente, uma vez que a disseminação do patógeno, embora incomum, costuma ocorrer no início da infecção, com prognóstico reservado que pode ser melhorado na ocorrência de intervenção terapêutica precoce (NEGRONI, 1994). Seu espectro clínico varia de lesões frustras até lesões graves, muitas vezes letais. Conforme preconiza Lacaz e colaboradores (2002), a depender da resposta imunológica do hospedeiro, é passível de apresentar-se na forma aguda, subaguda ou crônica. Além dessa última classificação, os autores levam em conta critérios anátomo-clínicos que podem ser distribuídos do seguinte modo:

- coccidioidomicose primária  
Forma mais frequente, geralmente assintomática, se sintomática acomete comumente os pulmões ou manifestações cutâneas, sem eritema nodoso;
- coccidioidomicose primária com eritema nodoso;
- coccidioidomicose progressiva ou granuloma coccidióidico propriamente dito:  
Resultante da progressão do foco primário, trata-se de reinfecção endógena com prognóstico sombrio.

Possível, ainda, a classificação por localização anatômica:

- formas tegumentares primitivas: forma nodular e dérmica, forma gomosa e forma tumoral;
- formas tegumentares secundárias: forma escrofulodérmica e forma em abscesso;
- formas viscerais e em outros órgãos: pulmões, sistema nervoso, órgãos intrabdominais;
- formas generalizadas.

Tendo em mente essa última classificação, é possível descrever o acometimento dos vários órgãos do hospedeiro, da maneira que se segue (LACAZ et al, 2002).

(1) Lesões cutâneas e mucosas

Observadas em 10 a 50% dos pacientes, são classificadas como infecção primária ou secundária - a primeira apresentando-se como *locus* inicial da doença. São manifestações raras, comumente decorrentes de inoculação hipodérmica e acidental do agente por meio de cactos, em ambiente de manipulação laboratorial ou na realização de necropsias (COX; MAGEE, 2004; KOHN et al, 1992) e ensejou a descrição do primeiro caso da doença, na Argentina. A inoculação hipodérmica é passível de promover lesões semelhantes a nocardiose e esporotricose (SAUBOLLE et al, 2007).

O segundo tipo, forma secundária, ocorre quando derivada de infecção em sítio diverso. Comumente se apresenta como formações nodulares (pápulas, pústulas, placas), de tamanho variado, em diversos locais do tegumento do hospedeiro, mas principalmente na cabeça (região nasolabial), que fluidificam, ulceram e se associam com linfadenopatia regional (COX; MAGEE, 2004). Podem alcançar planos mais profundos, a exemplo do tecido subcutâneo, e manifestar-se como eritema multiforme, dermatite granulomatosa intersticial, síndrome de Sweet, abscessos, gomas ou tumores amolecidos à palpação. A forma escrofulodérmica se caracteriza pelo infarto dos gânglios linfáticos regionais, corriqueiramente os cervicais, com periadenite e fístulas cutâneas. A apresentação inicial como eritema nodoso ou multiforme vem sendo descrita (RANCE; ELSTON, 2002) embora não se encontre a presença de células fúngicas nessas últimas lesões, uma vez que, trata-se de reações de hipersensibilidade a componentes fúngicos (COX; MAGEE, 2004).

(2) Lesões torácicas

A forma sintomática da coccidioidomicose responde por 40% das infecções e, como contumaz porta de entrada do microrganismo, é nas vias aéreas que costumam surgir os principais sinais e sintomas de doença aguda: febre, tosse, hemoptise, expectoração, dor torácica, pneumonias francas (apresentação mais frequente), cavidades pulmonares, nódulos com possibilidade de ruptura para o espaço pleural e com quadro radiológico idêntico a



tuberculose pulmonar, com a possibilidade de evoluir para a cura espontânea (VALDIVIA et al, 2006; COX; MAGEE, 2004; WHEAT; GOLDMAN; SAROSI, 2002). É possível, ainda, a evolução para quadros da Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA), doença miliar e sepse (THOMPSON, 2011). A doença pulmonar por esse agente fúngico pode ser indistinguível, clinicamente, da doença bacteriana ou promovida por outros agentes infecciosos se não houver testes laboratoriais específicos, a exemplo da cultura fúngica e de testes sorológicos. Em tais pacientes, sintomas como a fadiga podem perdurar de semanas a meses (GALGIANI et al, 2005).

Conforme Merchant et al. (2007), observa-se a ocorrência de derrame pleural em até 15% dos quadros pulmonares, com maior intensidade de sintomas como pleurisia, tosse e dispnéia, mais comum acometimento do pulmão esquerdo além do estudo do líquido pleural revelar predomínio linfocitário e a sugestiva presença de eosinófilos nos quadros de coccidioidomicose, em um contexto epidemiológico compatível.

Em torno de 20% dos pacientes pulmonares sintomáticos, é possível a observação de reações exantemáticas, eritema nodoso ou eritema polimorfo, mais comuns no sexo feminino e resultantes de hipersensibilidade do tipo tardio (GALGIANI, 1993). De fato, a apresentação de *rash* cutâneo parece ser mais comum em quadros de pneumonia comunitária promovidos pelo agente fúngico do que por outros agentes infecciosos (KIM et al, 2009). São descritos, ainda, quadros residuais da doença com formação de coccidioma sólido, bronquiectasia ou fibrose. Cerca de 5 a 10% dos pacientes mantém um nódulo solitário, comumente assintomático (BRAVO, 1996). A depender da resistência pessoal do hospedeiro, pode atingir, por via linfática ou hematogênica, sítios distantes tais como: baço, fígado, ossos, articulações, pele, encéfalo e meninge (LOW et al, 1996). Aparentemente, apenas o trato gastrointestinal é poupado pelo fungo.

Na forma crônica, que ocorre em 5% dos pacientes, a evolução é lenta e cursa clinicamente com quadros de perda de peso, suores noturnos, tosse crônica e hemoptise (CRUM et al, 2004b). Destes, cerca de 5% evoluem para forma residual com a formação de nódulos, múltiplos ou solitários, denominados de coccidioidoma. O quadro descrito em tudo se assemelha, clinicamente, a tuberculose pulmonar crônica, chegando, não raramente, a ser tratada como tal (MORAES et al, 1998). Lesões endotraqueais e endobronquiais (POLESKY et al, 1999) são menos frequentes, mas registradas na literatura.

Descreve-se, ainda, a possibilidade de envolvimento pericárdico decorrente da contiguidade de lesões pleuropulmonares ou por disseminação linfohematogênica. As queixas clínicas não diferem do acometimento pulmonar, embora a possível presença de

cardiomegalia, ortopnéia, pulso paradoxal, atrito e tamponamento pericárdico sejam mais característicos e de prognóstico sombrio (ARSURA et al, 2005). Embora com relatos infrequentes nas revisões de literatura, Brillhante e colaboradores (2008) descreveram caso clínico de coccidioidomicose, com envolvimento pericárdico, em indivíduo proveniente do município de Ibiapina, no Estado do Ceará, Brasil.

### (3) Lesões no sistema nervoso

Passíveis de ocorrer como forma primitiva, simulando tumores cerebrais ou meningite, ou como lesões meningoencefálicas graves, na fase final de infecção, com focos metastáticos nas meninges, cérebro e medula espinhal, com presença de hifas no líquido céfalo-raquidiano (ZEPEDA et al, 1998). O quadro clínico pode variar de cefaléia até acentuados distúrbios de natureza sensorial (*e.g.*, perda de reflexos) e motora (*v. g.*, incoordenação e plegias), embora menos frequentes (BANUELOS et al, 1996).

### (4) Lesões ósseas e articulares

Frequentes e quase sempre secundárias a lesões pulmonares e cutâneas, as lesões ósteo-articulares acometem mais comumente as vértebras (em geral sem atingir os discos intervertebrais), costelas, metacarpo, cotovelos, coxas, metatarso e pés, embora possam alcançar qualquer superfície óssea, em especial em locais de inserção ligamentar ou tendões. (CHILLER et al, 2003). Apresenta-se, correntemente, com quadros de dor crônica, edema, eritema ou sinais de osteomielite. As lesões ósseas são líticas e osteopênicas com reação periosteal semelhante a observadas em neoplasias malignas ou osteomielite bacteriana. A biópsia óssea é recomendada para confirmar o diagnóstico, assim como o aspirado do fluido articular pode ser necessário para identificação das esférulas fúngicas. Debridaçãõ cirúrgica extensa, associada com terapia antifúngica, pode ser necessária (FRYKBERG et al, 2008). O sequestro ósseo é um achado incomum e geralmente tardio, com predileção pela região distal dos ossos longos e proeminências ósseas (AMPEL; WIEDEN; GALGIANI,1989). Cerca de um terço dos pacientes que desenvolvem eritema nodoso evoluem com lesões nos tornozelos e joelhos (COX; MAGEE, 2004). A avaliação radiológica - a exemplo da tomografia computadorizada, ressonância magnética e cintilografia - é fundamental no diagnóstico e acompanhamento desta forma da doença (TALJANOVIC; ADAM, 2011).

(5) Lesões em órgãos intrabdominais

Uma vez disseminada, a infecção pode alcançar vísceras abdominais, a exemplo do fígado, peritônio e baço, com massas tumorais (quase sempre como abscessos) de variada sede e ensejando a indicação de exploração por via laparotômica. Excepcionalmente atinge os intestinos (CHILLER et al, 2003).

(6) Lesões generalizadas

Acomete de 1 a 5% dos indivíduos infectados e comporta mau prognóstico pois pode acometer estruturas vitais a exemplo do miocárdio, tireóide, fígado, rins, glândulas suprarrenais, dentre outros, poupando somente o trato gastrointestinal e o endocárdio (CRUM et al, 2004a; GARCIA et al, 2000; PAPPAGIANIS; ZIMMER, 1990). Costuma ser um evento precoce, com taxa de mortalidade superior a 50% e associado com franca caquexia quando não diagnosticado e tratado em tempo hábil (COX; MAGEE, 2004). Mais comumente descrita em imunodeprimidos, dissemina-se por via hematogênica e/ou linfática (GALGIANI et al, 2005). A possibilidade de pneumopatia miliar, a comum evolução para insuficiência respiratória e a conseqüente necessidade de ventilação mecânica (VERAS et al, 2002; ARSURA; KILGORE, 2000), torna a tuberculose miliar um outro diagnóstico diferencial a considerar. Não obstante, a pele costuma ser o mais frequente sítio de disseminação, comumente por via hematogênica, ocorrendo dentro de semanas a meses da infecção primária, presente em cerca de 65% dos casos da doença disseminada e com processo inflamatório discreto (DICAUDO, 2006; COX; MAGEE, 2004). Pacientes fora das áreas de reconhecida endemicidade costumam ser diagnosticados, com maior frequência, na forma disseminada (CHILLER et al, 2003).

A disseminação para região meníngea ocorre em 30 a 50% dos casos e, em alguns pacientes, é o único local de foco extrapulmonar da doença (COX; MAGEE, 2004). Comumente se apresenta como uma meningite crônica granulomatosa que afeta as meninges basais (CHILLER et al, 2003OK). A meningite por coccidioidomicose é a forma de maior letalidade da doença disseminada comumente associada com sintomas como náuseas, vômitos, cefaléias e alteração do estado mental (FRYKBERG et al, 2008). Destaque-se, também, o uso de terapia antiretroviral em portadores do HIV, com melhora do prognóstico das formas disseminadas, uma vez que reconstitui a resposta imunológica celular do hospedeiro (AMPEL, 2005).

A exemplo de pacientes imunocomprometidos e de certos grupos raciais, as gestantes apresentam maior risco de desenvolverem a forma disseminada da coccidiodomicose (CAIRNS et al, 2000). Hooper et al. (2007) discutiram a ocorrência de doença disseminada em pacientes gestantes, sendo o risco até 40 a 100 vezes maior que a população em geral, gradativamente maior com o avançar da idade gestacional. De fato, esses autores chamam atenção da probabilidade de disseminação se elevar, ocorrendo em 23% no primeiro trimestre, 59% no segundo e 68% no terceiro trimestre da gravidez.

As alterações fisiológicas da gestação, de cunho imunológico (alterações da imunidade celular) e hormonal (ascendência dos níveis de estradiol e progesterona), parecem ser as responsáveis por tal susceptibilidade. Não raramente, o fungo alcança o sistema nervoso após o acometimento cutâneo e ósseo. A mortalidade materna se relaciona com o diagnóstico tardio e a postergação do início da terapia antifúngica. Historicamente, há uma sobrevivência de 65% das mães, embora esse número se reduza para 45% quando diagnosticada no terceiro trimestre. Por outro lado, a coccidiodomicose congênita/neonatal é rara devido a dificuldade de contaminação vertical (transplacentária), uma vez que, o elevado tamanho da esférula dificulta tal via de transmissão (SPINELLO et al, 2007), com poucos casos descritos na literatura (HOOPER et al., 2007).

#### 1.1.6 Diagnóstico laboratorial e radiológico

O adequado diagnóstico laboratorial e imaginológico é crucial para o manejo da coccidiodomicose e envolve várias etapas, inclusive com adequadas precauções de biossegurança, que devem ser rigorosamente executadas, sob pena de impossibilitar a precisa demonstração da presença do microrganismo além de evitar tratamentos empíricos que podem comprometer o prognóstico do hospedeiro.

##### (1) Microscopia óptica

A preparação, do tipo lâmina-lamínula, de esfregaços deve ser representativa do sítio do hospedeiro no qual se busca firmar o diagnóstico. Isso posto, é comumente realizada em secreções respiratórias (escarro, lavado brônquioalveolar), líquidos (céfalo-raquidiano, pleura, aspirados ósteo-articulares) e material de biópsia pulmonar ou cutânea (GALGIANI, 1993). A montagem do material clínico deve observar a utilização de agentes clarificantes (v.g. KOH 30%, K-tinta) com o escopo de melhor visualizar a presença das estruturas

fúngicas. Esfregaços e *imprints* podem utilizar, ainda, a prata metenamina (SIDRIM et al, 2004b). A coloração de Gram não costuma distinguir o *Coccidioides* spp e não deve ser utilizado como técnica inicial (SAUBOLLE et al, 2007).

O exame direto, a partir de material da cultura, permite demonstrar a presença de micélio hialino, septado, ramificado, com artroconídios em seu interior, de parede celular espessa. Tais conídios alternam-se com espaços vazios, sem citoplasma, ditas células disjuntoras. Os artroconídios assumem forma que varia de cilíndrica a barril, medindo 2,5 a 4 µm por 4,3 a 6 µm. São liberados por fragmentação do micélio e ruptura da parede celular nos espaços vazios. Em amostras provenientes de lesões pulmonares e cutâneas, a observação do fungo é relativamente fácil e característica pela presença da esférula repleta de endósporos e/ou em ruptura (Figura 5). Por sua vez, a avaliação microscópica do líquido cefaloraquidiano (LCR) raramente demonstra o microrganismo, ainda que presentes lesões meningoencefálicas (LACAZ et al, 2002).

## (2) Cultura

Em ágar-Sabouraud, à 25°C, em cultivo de 5 a 10 dias, a colônia se apresenta, inicialmente, úmida, glabrosa, membranosa e acizentada, tornando-se rapidamente cotonosa, branca e creme. Pode apresentar ampla variação quanto à textura e coloração. Certas amostras podem gerar pigmento marrom que se difunde no meio de cultura (LACAZ et al, 2002). O reverso demonstra coloração creme, passando a amarronzada ao longo dos dias. Não se observa, em ágar BHI a 37° C, a presença da fase leveduriforme (DE HOOG et al, 2000). Não é o método mais recomendado em uma rotina laboratorial de análises clínicas, uma vez que, requer nível de biossegurança 3 devido ao elevado risco de contaminação, com casos já descritos na literatura (WU et al, 2003). Convém ressaltar que o fungo pode crescer em meios típicos de isolamento bacteriano, a exemplo do ágar-sangue e ágar-chocolate (SAUBOLLE et al, 2007).

A utilização de meios de cultura para reversão da apresentação filamentosa para a leveduriforme necessita além da adequação de temperatura (típica para os fungos dimórficos), a incubação em microaerofilia, sob atmosfera de 20% de CO<sub>2</sub> e a 40°C (SIDRIM; ROCHA, 2004a). Uma forma eficiente para a reversão, utilizando meio líquido, foi descrito por Petkus et al (1985) a partir do meio sintético RPMI 1640 e o detergente N-tamol com adição de estreptomicina.

Curiosamente, a frequência de positividade nos meios de cultura, em pacientes portadores de pneumonia, varia entre os autores. Há relatos de índices de positividade entre 6-11% a 86-100% de isolamento em espécimes clínicos (WHEAT, 2009).



Figura 4 – Aspecto de uma esférula de *C. posadasii* em exame direto, por microscopia óptica, em escarro de paciente hospitalizado (Fonte: Brilhante et al, 2012)

### (3) Imunodiagnóstico

É crescente a utilização de testes imunológicos na coccidioidomicose a fim de prescindir da arriscada manipulação direta do fungo. Apóia-se, precipuamente, na detecção da resposta celular/humoral do hospedeiro. De mais a mais, em situações clínicas, certos pacientes apresentam tosse não-produtiva, lesões cutâneas podem não ser adequadas para biópsia e hemoculturas raramente são positivas. Isso posto, os testes sorológicos podem representar instrumentos de auxílio irrecusável no diagnóstico da infecção fúngica e são de uso recomendado em qualquer suspeita de coccidioidomicose (WHEAT, 2009; BLAIR; CURRIER, 2008). De fato, há uma busca constante de imunotestes com elevada especificidade, sensibilidade e celeridade (AMPEL, 2009).

A detecção de anticorpos se fundamenta no surgimento da imunoglobulina M (Ig M), na fase aguda da doença (entre o 8º dia e o 3º mês de infecção) e o aparecimento da imunoglobulina G (Ig G) a partir do 3º mês de evolução da doença, constituindo bons marcadores de acompanhamento de seu curso (SIDRIM; ROCHA, 2004). A titulação de IgG se faz necessária, uma vez que, títulos elevados se relacionam com a disseminação e gravidade da doença (PAPPAGIANIS, 2001a).

Galgiani, em 1993, relata que o antígeno circulante, na infecção aguda, é quase sempre transitório, manifestando-se de forma positiva em 73% dos casos de infecção crônica, pulmonar e em 56% dos casos com lesões disseminadas. Pappagiannis e Zimmer (1990), por sua vez, referem que, na forma disseminada da doença, anticorpos IgM podem ser detectados durante anos após a infecção primária. De fato, esse grupo de anticorpos consiste no alvo primário de várias técnicas de imunodiagnóstico, devido sua precocidade de aparecimento no hospedeiro (BLAIR, CURRIER, 2008). Um outro aspecto relevante sobre o tema é a maior taxa de positividade a testes sorológicos observada no hospedeiro imunocompetente, ao passo que, indica-se a combinação de mais de um teste sorológico em imunodeprimidos a fim de elevar a sensibilidade e especificidade do imunodiagnóstico (BLAIR et al. 2006).

Um dos testes sorológicos, inicialmente utilizados, foi a fixação do complemento. O antígeno responsivo é uma quitinase, clonada a partir da *Escherichia coli*, liberada durante a expulsão dos endósporos pelas esférulas maduras. Tais testes sorológicos possuem valor prognóstico, uma vez que, a redução dos títulos de anticorpos representa uma resposta satisfatória à terapia, ao passo que, a elevação dos títulos pode indicar a necessidade de uma intensificação ou modificação no esquema terapêutico instituído. A sorologia pode ser utilizada, ainda, com o escopo de diferenciar a doença localizada da disseminada, onde títulos de 1:16 a 1:32 ou mais estão associados à doença disseminada. Cabe ressaltar que os estímulos antigênicos contínuos podem promover a manutenção de baixos títulos de fixação de complemento após a recuperação clínica, persistindo a detecção em titulações em torno de 1:2 a 1:4. A pesquisa de anticorpos em amostras do soro do paciente se mostra positiva previamente a sua detecção no líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, líquido sinovial ou líquido peritonial. Há, também, a possibilidade de realização do teste em amostras de sangue do cordão umbilical, uma vez que, ocorre a passagem transplacentária de anticorpos do grupo das Ig G (PAPPAGIANIS, 2001a).

A imunodifusão dupla vem sendo indicada devido sua praticidade, reduzido custo e tempo de execução (SIDRIM; ROCHA, 2004). Vários testes, com utilização de imunodifusão, estão disponíveis (DE HOOG et al, 2000) e utilizam, por exemplo, os antígenos F, HL (termolábil) e HS (termoestável) (LACAZ et al, 2002). A técnica é capaz de detectar IgM e IgG mas requer período maior de incubação (superior a 4 dias) para confirmar resultados negativos (SAUBOLLE et al, 2007). Diversos antígenos, por pesquisadores diferentes, vem sendo descritos com resultados promissores frente a imunodifusão, a exemplo, no Ceará, de Brilhante et al (2012; 2008).

É descrita, ainda, a utilização da prova de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay*), que apresenta elevada sensibilidade mas possui como restrição o relevante número de reações cruzadas (SIDRIM; ROCHA, 2004). Somam-se a esta prova, a contraímunoeletroforese e a aglutinação em látex, com diferentes perfis de sensibilidade e especificidade (PAPPAGIANIS, 2001a). Ressalte-se que formas disseminadas da doença apresentam, tipicamente, altos títulos de anticorpos (DICAUDO, 2006).

Uma forma de evidenciar a resposta celular do hospedeiro ocorre por meio da intradermorreação. Em áreas endêmicas, indivíduos que se apresentam com testes negativos podem indicar que não foram infectados e que não se encontram imunes ao agente fúngico (AMPEL; HECTOR, 2010). O teste da coccidioidina se encontra entre os primeiros utilizados na coccidioidomicose. Esse antígeno é composto, predominantemente, de polissacarídeo com 3-4% de sua estrutura formada por aminoácidos e provém da fase micelial do *Coccidioides* spp. É estável à temperatura ambiente e resistente à temperatura de até 250 °C por 10 minutos. Possui leitura idêntica à da reação da tuberculina e os resultados deverão ser apreciados em conjunto com os dados de ordem clínica. Em 87% dos casos, a reação se torna aparente na primeira semana das manifestações clínicas e, em 99%, depois da segunda semana de infecção. Em pacientes caquéticos, com coccidioidomicose, a prova da coccidioidina é quase sempre negativa (estado de anergia) (LACAZ et al, 2002).

O emprego da coccidioidina apresenta como vantagens a não interferência nos testes sorológicos, a não sensibilização do hospedeiro além da possibilidade de utilização em inquéritos epidemiológicos em certas populações (GABRIEL et al, 1999). Sua desvantagem é a possibilidade de reações cruzadas com *Histoplasma capsulatum* além de permanecer positiva mesmo após recuperação clínica do hospedeiro (PADUA Y GABRIEL et al, 1999). Em reduzido número de casos, é possível observar reações de hipersensibilidade ao antígeno (CASTAÑÓN-OLIVARES et al, 2010). A demonstração de reação positiva ao teste costuma estar associada ao melhor prognóstico da infecção (AMPEL, 2003). É possível sua utilização, ainda, em hospedeiros animais, a exemplo do cão (CASTAÑÓN-OLIVARES et al, 2010).

Outro antígeno utilizado para intradermorreação é a esferulina. Possui semelhanças físicas, químicas e imunológicas à coccidioidina, embora com caráter mais termolábil. Uma vez que, é na forma de esférula que o fungo se apresenta no tecido do hospedeiro, esse antígeno teria, em tese, maior capacidade imunogênica. Não obstante, os testes da coccidioidina e da esferulina são reconhecidos ambos como relevantes entre os clínicos (AMPEL, HECTOR, 2010). Destaque-se que os testes cutâneos não interferem com



exames sorológicos, mas são de pouco valor diagnóstico, considerando que podem permanecer positivos após infecção primária em indivíduos curados ou resultar em anergia em imunossuprimidos (PAPPAGIANIS, 2001a). Mais recentemente, Johnson et al (2012) descreveram um novo antígeno derivado da esferulina, chamado *spherusol*. Esse estudo parece apontar para seu uso seguro com uma sensibilidade e especificidade estimada em 98% na detecção de reação de hipersensibilidade tardia.

Convém ratificar que, a exemplo de outros métodos complementares de diagnóstico, os testes sorológicos podem apresentar resultados falso positivo ou negativo ou que impõem a correlação clínica e com outros exames laboratoriais (PAPPAGIANIS, 2001a; PAPPAGIANNIS, ZIMMER, 1990). De fato, a presença de um teste sorológico negativo, precipuamente na fase inicial da doença, não afasta o diagnóstico da coccidioidomicose (WHEAT, 2009; SAUBOLLE et al, 2007). Recomenda-se a repetição dos testes imunodiagnósticos, em caso de resultados negativos, em 4 a 8 semanas (WHEAT, 2009). No Brasil, embora relevantes, esses testes não são, ainda, amplamente utilizados (BANDEIRA, 2008).

Não obstante, há que se destacar que trabalhos buscando a utilização de antígenos fúngicos, em geral, são comuns na literatura especializada, devido, precipuamente, a facilidades de manuseio e melhora na especificidade e sensibilidade diagnóstica, a exemplo dos trabalhos de Provost et al (2012), Wilson et al (2009) e Simon-Nobbe et al (2008).

Assim, a detecção de antígenos do gênero *Coccidioides* pode ser útil para o diagnóstico precoce e seguro do patógeno considerando que a antigenemia foi observada em 56–78% dos pacientes em estudos recentes (DURKIN et al, 2008). Estudos prévios demonstraram que, a despeito das diferenças genotípicas entre *Coccidioides* spp, é possível a obtenção de extratos antigênicos, para fins de vacinação ou realização de testes sorológicos, a partir de uma única cepa do fungo (PAPPAGIANIS, 2001b). De fato, Brilhante et al (2008) descreveram a potencial utilização de antígeno produzido a partir de cepa única de *Coccidioides posadasii* no diagnóstico sorológico da coccidioidomicose. Além disso, esses autores demonstraram o possível emprego de um antígeno *in-house* frente à ocorrência de resultado falso negativo na utilização de antígeno de largo uso comercial.

#### (4) Histopatologia

Após realização de biópsia, nos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (H.E.) são visualizadas as esférulas contendo, em seu interior, endósporos

uninucleados com 2 a 5 µm de diâmetro. Os endósporos liberados no tecido vão aumentando gradativamente e, finalmente, convertem-se em esférulas e iniciam um outro ciclo com a posterior formação de novos endósporos. No H.E., os endósporos e a parede celular das esférulas são eosinofílicas ou basofílicas (anfófilas). Observa-se tecido inflamatório constituído por granulomas com a presença de células gigantes de Langehans, plasmócitos e linfócitos (LACAZ et al, 2002). Eventualmente, observa-se a infiltração tecidual de eosinófilos - reação de Splendore-Höeppli (SABOULLE; McKELLAR; SUSSLAND, 2007) ou extensas áreas de necrose fibrocásea (MORAES et al, 1998).

Além do H.E., é possível a utilização de outras colorações como o PAS (*periodic acid-Schiff*) e, preferencialmente, o Gomori-Grocott. Calcoflúor fornece boa resolução por ligar-se à quitina e celulose da parede fúngica, embora derivados lipídicos possam ser corados inespecificamente. Embora mais sensível, o emprego da técnica de Grocott pode promover excesso de coloração dos componentes fúngicos mascarando estruturas internas, a exemplo dos endósporos no interior das esférulas ou de grânulos de glicogênio (SABOULLE; McKELLAR; SUSSLAND, 2007).

Nos tecidos, podem-se observar esférulas em diferentes estágios de maturação, algumas repletas de endósporos ou com as paredes rompidas. Dessa forma, pode suscitar diversas reações celulares a exemplo de formações piogênicas (promovidas pelos conídios), granulomatosas (induzidas pelas esférulas) ou mistas (SIDRIM; ROCHA, 2004).

#### (5) Diagnóstico molecular

A aplicação de tais técnicas no diagnóstico da coccidioidomicose foi iniciada por Pan e Cole em 1992 e se apresentam como alternativa a arriscada manipulação do agente além de se mostrarem úteis na presença de culturas mistas ou amostras clínicas contaminadas (BIALEK et al, 2005; JOHNSON et al, 2004). Tais técnicas avaliam gens de DNA ribossômico, agrupados em unidades ou *cluster*, que ocorrem como repetições alinhadas e distribuídas em um único cromossomo. As unidades são compostas pelos genes ribossômicos 18S, 28S, 5S e 5,8S além dos domínios ITS (*Internal Transcribed Spacers*) e são separadas pela região IGS (*Intergenic Spacer*). Essa última é composta pelos domínios NTS (*Non-transcribed Spacers*) e ETS (*Externally Transcribed Spacer*) (JOHNSON et al, 2004; GREENE et al, 2000).

No que concerne à identificação de *C. posadasii*, o diagnóstico a partir de culturas, biópsias de pele e/ou pulmão adota como alvo a sequência parcial de gens da molécula

“PRA”, a partir de protocolos de PCR – *Polymerase Chain Reaction* (BIALEK et al, 2004). Além disso, *real-time PCR* e *repetitive-sequence-based PCR* se apresentam como técnicas promissoras no diagnóstico molecular da coccidiodomicose (SAUBOLLE et al, 2007) com redução no tempo de processamento e resultado disponível (BINNICKER et al, 2007).

Também são utilizadas técnicas de hibridização de DNA com o emprego de sondas de DNA comercialmente disponíveis (DE HOOG et al, 2000), a exemplo da sonda quimiofluorescente *AccuProbe* (LINDLSEY et al, 2001). Não obstante a elevada sensibilidade e especificidade de tais técnicas, Gromadzki e Chaturvedi (2000) descrevem a possibilidade de resultados falsos negativos quando da utilização de biópsias preservadas em formol. Estudos da região ITS2 de *Coccidioides* spp. foram desenvolvidos por Binnicker et al. (2007), apresentando índices de elevada sensibilidade e especificidade quando aplicados a espécimes respiratórios de tecidos frescos ou parafinados. Uma outra estratégia, com o escopo de elevar a especificidade das técnicas de biologia molecular, consiste na associação do PCR com métodos imunoenzimáticos, a exemplo do descrito por Lindsley et al (2001).

Outra indicação das técnicas, mais recentemente, tem sido a análise de amostras de solo com o intuito de verificar a real presença do fungo e mensurar os consequentes riscos de contaminação em certas áreas geográficas, no nordeste dos Estados Unidos e do Brasil (LAUER et al, 2012; MACEDO et al, 2011).

Um fator limitante à aplicação das técnicas de diagnóstico molecular diz respeito a utilização de kits comerciais de extração de DNA de *Coccidioides* spp e sua restrição de análise à espécimes clínicos de sangue, soro e biópsia. Considerando ser a coccidiodomicose infecção com predominância do acometimento pulmonar e as dificuldades de natureza técnica na realização de biópsias no trato respiratório inferior, ocorre uma menor aplicabilidade de tais métodos no diagnóstico médico. Tentando suplantar tais dificuldades, Cordeiro et al (2007), utilizando amostra de escarro em paciente suspeito, demonstraram a possibilidade de utilização da PCR para firmar diagnóstico, com maior celeridade e especificidade que as técnicas microbiológicas clássicas, em material de comum análise em laboratórios clínicos.

Convém destacar a indeterminação, em casos de exames positivos pelas técnicas moleculares, se o achado evidencia a presença de microrganismos viáveis (relacionados à doença), detecção de colonização transitória do hospedeiro ou de ácidos nucleicos remanescentes de quadros anteriores (BINNICKER et al., 2007).

## (6) Provas fisiológicas

Apresenta intolerância ao benomyl (DE HOOG et al, 2000).

### (1) Exames hematológicos

O hemograma se apresenta com alterações inespecíficas. Observa-se, comumente, uma leucocitose neutrofílica associada com anemia. Há relato, ainda, de isolamento de *Coccidioides immitis* em hemocultura (LACAZ et al, 2002). Pode-se verificar, eventualmente, aumento da velocidade de hemossedimentação (VHS). A presença de eosinofilia eleva a possibilidade do diagnóstico da coccidioidomicose (SABOULLE; McKELLAR; SUSSLAND, 2007), principalmente na presença de nódulos pulmonares suspeitos (SIMONS; STRATTON; KIM, 2010).

### (2) Exame radiológico

A avaliação radiológica dos pulmões, ossos e articulações revela, com frequência, alterações semelhantes à tuberculose. É possível que a doença fúngica simule quadros neoplásicos metastáticos, sífilis, artrite infecciosa, sarcoma e cistos ósseos. Alguns achados do acometimento pulmonar revelam: espessamento hilar, infiltrados, nódulos, adenopatia do hilo/mediastino e processo pleural (LACAZ et al, 2002).

Pode apresentar, ainda, infiltrados inflamatórios múltiplos com distribuição lobar ou segmentar. A adenopatia mediastinal ou paramediastinal pode sugerir a possibilidade de disseminação (BRAVO, 1996). Outros achados incluem: lesões fibronodulares biapicais e cavidades múltiplas pulmonares (COX; MAGEE, 2004).

### (3) Exame líquórico

Com comprometimento meningoencefálico, pode-se verificar o líquido céfalo-raquidiano (LCR) turvo ou límpido, com ou sem aumento de sua pressão. As globulinas costumam estar aumentadas com elevação dos elementos celulares, predomínio dos polimorfonucleares (LACAZ et al, 2002) e redução dos níveis de glicose. A cultura do líquido espinhal é comumente negativa, o que torna relevante a utilização do

imunodiagnóstico (DAVIES; SAROSI, 1987), embora seja pouco frequente a presença de Ig M no líquido (PAPPAGIANIS; ZIMMER, 1990).

#### (10) Inoculação experimental

Realiza-se inoculação de material suspeito de contaminação com o fungo, em um animal, com posterior observação de lesões (LACAZ et al, 2002).

Não é recente a utilização de modelos experimentais de coccidioidomicose com inoculação de cepas de *Coccidioides immitis*. De fato, pesquisas como os de Negroni et al (1949) já faziam tentativas de desenvolver experimentos que pudessem melhor compreender os aspectos biológicos e imunogênicos da infecção por esse fungo. A partir dos trabalhos de Fisher (2002a) e sua distinção molecular entre as duas espécies do gênero *Coccidioides*, publica-se, de forma crescente, as descrições de modelos utilizando cepas de *Coccidioides posadasii* a exemplo de Cordeiro et al (2012) com inoculação em camundongos a partir de cepa do fungo isolada em morcego.

Na literatura, descreve-se a utilização de inúmeros animais, tais como: cães, gatos, galinhas, ratos e tartarugas por diversas vias, não sendo possível a reprodução da doença por via digestiva. Sabe-se, ainda, da refratariedade da infecção pelos animais de sangue frio além da variação da apresentação da doença, a depender da espécie utilizada. Por exemplo, os macacos apresentam infecção aguda, ao passo que, os *hamsters* mostram infecções crônicas. Hodiernamente, os modelos animais de maior utilização incluem roedores, a exemplo dos camundongos (CHILLER et al, 2003).

Diversas são as vias, locais de administração de drogas e formas de quantificar o inóculo fúngico para fins experimentais. Desde o início, os animais devem ser corretamente imobilizados para que a administração das injeções seja conduzida sem risco para o pesquisador ou animal. Considerando que qualquer fator externo pode alterar a homeostase, e ainda ser apontado como um fator estressante, é fundamental que se aguarde tempo suficiente para que o animal se adapte a manipulação e torne-se familiarizado com o pesquisador. A manipulação incorreta ou brusca pode implicar estresse e, conseqüentemente, desequilíbrio de funções orgânicas, o que determina a ocorrência de alterações fisiológicas (BRASIL, 2005).

A quantificação do inóculo fúngico pode ser feita por meio de contador hemacitométrico (CLEMONS et al, 1985), citômetro de fluxo (LI et al, 2001) ou ajustes em soluções salinas (FIERER et al, 2006) por técnicas diversas. Entre essas últimas, não foi publicado, até o momento, a utilização, por comparação, da escala nefelométrica de McFarland.

### 1.1.7 Diagnóstico diferencial

Em face da grande variedade de lesões clínicas promovidas pela coccidioidomicose, essa micose tem sido denominada de “o grande imitador” (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

Não se deve perder de vista as semelhanças de natureza epidemiológica, clínica, radiográfica e histopatológica observadas entre a coccidioidomicose e a tuberculose, incluindo a forma miliar. Dessa forma, o diagnóstico de tuberculose pulmonar não afasta a forma respiratória da coccidioidomicose e vice-versa (CASTAÑEDA-GODOY; LANIADO-LABORIN, 2002). De fato, a existência de subregistros da coccidioidomicose se relaciona, em diversas áreas de endemicidade, com a elevada frequência de casos de tuberculose pulmonar nessas regiões promovendo retardo no início do adequado esquema propedêutico/terapêutico (MUÑOZ et al, 2004). Somam-se a esses casos, os relatos de pacientes tratados inicialmente como portadores de pneumonia bacteriana comunitária, o que implica no uso improfícuo de antibióticos e o desnecessário gasto com recursos diagnósticos complementares (v. g., exames laboratoriais e radiológicos)(AMPEL, 2009).

Sob o prisma dos aspectos dermatológicos, as lesões eritematosas da coccidioidomicose devem ser diferenciadas do *rash* cutâneo observado em outras doenças exantemáticas (v. g., sarampo, rubéola e urticária) (KIM; PARKER, 2002). A diversidade de lesões tegumentares leva à necessidade de avaliação diagnóstica diferencial com outras dermatopatias de natureza infecciosa ou não, a exemplo de linfoma cutâneo de células T, dermatite de contato, carcinoma espinocelular, ceratose actínica, rosácea, sarcoidose, tuberculose, hanseníase (LIBOW et al, 1995), eritema nodoso, exantema agudo, eritema multiforme, síndrome de Sweet e dermatite granulomatosa intersticial (DICAUDO, 2006).

Concorrem no diagnóstico diferencial dos quadros osteomusculares, lesões associadas à tuberculose, actinomicose, blastomicose, criptococose, carcinoma metastático, além de osteomielites bacterianas (BRIED; GALGIANI, 1986).

Na forma disseminada da doença, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda o diagnóstico diferencial com a *leishmaniose visceral*, nas áreas endêmicas para ambas as enfermidades (BRASIL, 2008a).

Sigler et al (1998) acreditam haver uma relação do gênero *Uncinocarpus* (fungos queratinofílicos) com *Coccidioides immitis*, uma vez que, há semelhanças nas estruturas de

reprodução sexuada além de aspectos fenotípicos entre os gêneros, constatadas por meio da observação microscópica e por análises moleculares filogenéticas. Os cuidados a serem observados, nas condutas de biossegurança, geram dificuldades nos estudos taxonômicos/filogenéticos entre esses grupos de microrganismos.

Soma-se a isso o fato que o exame a microscopia óptica deve ser efetuado com toda cautela a fim de diferenciar o gênero *Coccidioides* do gênero *Geotrichum*, uma vez que, trata-se de microrganismos que formam artrósporos e podem gerar confusão em microscopistas menos experientes (LACAZ et al, 2002). Paixão et al (2004) alertam para possíveis falsos positivos, no exame direto, devido a semelhança entre as esférulas do *Coccidioides* spp e estágios jovens das formas parasitárias da adiaspiramicose e a rinosporidiose. Muñoz et al (2004) advertem que a análise microscópica tecidual pode promover confusões com espécimes de *Aspergillus* spp. Durante o cultivo do microrganismo, colônias imaturas podem assemelhar-se, macroscopicamente, a outros gêneros fúngicos, a exemplo de *Malbranchea*, *Arthroderma*, *Uncinocarpus*, *Geotrichum*, *Oidodendron*, *Auxarthron* (PIER, 2000).

Destaque-se que a análise histopatológica pode revelar endósporos livres que podem gerar potencial confusão com apresentações leveduriformes de *Histoplasma* spp., leveduras de *Cryptococcus* spp. ou *Candida* spp. Especial atenção deve ser observada na presença de esférulas contíguas ou adjacentes do *Coccidioides* spp no diagnóstico diferencial com formas iniciais de *Blastomyces* spp (SABOULLE; McKELLAR; SUSSLAND, 2007).

Convém ressaltar, ainda, o trabalho de Millar et al (2003) que não recomenda a análise isolada da região 18S do RNAr com as técnicas de biologia molecular a fim de evitar possíveis falso-positivos com um outro fungo saprófita do solo, promotor de infecções cutâneas e onicomioses no hospedeiro humano: *Chrysosporium keratinophilum*.

#### 1.1.8 Tratamento

No hospedeiro imunocompetente, a maior parte dos casos de coccidioidomicose cursa de forma auto-limitada sem necessidade de intervenção terapêutica. Nas formas brandas da doença, podem ser acompanhados ambulatorialmente (CHILLER et al., 2003).

Derivados azólicos surgidos a partir da década de 80 do século passado, a exemplo de cetoconazol, miconazol, itraconazol e fluconazol, podem ser utilizados, por via oral, com benefício terapêutico em casos brandos (CHILLER et al., 2003). O papel de derivados azólicos de uso mais recente, a exemplo do posiconazol, permanece em avaliação (PARISH;

BLAIR, 2008). Não obstante, o esquema de tratamento mais utilizado em infecções progressivas inclui a anfotericina B ou seu derivado lipídico como droga de escolha, além da indicação cirúrgica nas formas localizadas. Isso posto, a escolha do esquema terapêutico, melhor adaptado as necessidades do paciente, leva em consideração aspectos como manifestações clínicas e estado imunológico do hospedeiro (PARISH; BLAIR, 2008; SAUBOLLE et al, 2007). Relata-se, ainda, a utilização bem sucedida, em um modelo experimental com camundongos, do derivado triazólico DO 870 (LACAZ et al, 2002).

A anfotericina B promove seu efeito antifúngico por meio da ligação ao ergosterol presente na membrana plasmática fúngica com conseqüente formação de poros na estrutura, aumento da permeabilidade e extravasamento de diversos compostos de baixo peso molecular (MANDELL; PETRI, 2003). Os derivados azólicos, por sua vez, agem inibindo a enzima 14- $\alpha$ -demetilase, que faz parte do sistema do citocromo P450 e atua na biossíntese do ergosterol da membrana citoplasmática do fungo, gerando acúmulo de 14- $\alpha$ -metilesteróis. Esses últimos alteram a estrutura de fosfolipídios, prejudicando sistemas enzimáticos a exemplo das ATPases e a cadeia de transporte de elétrons (MANDELL; PETRI, 2003).

As indicações para instituição do tratamento medicamentoso incluem os quadros pneumônicos severos (comumente associados a febre, prostração e alterações laboratoriais), prolongamento da doença pulmonar por seis semanas, além dos estados de imunossupressão e disseminação da infecção (AMPEL; WIEDEN; GALGIANI, 1989). Em situações de nódulos pulmonares estáveis, costuma-se indicar somente o acompanhamento clínico sem necessariamente a instituição medicamentosa (GALGIANI et al, 2005). O esquema farmacológico com utilização da anfotericina B é indicado, rotineiramente, nos casos de doença aguda e/ou rapidamente progressiva. Na evolução subaguda ou crônica do quadro clínico, os derivados azólicos são preferidos, excetuando-se o estado gestacional, uma vez que, não há estudos controlados suficientes que assegurem o uso sem risco no período gravídico sendo classificadas, tais drogas, como risco C do *Food and Drug Administration* (FDA) norte-americano (BRIGSS; FREEMAN; YAFFE, 2008). Isso posto, a anfotericina B é a droga de escolha no estado gestacional (risco B do FDA) (GLEICHER et al, 2008). Critérios de conclusão do tratamento incluem a resolução sintomatológica e funcional dos órgãos atingidos, bem como, a normalização das alterações laboratoriais (RUHNKE, 2004).

Convém ressaltar que a melhora clínica e radiológica pode indicar, sempre que possível, a substituição do esquema farmacológico com anfotericina B pelo tratamento com derivados azólicos alcançando um ano de tratamento (WHEAT; GOLDMAN; SAROSI, 2002). Em se



tratando de portadores de SIDA, indica-se tratamento de manutenção com fluconazol diário e anfotericina B semanal com o escopo de evitar recidivas (PAIXÃO et al, 2004).

No que concerne ao tratamento cirúrgico, destacam-se as complicações pulmonares que podem determinar a ressecção de cavidades localizadas. A ruptura de tais cavidades no espaço pleural podem resultar em piopneumotórax com consequente indicação de lobectomia (DELGADO et al, 1993).

Na situação específica de meningite coccidióidea, indica-se a infusão de anfotericina B diretamente no líquido cefalorraquidiano, juntamente com derivados azólicos de duração prolongada, além da manutenção indefinida do tratamento por via oral (GALGANI et al, 2000). Elevadas dosagens de voriconazol costumam resultar na resolução gradual de quase todos os sinais/sintomas de meningite além da normalização das alterações do líquido céfalorraquidiano e do edema cerebral. Tal tratamento deve ser mantido por um prazo superior a dois anos (CORTEZ; WALSH; BENNETT, 2003). Outras opções terapêuticas em tais situações incluem a utilização do fluconazol, embora sua atividade fungistática demande terapêutica prolongada (SABOUILLE; McKELLAR; SUSSLAND, 2007), mormente em pacientes imunocomprometidos (GALGANI et al., 2000) e a caspofungina em posologia superior ao tratamento convencional (HSUE et al, 2004).

A osteomielite coccidioidomicótica, por sua vez, é manifestação clínica de tratamento difícil, com elevado risco de recorrência. Dessa forma, indica-se, via de regra, a terapêutica combinada - clínica e cirúrgica (HOLLEY; MULDOON; TASKER, 2002).

Novas terapêuticas farmacológicas têm sido objeto de pesquisa, a exemplo da associação de esquemas já corriqueiramente utilizados associados com interferon- $\gamma$  (KUBERSKI; SERVI; RUBIN, 2004). Além dessas, resultados promissores têm sido apresentados com os antifúngicos voriconazol, caspofungina e posiconazol (AMPEL, 2009; PARK et al, 2006; DERESINSKI, 2001; LI et al, 2000). Como derivado azólico de 2ª geração, o voriconazol possui boa penetração na barreira hematoencefálica com consequente indicação na terapêutica da meningite coccidióidea (PROIA; TENORIO, 2004).

A caspofungina, por sua vez, como membro da classe das equinocandinas, apresenta-se como alternativa ao atuar diretamente na parede celular fúngica por meio da interrupção da síntese da  $\beta$ -(1,3)-D-glucano (LETSCHER-BRU; HERBRECHT, 2003), embora casos de resistência já se encontrem descritos (HSUE et al., 2004). A estratégia de associar a caspofungina com drogas de uso tradicional, a exemplo do fluconazol, parece elevar a eficácia terapêutica (PARK et al, 2006). Mais recentemente, González et al. (2007) demonstraram, em

modelo animal, que a associação de caspofungina com anfotericina B apresenta aumento da eficácia terapêutica - o que expande o potencial da terapia combinada na coccidioomicose.

Citam-se, ainda, estudos em andamento com a Nicomicina Z, um inibidor da quitina-sintetase, com resultados promissores em modelos murinos de coccidioomicose pulmonar (AMPEL, 2009).

### 1.1.9 Profilaxia

A profilaxia em visitantes de áreas com elevada endemicidade de coccidioomicose pode ser difícil. Não obstante, uma das estratégias de apoio a fim de evitar o contágio em tais grupos se fundamenta na informação. Indica-se a divulgação via *internet*, em jornais locais, em informativos direcionados aos serviços de assistência primária da localidade ou ainda na inclusão do tema em encontros científicos realizados na região. Tais ações podem conduzir ao diagnóstico precoce (prevenção secundária) e limitação da progressão da doença. Outras estratégias incluem a urbanização e utilização de técnicas agropastoris com o escopo de reduzir a prevalência do fungo nos solos (CAIRNS et al, 2000).

Considerando aspectos da biologia do fungo, a utilização de técnicas de agricultura com alteração do grau de salinidade e alcalinidade dos solos podem interferir na dinâmica de crescimento do microrganismo em certos ambientes (SABOULLE; McKELLAR; SUSSLAND, 2007).

A literatura registra diversas iniciativas no sentido de promover a imunoprofilaxia da coccidioomicose, incluindo análises do custo financeiro e viabilidade da implementação em programas de saúde pública (BARNATO et al, 2001). Vacinas contendo antígenos protéicos, provenientes de esférulas do *Coccidioides immitis*, já foram testados com produção de Ig M. (LACAZ et al, 2002). Estudos mais recentes têm procurado focar em proteínas específicas como fundamento para uma vacina recombinante (CHILLER et al, 2003).

É chamativo o fato que, entre as doenças infecciosas que apresentam como agentes etiológicos as bactérias, vírus e fungos; essas últimas são as únicas que não dispõem de vacinas para uso na Medicina humana. Esse cenário tende a ser modificado pela melhor compreensão dos aspectos imunológicos e da interação fungo-hospedeiro promovida pelas técnicas recentes de biologia molecular. De mais a mais, destaca-se a relevância do controle desses microrganismos frente ao crescente contingente de pacientes imunodeprimidos, a exemplo dos beneficiados por efetivos tratamentos quimioterápicos, dos usuários de

imunossupressores, portadores de doenças auto-imunes ou pós-transplante além dos diagnosticados com SIDA/AIDS (CASSONE, 2008).

A maioria dos estudos está centrada em vacinas para o gênero *Candida* sp. No entanto, um trabalho considerável tem sido estendido para o desenvolvimento de vacinas para a criptococose, coccidioidomicose, blastomicose, histoplasmose, paracoccidioidomicose e infecções causadas por *Pneumocystis* e, mais recentemente, a aspergilose. Apesar dos esforços despendidos, nenhuma vacina para uso em humanos foi, até o momento, aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para qualquer imunização ativa ou passiva (EDWARDS JR., 2012).

Um dos obstáculos prementes, para vacinação de imunodeprimidos, envolve o próprio estado de debilidade do hospedeiro frente à utilização de microrganismos e adjuvantes que podem agravar seu já comprometido *status* imunológico. Mesmo a imunização passiva com imunoglobulinas poderá necessitar de opsonização e fixação do complemento para promover seu estado protetor. Soma-se a isso, o estado de latência clínica que certos fungos (v.g., *Cryptococcus* spp, *Coccidioides* spp) podem apresentar junto ao hospedeiro. Isso posto, somente um bem estabelecido modelo animal demonstrando a segurança e adequada imunogenicidade de determinada estratégia de vacinação poderá garantir a superação de tais óbices. De mais a mais, somam-se distintas pesquisas em genômica, proteômica, manuseio de citocinas, terapias mediadas por células ou ainda os denominados “anticorpos-antibióticos” com o intuito de promover um uso efetivo de vacinas antifúngicas (CASSONE, 2008). De fato, vários modelos murinos de infecção pelo *Coccidioides* sp têm sido utilizados para experimentação com proteínas que apresentam potencial imunogênico (AMPEL, 2009).

Uma outra abordagem, envolve a utilização de drogas antifúngicas (v. g., fluconazol) em pacientes transplantados, especialmente em moradores de áreas de elevada endemicidade, no momento do procedimento cirúrgico (BLAIR, 2008; GALGIANI et al, 2005). Além desses, deve-se considerar a profilaxia antifúngica em pacientes usuários de anti-inflamatórios potentes (v. g., infliximab) com efeitos imunossupressores, a exemplo de reumatopatas (AMPEL, 2009).

Sob o prisma da imunoproteção, Cox & Magee (2004) advogam que o desenvolvimento de formas de imunização para a coccidioidomicose humana deve seguir certos critérios, a exemplo do uso de uma vacina recombinante (mais efetiva que a forma univalente), além da demonstração de proteção efetiva em camundongos e em outros modelos animais. De fato, o entendimento atual é pela determinação de uma vacina multivalente composta de diversas proteínas imunodominantes. Outro aspecto a considerar é o da escolha

do adjuvante a ser utilizado no momento da inoculação. Atualmente, o único aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) é o de sais de alumínio, que costumam direcionar a resposta imune para a via Th2. Estudos recentes têm proposto a utilização de adjuvantes que estimulam elementos do sistema complemento para uso conjugado com o antígeno imunoprotetor (HUNG et al, 2012). Além disso, a escolha de uma rota efetiva para inoculação da vacina requer a discussão de vantagens e impraticabilidades pela utilização das vias tradicionais (intramuscular e subcutânea) e a utilização de vias alternativas, a exemplo da via nasal. Outras estratégias de imunização envolvem a melhor compreensão das vias de ativação imunológica como a Th1, Th2 e Th17 (HUNG et al, 2011).

Nos últimos anos, tem-se percebido um renovado interesse no desenvolvimento de vacinas contra agentes fúngicos, sendo que, a maior parte das pesquisas faz uso de modelos murinos da doença humana. O acúmulo de informações derivado desses estudos avançou até o ponto onde se percebe que o incremento de vacinas, tendo o ser humano como alvo, é um objetivo realista e alcançável (CUTTLE et al, 2007).

Destacam-se, entre tais pesquisas com microrganismos fúngicos, os estudos com *Paracoccidioides brasiliensis*. Esses têm buscado, entre outras estratégias, a inoculação de peptídeos em modelo murino, associando-se às drogas antifúngicas existentes e auxiliando na redução do tempo de tratamento em portadores de paracoccidioidomicose (AMORIM, 2010; MARQUES et al, 2006).

Entre as doenças fúngicas, a coccidioidomicose se presta como uma das de melhor aplicabilidade para produção de uma vacina, uma vez que, é baseada em regiões de endemicidade delineada, com populações-alvo bem definidas, além de demonstrar uma reconhecida imunogenicidade do microrganismo (COX; MAGEE, 2004; COLE et al, 2004).

## 1.2 Perguntas de partida

Em face do exposto, surgiram as indagações:

- 1) Qual o perfil bioquímico de antígenos protéicos extraídos a partir de cepa clínica de *C. posadasii*, oriunda do Nordeste brasileiro?
- 2) Quais as características clínicas, laboratoriais e a reatividade sérica frente a antígenos protéicos, extraídos a partir de cepa clínica de *C. posadasii* oriunda do Nordeste brasileiro, de casos humanos de coccidioidomicose, ocorridos no Estado do Ceará?
- 3) Qual o perfil imunoprotetor, em modelo murino de coccidioidomicose, de antígenos protéicos extraídos a partir de cepa clínica de *C. posadasii* oriunda do Nordeste brasileiro?

### 1.3 Hipóteses

- Antígenos protéicos extraídos a partir de cepa clínica de *C. posadasii* oriunda do Nordeste brasileiro, possuem perfil bioquímico com potencial imunogênico.
- Casos humanos de coccidioidomicose, ocorridos no Estado do Ceará, demonstram características clínicas e laboratoriais semelhantes às descritas na literatura, além de reatividade sérica frente a antígenos protéicos extraídos a partir de cepa clínica de *C. posadasii* oriunda do Nordeste brasileiro.
- Antígenos protéicos extraídos a partir de cepa clínica de *C. posadasii* oriunda do Nordeste brasileiro, indicam potencial de imunoproteção em modelo murino de coccidioidomicose.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo geral

- Descrever a caracterização laboratorial, casos clínicos de coccidioomicose humana e potencial efeito imunoprotetor em modelo murinho de antígeno extraído de cepa clínica de *C. posadasii*.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Descrever características bioquímicas de antígenos protéicos extraídos de cepa clínica de *C. posadasii* oriunda do Nordeste brasileiro.
- Realizar busca ativa de casos humanos de coccidioomicose no Estado do Ceará descrevendo suas características clínicas e laboratoriais;
- Avaliar a resposta imunoprotetora de antígenos protéicos extraídos de cepa clínica de *C. posadasii* oriunda do Nordeste brasileiro, em modelo murino de coccidioomicose, por meio de pesagem de animais, hemograma completo, dosagem sérica de citocinas por ELISA e análise visceral (macroscopia e histopatológico);

---

**ARTIGOS PUBLICADOS**

---



---

**ARTIGO 1**

**Biochemical characterization of an in-house *Coccidioides* antigen:  
perspectives for the immunodiagnosis of coccidioidomycosis**

**ARTIGO PUBLICADO**

**PERIÓDICO: *Molecules***

**QUALIS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III: B2**

---

---

**ARTIGO 2**

**Coccidioidomycosis in armadillo hunters from the state of Ceará,  
Brazil**

**ARTIGO PUBLICADO**

**PERIÓDICO: *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***

**QUALIS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III: B1**

---

---

**ARTIGO 3**

**AN *IN-HOUSE* ANTIGEN IN MICE INFECTED WITH  
*COCCIDIOIDES POSADASII*: A POSSIBLE  
IMMUNOPROTECTION?**

---

---

## **REFERÊNCIAS**

---

ADASKA, J. M. Peritoneal coccidioidomycosis in a mountain lion in California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 1, p. 75-77, 1999.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v. 215, p. 403-410, 1990.

AMORIM, Juliana de. **Geração de células T de memória e linfócitos T reguladores em camundongos BALB/c vacinados com vetor plasmidial contendo o inserto P10 de *Paracoccidioides brasiliensis***. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-07102010-094556/>>. Acesso em: 04-06-2012.

AMPEL, N. M. Coccidioidomycosis: A Review of Recent Advances. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, p. 241–251, 2009.

AMPEL, N. M. ; HECTOR, R. F. Measuring cellular immunity in coccidioidomycosis: the time is now. **Mycopathologia**, v. 169, p. 425-426, 2010.

AMPEL, N. M. Coccidioidomycosis in persons infected with HIV type 1. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n.7, p.1174-1178, 2005.

AMPEL, N. M. Measurement of cellular immunity in human coccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 156, n.4, p.247-262, 2003.

AMPEL, N. M.; MOSLEY, D. G.; ENGLAND, B.; VERTZ, P. D.; KOMATSU, K.; HAJJEH, R. A. Coccidioidomycosis in Arizona: Increase in incidence from 1990 to 1995. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 1528-1530, 1998.

AMPEL, N. M.; WIEDEN, M. A.; GALGANI, J. N. Coccidioidomycosis: clinical update. **Reviews of Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 11, n. 6, p. 897-911, 1989.

ARSURA, E.L.; BOBBA, R.K.; REDDY, C.M. Coccidioidal pericarditis: a case presentation and review of the literature. **International Journal of Infectious Diseases**, v.9, n.2, p.104-109, 2005.

ARSURA, E. L.; KILGORE, W. B. Miliary Coccidioidomycosis in the Immunocompetent. **Chest**, Estados Unidos, n. 117, p. 404-409, 2000.

ARSURA, E.L.; KILGORE, W. B.; RATNAYAKE, S. N. Erythema nodosum in pregnant patients with coccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 1201-1203, 1998.

BANDEIRA, S. P. **Coccidioidomicose no estado de Ceará (1995 – 2007): características clínico-laboratoriais e análise das frações protéicas do antígeno total de *Coccidioides posadasii* no imunodiagnóstico**. 2008. 99f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Universidade Federal do Ceará/Fortaleza, 2008.

- BANUELOS, A. F.; WILLIAMS, P. L.; JOHNSON, R. H.; BIBI, S.; FREDRICKS, D. N.;
- GILROY, S. A.; BHATTI, S. U.; AGUET, J.; STEVENS, D. A. Central nervous system abscesses due to *Coccidioides* species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, 1996.

BARNATO, A. E.; SANDERS, G.D.; OWENS, D. K. Cost-effectiveness of a potential vaccine for *Coccidioides immitis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 797-806, 2001.

BAVA, A. J.; NEGRONI, R.; ARECHAVALA, A.; ROBLES, A. M.; CURZIO, D.; DI GIOIA, P. Estudio de ocho casos de coccidiodomicosis en un hospital de Buenos Aires. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, p. 111-113, 1999.

BEAMAN, L. Effects of recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor on *in vitro* interactions of human mononuclear phagocytes with *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, v. 59, p.4227-4229, 1991.

BERCOVITCH, R. S.; CATANZARO, A.; SCHWARTZ, B. S.; PAPPAGIANIS, D.; WATTS, D. H.; AMPEL, N. M. Coccidioidomycosis during pregnancy: a review and recommendations for management. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 4, p. 363–368, 2011.

BIALEK, R.; GONZÁLEZ, G.M.; BEGEROW, D.; ZELCK, U.E. Coccidioidomycosis and blastomycosis: advances in molecular diagnosis. **Immunology & Medical Microbiology**, v. 45, n.3, p.355-360, 2005.

BIALEK, R.; KERN, J.; HERRMANN, T.; TIJERINA, R.; CECEÑAS, L.; REISCHL, U.; GONZÁLEZ, G.M. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 778-783, 2004.

BINNICKER, M.J.; BUCKWALTER, S.P.; EISBERNER, J.J.; STEWART, R.A.; MCCULLOUGH, A.E.; WOHLFIEL, S.L.; WENGENACK, N.L. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.1, p.173-178, 2007.

BLAIR, J. E. Approach to the solid organ transplant patient with latent infection and disease caused by *Coccidioides* species. [Current Opinion in Infectious Diseases](#), v. 21, n. 4, p. 415-420, 2008.

BLAIR, J. E.; CURRIER, J. T. Significance of isolated positive IgM serologic results by enzyme immunoassay for coccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.166, n.2, p.77-82, 2008.

BLAIR, J. E.; COAKLEY, B.; SANTELLI, A. C.; HENTZ, J. G.; WENGENACK, N. L. Serologic testing for symptomatic coccidioidomycosis in immunocompetent and immunosuppressed hosts. **Mycopathologia**, v.162, n.5, p.317-324, 2006.

BLAIR, J. E.; LOGAN, J. L. Coccidioidomycosis in solid organ transplantation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p.1536-1544, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Educação. Universidade Federal do Ceará. Biotério Central (BIOCEN). **Arquivos Disponíveis**, 2010. Disponível em: <<http://www.bioteriocentral.ufc.br>>. Acesso em: 15 jan. 2010.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 7ª ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2008a. 372 p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Vice-Presidência de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Comissão de Ética no uso de animais de experimentação – CEUA. **Manual de Utilização de Animais**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2008b. 54 p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 28 p.

BRAVO, T. C. La coccidioidomicosis pulmonar y sistémica. Avances recientes y perspectivas terapéuticas. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, Mexico, v. 9, n. 1, p. 70-83, 1996.

BRIED, J. M.; GALGANI, J. N. *Coccidioides immitis* infections in bones and joints. **Clinical Orthopedics and related research**, v. 211, p. 235-243, 1986.

BRIGGS, G. G.; FREEMAN, R. K.; YAFFE, S. J. **Drugs in pregnancy and lactation: A Reference Guide to Fetal and Neonatal Risk**. 8a. ed., Estados Unidos: [Lippincott USA](http://www.lippincott.com), 2008.

BRILHANTE, R. S. N.; MOREIRA FILHO, R. E.; ROCHA, M. F. G.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; FECHINE, M. A. B.; LIMA, R. A. C.; PICANÇO, Y. V. C.; CORDEIRO, R. A.; CAMARGO, Z. P.; QUEIROZ, J. A. N.; ARAÚJO, R. W. B.; MESQUITA, J. R. L.; SIDRIM, J. J. C. Coccidioidomycosis in armadillo hunters from the state of Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 813-815, 2012.

BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; FECHINE, M. A. B.; FURTADO, F. M.; NAGAO-DIAS, A. T.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Coccidioidal pericarditis: a rapid presumptive diagnosis by an in-house antigen confirmed by mycological and molecular methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 1288-1292, 2008.

BURGDORF-MOISUK, A.; STALIS, I. H.; PYE, G. W. Disseminated coccidioidomycosis in a koala (*Phascolarctos cinereus*). **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v. 43, n. 1, p. 197-199, 2012.

CAIRNS, L.; BLYTHE, D.; KAO, A.; PAPPAGIANIS, D.; KAUFMAN, L.; KOBAYASHI J.; HAJJEH, R. Outbreak of coccidioidomycosis in Washington state residents returning from Mexico. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 61-64, 2000.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, A. L.; PIÑA-OSUNA, K.; LEAL-MORENO, A. M.; LÓPEZ-CÁRDENAS, A.; CERDA-FLORES, R. M. Características clinicopatológicas y distribución del número de autopsias de pacientes fallecidos por coccidioidomicosis en un hospital de referencia del noreste de México. **Gaceta Médica de México**, v. 4, n. 140, p. 399-404, 2004.

CALDWELL, J. W.; ARSURA, E. L.; KILGORE, W. B.; GARCIA, A. L.; REDDY, V.; JOHNSON, R. H. Coccidioidomycosis in pregnancy during an epidemic in California. **Obstetrics and Gynecology**, v. 95, n. 2, p. 236-9, 2000.

CAMARGO, Z. P. Técnicas inmunológicas em micologia. In: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

CASSONE, A. Fungal vaccines: real progress from real challenges. **Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 114-24, 2008.

CASTAÑEDA-GODOY, R.; LANIADO-LABORIN, R. Coexistencia de tuberculosis y coccidioidomicosis. Presentación de dos casos clínicos. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (Mexico)**, v. 15, n. 2, p. 98-101, 2002.

CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R.; LANIADO-LABORÍN, R.; CONCEPCION, T.; MUNÑOZ-HERNÁNDEZ, B.; AROCH-CALDERÓN, A.; ARANDA-URIBE, I. S.; FLORES-SÁNCHEZ, M. A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M. R.; HERNÁNDEZ-NAVAREZ, A.; MANJARREZ-ZAVALA, M. A.; MIRANDA-MAURICIO, S.; PALMA, G.; PÉREZ-MEJÍA, A. Clinical Comparison of Two Mexican Coccidioidins. **Mycopathologia**, v. 169, p. 427-430, 2010.

CASTAÑÓN-OLIVARES, L. C.; GÜERENA-ELIZALDE, D.; GONZALEZ-MARTINEZ, M. R.; LICEA-NAVARRO, A. F.; GONZALEZ-GONZALEZ, G. M.; AROCH-CALDERON, A. Molecular Identification of *Coccidioides* Isolates from Mexican Patients. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1111, p. 326-335, 2007.

CENTER OF DISEASES CONTROL. Increase in Coccidioidomycosis --- Arizona, 1998--2001. Estados Unidos: **MMWR**, 2003. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtm/mm5206a4.htm>>. Acesso em: 26 set. 2009.

CHABASSE, D.; PIHET, M.; BOUCHARA, J. P. Les moisissures opportunistes: émergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine revue générale. *Revue Française des Laboratoires*, n. 373, p. 21-34, 2005.

CHATURVEDI, V.; RAMANI, R.; GROMADZKI, S.; RODEGHIER, B.; CHANG, H.; MORSE, D. L. Coccidioidomycosis in New York State. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 25-29, 2000.

CHILLER, T. M.; GALGANI, J. N.; STEVENS, D. A. Coccidioidomycosis. **Infectious Disease Clinics North America**, v. 17, n. 1, p. 41-57, 2003.

CLEMONS, K. V.; LEATHERS, C. R.; KENNETH, W. L. Systemic *Coccidioides immitis* Infection in Nude and Beige Mice, **Infection and Immunity**, v. 47, n. 3, p. 814-821, 1985.



[COLE G. T.](#); [XUE J. M.](#); [OKEKE C. N.](#); [TARCHA E. J.](#); [BASRUR, V.](#); [SCHALLER, R. A.](#); [HERR, R. A.](#); [YU, J. J.](#); [HUNG C. Y.](#) A vaccine against coccidioidomycosis is justified and attainable. [Medical Mycology](#), v. 42, n. 3, p. 189-216, 2004.

COLE, G. T.; ZHU, S. W.; PAN, S. C.; YUAN, L.; KRUSE, D.; SUN, S. H. Isolation of antigens with proteolytic activity from *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 5, p.1524-1534, 1989.

COLE, G. T.; SESHAN, K. R.; FRANCO, M.; BUKOWNIK, E.; SUN, S. H.; HEARN, V. M. Isolation and morphology of an immunoreactive outer wall fraction produced by spherules of *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 10, p. 2686-2694, 1988.

COLE, G. T. Models of cell differentiation in conidial fungi. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 2, p. 95-132, 1986.

COMRIE, A. C. Climate factors influencing coccidioidomycosis seasonality and outbreaks. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, 2005.

CONVERSE, J. L. Effect of physio-chemical environment of spherulation of *Coccidioides immitis* in a chemically defined medium. **The Journal of Bacteriology**, v. 72, p. 784–792, 1956.

COPETTI, N. **Métodos de colorações histológicas e citológicas**. Porto Alegre: Faculdade de Medicina da UFRGS, 118p., 1996.

CORDEIRO, R. A.; SILVA, K. R. C.; BRILHANTE, R. S. N.; MOURA, F. B. P.; DUARTE, N. F. H.; MARQUES, F. J. F.; CORDEIRO, R. A.; MOREIRA FILHO, R. E.; ARAÚJO, R. W. B.; BANDEIRA, T. J. P. G.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. *Coccidioides posadasii* Infection in Bats, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 668-670, 2012.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; ARAÚJO MOURA, F. E.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Rapid diagnosis of coccidioidomycosis by nested PCR assay of sputum. **Clinical Microbiology and Infection**, p. 1-3, 2007.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; FECHINE, M. A. B.; CAMARA, L. M. C.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from Northeast Brazil. **Medical Mycology**, v. 44, p. 631–639, 2006a.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; FECHINE, M. A. B.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. In vitro inhibitory effect of antituberculosis drugs on clinical and environmental strains of *Coccidioides posadasii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 58, p. 575–579, 2006b.

CORTEZ, K. J.; WALSH, T. J.; BENNETT, J. E. Successful treatment of coccidioidal meningitis with voriconazole. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 12, p. 1619-22, jun., 2003.

COSTA, F. A. M.; REIS, R. C.; BENEVIDES, F.; TOMÉ, G. S.; HOLANDA, M. A. Coccidioidomicose pulmonar em caçador de tatus. **Jornal de Pneumologia**, v.27, n.5, p.275-278, 2001.

COX, R. A.; MAGEE, D. M. Coccidioidomycosis: host responses and vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 804-839, 2004.

COX, R. A.; MAGEE, D. M. Protective immunity in Coccidioidomycosis. **73<sup>rd</sup> Forum in immunology**, p. 417-428, 1998.

CRUM, N. F.; BALLON-LANDA, G. Coccidioidomycosis in Pregnancy: Case Report and Review of the Literature. **The American Journal of Medicine**, 2006.

CRUM, N.F.; LEDERMAN, E. R. ; STAFFORD, C. M.; PARRISH, J. S.; WALLACE, M. R. Coccidioidomycosis: a descriptive survey of a reemerging disease. Clinical characteristics and current controversies. **Medicine**, (Baltimore), v. 83, n. 3, p. 149-75, may. 2004a.

CRUM, N.F.; POTTER, M.; PAPPAGIANIS, D. Seroincidence of Coccidioidomycosis during Military Desert Training Exercises. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4552-4555, 2004b.

CUNNINGHAM, F. G.; LEVENO, K. J.; BLOOM, S. L.; GILSTRAP III, L. C.; HAUTH, J. C.; ROSE, J. C.; SPONG, C. Y. **Williams Obstetrics**. Estados Unidos: McGraw Hill, 2009.

DAS, R.; MCNARY, J.; FITZSIMMONS, K.; DOBRACA, D.; CUMMINGS, K.; MOHLE-BOETANI, J.; WHEELER, C.; MCDOWELL, A.; IOSSIFOVA, Y.; BAILEY, R.; KREISS, K.; MATERNA, B. Occupational coccidioidomycosis in California: outbreak investigation, respirator recommendations, and surveillance findings. **Journal of Occupational and Environment Medicine**, v. 54, n. 5, p. 564-71, 2012.

DAVIES, S. F.; SAROSI, G. A. Role of serodiagnostic tests and skin tests in the diagnosis of fungal disease. **Clinics in Chest Medicine**, v. 08, n. 01, p.135-146, 1987.

DE HOOG G. S.; GUARRO, J.; GENE, J; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2. ed. Espanha: CentralBureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands and the Rovira i Virgili University, 2000.

DELGADO, J. M; LARA, R. T.; GABRIEL, A. P.; GONZÁLEZ, M. R.; COVARRUBIAS, L. M. Coccidioidomicosis pulmonar: tratamiento quirúrgico de dos casos. **Gaceta Médica de México**, Mexico, v. 129, n. 1, p. 53-6, 1993.

DERESINSKI, S. Coccidioidomycosis: efficacy of new agents and future prospects. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 693-696, 2001.

DESAI, S. A.; MINAI, O. A.; GORDON, S. M.; O'NEIL, B.; WIEDEMANN, H. P.; ARROLIGA, A. C. Coccidioidomycosis in non-endemic areas: a case series. **Respiratory Medicine**, v. 95, n. 4, p. 305-9, 2001.

DICAUDO, D. J. Coccidioidomycosis: a review and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.55, n.6, p. 929-942, 2006.

DIÓGENES, M. J. N.; JAMACURU, W. F.; SILVA, M. A. B.; CARVALHO, F. F. Inquérito epidemiológico com esferulina em Jaguaribara-CE, Brasil, 1993. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.70, n. 6, p.525-529, 1995.

DIXON, D. M. *Coccidioides immitis* as a select agent of bioterrorism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 602-605, 2001.

DRUTZ, D. J.; HUPPERT, M. Coccidioidomycosis: factors affecting the host-parasite interaction. **The Journal of Infectious Diseases**, v.147, p. 372–390, 1983.

DURKIN M.; CONNOLLY P.; KUBERSKI T.; MYERS R.; KUBAK B. M.; BRUCKNER D. et al. Diagnosis of Coccidioidomycosis with use of the *Coccidioides* Antigen Enzyme Immunoassay. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 69-73, 2008.

EDWARDS JR., J. E. Fungal cell wall vaccines: an update. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 895–903, 2012.

EULALIO, K. D. **Infecção natural de tatus *Dasyus novencinctus* por *Coccidioides immitis* no Estado do Piauí, Brasil**. 2000. 99f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz / Convênio Universidade Federal do Piauí, 2000.

FIERER, J.; WATERS, C.; LORRAINE, W. Both CD4+ and CD8+ T Cells Can Mediate Vaccine-Induced Protection against *Coccidioides immitis* Infection in Mice, **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, p. 1323–31, 2006.

FISHER, M. C.; KOENIG, G. L.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. **Mycologia**, v.94, n.1, p.73-84, 2002a.

FISHER, M. C.; RANNALA, B.; CHATURVEDI, V.; TAYLOR, J. W. Disease surveillance in recombining pathogens: multilocus genotypes identify sources of human *Coccidioides* infections. **PNAS**, v. 99, n. 13, p. 9067-9071, 2002b.

FISHER, M. C.; KOENIG, G. L.; WHITE, T. J.; SAN-BLAS, G.; NEGRONI, R.; ALVAREZ, I. G.; WANKE, B.; TAYLOR, J. W. Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 8, p.4558-4562, 2001.

FONSECA, O. J. M.; LACAZ, C. S.; MACHADO, P. A. Inquérito imuno-alérgico na Amazônia. Resultados preliminares. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 15, n. 6, p. 409-416, 1973.

FRYKBERG, R.; NOE, B.; MICHAEL, S.; EDWARD, E. Disseminated Coccidioidomycosis of the Rearfoot: A case report. **The Foot & Ankle Journal**, v. 1, n. 8, 2008.

GABRIEL, A. P.; MARTÍNEZ-ORDAZ, V. A.; VELASCO-RODREGUEZ, V. M.; LAZO-SÁENZ, J. G.; CICERO, R. Prevalence of Skin Reactivity to Coccidioidin and Associated

Risks Factors in Subjects Living in a Northern City of Mexico. **Archives of Medical Research**, v. 30, n. 5, p. 388-392, 1999.

GALGIANI, J. N.; AMPEL, N. M.; BLAIR, J. E.; CATANZARO, A.; JOHNSON, R. H.; STEVENS, D. A.; WILLIAMS, P. L. Coccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 9, p. 1217-1223, 2005.

GALGIANI, J. N.; AMPEL, N. M.; CATANZARO, A.; JOHNSON, R. H.; STEVENS, D. A.; WILLIAMS, P. L. Practice guidelines for the treatment of coccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 658-661, 2000.

GALGIANI, J. N. Coccidioidomycosis. **Western Journal of Medicine**, v. 159, n. 2, p. 153-171, 1993.

GARCIA, E. M.; MARTINEZ, J. E. G.; CASANOVA, L. J.; ALLEN, J. L. F. Coccidioidomycosis disseminada: manifestacion inicial de sida em residente de área no endêmica. **Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 38, n. 6, p. 433-436, 2000.

GAUTAM, R.; SRINATH, I.; CLAVIJO, A.; SZONYI, B.; BANI-YAGHOUB, M.; PARK, S.; IVANEK, R. Identifying areas of high risk of human exposure to Coccidioidomycosis in Texas using serology data from dogs. **Zoonoses Public Health**, p. 1-8, 2012.

GLEICHER, N.; BUTTINO JR., L.; ELKAYAM, U.; EVANS, M. I.; GALBRAITH, R. M.; GALL, S. A.; SIBAI, B. M. **Principles and Practice of Medical Therapy in Pregnancy**, 3a. ed.; Estados Unidos: Appleton & Lange, 1998.

GOBBI, F.; ANGHEBEN, A.; FARINA, C.; BUONFRATE, D.; POSTIGLIONE, C.; ROSSANESE, A.; ANSELMI, M.; SAVIO, C.; GOBBO, M.; BISOFFI, Z. Coccidioidomycosis: First Imported Case in Italy. **Journal of Travel Medicine**, v. 19, n. 3, p. 192-194, 2012.

GODOY, J. Coccidioidomycosis sistémica. Informe de un caso en Colombia. **Acta Medica Colombiana**, Colômbia, v. 15, n. 4, p. 208-11, 1990.

GOMES, O. M.; SERRANO, R. R. P.; PRADEL, H. O. V.; MORAES, N. L. T. B.; VARELLA, A. L. B.; FIORELLI, A. Coccidioidomycose pulmonar. Primeiro caso nacional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 24, n.5, p. 167-168, 1978.

GONZÁLEZ, G. M.; GONZÁLEZ, G.; NAJVAR, L. K.; GRAYBILL, J. R. Therapeutic efficacy of caspofungin alone and in combination with amphotericin B deoxycholate for coccidioidomycosis in a mouse model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, n.6, p.1341-1346, 2007.

GRAUPMANN-KUZMA, A.; VALENTINE, B. A.; SHUBITZ, L. F.; DIAL, S. M., WATROUS, B.; TORNQUIST, S. J. Coccidioidomycosis in Dogs and Cats: A Review. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 44, p. 226-235, 2008.

GREENE, D. R.; KOENIG, G.; FISHER, M. C.; TAYLOR, J. W. Soil Isolation and Molecular Identification of *Coccidioides immitis*. **Mycologia**, v. 92, n.3, p. 406-410, 2000.

GROMADZKI, S. G.; CHATURVEDI, V. Limitation of the AccuProbe *Coccidioides immitis* Culture Identification Test: False-Negative Results with Formaldehyde-Killed Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p-2427-2428, 2000.

HATTON, R. D.; WEAVER, C. T. T-bet or Not T-bet. **Science**, v.302, p.993-994, 2003.

HECTOR, R. F.; RUTHERFORD, G. W.; TSANG, C. A.; ERHART, L. M.; McCOTTER, O.; ANDERSON, S. M.; KOMATSU, K.; TABNAK, F.; VUJIA, D. J.; YANG, Y.; GALGIANI, J. N. The Public Health Impact of Coccidioidomycosis in Arizona and California. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 1150-1173, 2011.

HIRSCHMANN, J.V. The early history of coccidioidomycosis: 1892-1945. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 9, p.1202-1207, 2007.

HIRSCH, EF; BENSON, H. Specific skin and test reaction with filtrates of coccidioides immitis. **Journal of Infection Diseases**, v. 40, p. 629-633, 1927.

HOLLEY, K; MULDOON, M; TASKER, S. *Coccidioides immitis* osteomyelitis: a case series review. **Orthopedics**, v. 25, n. 8, p. 827-32, 2002.

HOOPER, J. E.; LU, Q.; PEPKOWITZ, S.H. Disseminated coccidioidomycosis in pregnancy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.131, n.4, p.652-655, 2007.

HSUE, G.; NAPIER, J. T.; PRINCE, R. A.; CHI, J.; HOSPENTHAL, D. R. Treatment of meningeal coccidioidomycosis with caspofungin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, n.1, p. 292-294, 2004.

HUNG, C. Y.; HURTGENA, B. J.; BELLECOURT, M.; SANDERSONB, S. D.; MORGANC, E. L.; COLE, G. T. An agonist of human complement fragment C5a enhances vaccine immunity against *Coccidioides* infection. **Vaccine**, v. 30, p. 4681– 4690, 2012.

HUNG, C. Y.; GONZALEZ, A.; WÜTHRICH, M.; KLEIN, B. S.; COLE, G. T. Vaccine Immunity to Coccidioidomycosis Occurs by Early Activation of Three Signal Pathways of T Helper Cell Response (Th1, Th2, and Th17). **Infection and Immunity**, p. 4511–4522, 2011.

HUNG, C. Y.; XUE, J.; COLE, G. T. Virulence Mechanisms of *Coccidioides*. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1111, p.225-235, 2007.

HUNG, C. Y.; SESHAN, K. R.; YU, J. J.; SCHALLER, R.; XUE, J.; BASRUR, V.; GARDNER, M. J.; COLE, G. T. A metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* contributes to evasion of host detection. **Infection and Immunity**, v. 73, n.10, p. 6689-6703, 2005.

HUNG, C. Y.; YU, J.; SESHAN, K.R; REICHARD, U.; COLE, G.T. A parasitic phase-specific adhesion of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. **Infection and Immunity**, v. 70, n.7, p.3443-3456, 2002.

HUNG, C.; AMPEL, N. M.; CHRISTIAN, L.; SESHAN, K. R.; COLE, G. T. A major cell surface antigen of *Coccidioides immitis* which elicits both humoral and cellular immune responses. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 584-593, 2000.

JAWETZ; MELNICK; ADELBERG. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Editora McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2001.

JOHANNESON, H.; VIDAL, P.; GUARRO, J.; HERR, R. A.; COLE, G. T.; TAYLOR, J. W. Positive Directional Selection in the Proline-Rich Antigen (PRA) Gene Among the Human Pathogenic Fungi *Coccidioides immitis*, *C. posadasii* and Their Closest Relatives, **Molecular Biology and Evolution**, v.21, n. 6, p. 1134-1145, 2004.

JOHNSON, R.; KERNERMAN, S. M.; SAWTELLE, B. G.; RASTOGI, S. C.; NIELSEN, H. S.; AMPEL, N. M. A Reformulated Spherule-Derived Coccidioidin (Spherusol) to Detect Delayed-Type Hypersensitivity in Coccidioidomycosis. **Mycopathologia**, 2012.

JOHNSON, S. M.; SIMMONS, K. A.; PAPPAGIANIS, D. Amplification of coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 5, p. 1982-1985, 2004.

KIM, A; PARKER, S. S. Coccidioidomycosis: case report and update on diagnosis and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 46, n. 5, p. 743-747, 2002.

KIM, M. M.; BLAIR, J. E.; CAREY, E. J.; WU, Q.; SMILACK, J. D. Coccidioidal Pneumonia, Phoenix, Arizona, USA, 2000–2004. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 397-401, 2009.

KIRKLAND, T.; COLE, G. T. Coccidioidomycosis: pathogenesis, immune response, and vaccine development, p. 365–400. In R. A. Calderone, R. L. Cihlar (ed.), **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y, 2002.

KIRSCH, E. J.; GREENE, R. T; PRAHL, A.; RUBIN, S. I.; SYKES, J. E.; DURKIN, M. M.; WHEAT, L. J. Evaluation of *Coccidioides* Antigen Detection in Dogs with Coccidioidomycosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, p. 343-345, 2012.

KLASSEN-FISHER, M. K. Fungi as Bioweapons. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 26, p. 387–395, 2006.

KOHN, G. J.; LINNÉ, S. R.; SMITH, C. M.; HOEPRICH, P. D. Acquisition of coccidioidomycosis at necropsy by inhalation of coccidioidal endospores. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, p. 527-530, 1992.

KOLIVRAS, K. N.; JOHNSON, P. S.; COMRIE, A. C.; YOOL, S. R. Environmental variability and coccidioidomycosis (valley fever). **Aerobiologia**, v. 17, n. 1, p. 31-42, 2001.

KOUFOPANOU, V.; BURT, A.; SZARO, T.; TAYLOR, J. W. Gene Genealogies, Cryptic Species, and Molecular Evolution in the Human Pathogen *Coccidioides immitis* and Relatives (Ascomycota, Onygenales). **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n.7, p. 1246-1258, 2001.

KUBERSKI, T. T.; SERVI, R. J.; RUBIN, P. J. Successful treatment of a critically ill patient with disseminated coccidioidomycosis using adjunctive interferon-gamma. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 910-2, mar, 2004.

KUHL, I. A.; KUHL, G.; LONDERO, A.; DIOGENES, M. J. N.; FERREIRA, M. F. Coccidioidomycosis laríngea: relato de caso. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 62, n.1, p. 48-52, 1996.

LACAZ, C. S. Blastomicose sul-americana: reações intradérmicas com a paracoccidioidina, coccidioidina e blastomicetona. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v. 3, n. 1, p.11-18, 1948.

LACAZ, C. S.; MENDES, E.; CARVALHO, P. B. Ensaio preliminar com a prova da coccidioidina em nosso meio. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v.15, n.2, p. 108-110, 1960.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier, 9ª edição. Capítulo 16 Coccidioidomicose, p. 403 – 415, 2002.

LACY, G. H.; SWATEK, F. E. Soil ecology of *Coccidioides immitis* at Amerindian Middens in California. **Applied Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 379-388, 1974.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAUER, A.; BAAL, J. D.; BAAL, J. C.; VERMA, M.; CHEN, J. M. Detection of *Coccidioides immitis* in Kern County, California, by multiplex PCR. **Mycologia**, v. 104, n. 1, p. 62-69, 2012.

LEAKE, J. A. D.; MOSLEY, D. G.; ENGLAND, B.; GRAHAM, J. V.; PLIKAYTIS, B. D.; AMPEL, N. M.; PERKINS, B. A.; HAJJEH, R. A. Risk factors for acute symptomatic coccidioidomycosis among elderly persons in Arizona, 1996-1997. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 1435-1440, 2000.

LEE, G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. **Wintrobe's Clinical Hematology**, 9ª Edição, p. 2316-2317, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 513-521, 2003.

LI, K.; YU, J-J; HUNG, C-Y; LEHMANN, P. F.; COLE, G. T. Recombinant Urease and Urease DNA of *Coccidioides immitis* elicit an immunoprotective response against Coccidioidomycosis in mice, **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 2878-2887, 2001.

LI, R-K.; CIBLAK, M. A.; NORDOFF, N.; PASARELL, L.; WARNOCK, D. W.; MCGINNIS, M. R. In Vitro Activities of Voriconazole, Itraconazole, and Amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1734–1736, 2000.

LIBOW, L. F.; LUM, G. H.; JACKSON, J. L.; ZAENGLEIN, J. Disseminated coccidioidomycosis in an American soldier in Europe. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 5, n. 1, p. 36-40, 1995.

LINDSLEY, M. D.; HURST, S. F.; IQBAL, N. J.; MORRISON, C. J. Rapid Identification of Dimorphic and Yeast-Like Fungal Pathogens Using Specific DNA Probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3505–3511, 2001.

LIU, G.Y.; NIZET, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 406-413, 2009.

LOUIE, L.; Ng, S.; HAJJEH, R.; JOHNSON, R.; VUGIA, D.; WERNER, S. B.; TALBOT, R.; KLITZ, W. Influence of host genetics on the severity of coccidioidomycosis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 672-679, 1999.

LOW, W. S.; SEID, A. B.; PRANSKY, S. M.; KEARNS, D. B. *Coccidioidis immitis* subperiosteal abscess of the temporal bone in a child. **Archives of Otolaryngology, Head & Neck Surgery**, v. 122, p. 189-192, 1996.

MACEDO, M. L.; FREIRE, M. D.; PARRA JR., A. A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2533-2540, 2004.

MACEDO, R. C. L.; ROSADO, A. S.; MOTA, F. F.; CAVALCANTE, M. A. S.; KELSEN, D. E.; D. FILHO, A.; MARTINS, L.M.S.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B. Molecular identification of *Coccidioides* spp. in soil samples from Brazil. **BMC Microbiology**, v. 11, n.108, 2011.

MANDEL, G. L.; PETRI, W. A. Fármacos utilizados na quimioterapia da tuberculose, da doença pelo complexo *Mycobacterium avium* e da lepra. In; GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro ; McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2003, p. 849-863.

MARQUES, A. F.; DA SILVA, M. B.; JULIANO, M. A. P.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Peptide Immunization as an Adjuvant to Chemotherapy in Mice Challenged Intratracheally with Virulent Yeast Cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2814–2819, 2006.

MARTINS, M. A.; ARAUJO, E. M. P. A.; KUWAKINO, M. H.; HEINS-VACCARI, E. M.; DEL NEGRO, G. M. B.; VOZZA JR., J. A.; LACAZ, C. S. Coccidioidomycosis in Brazil. a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, n. 5, 1997.

MERCHANT, M.; ROMERO, A.O.; LIBKE, R.D.; JOSEPH, J. Pleural effusion in hospitalized patients with Coccidioidomycosis. **Respiratory Medicine**, v.102, n.4, p.537-540, 2007.

MILLAR, B.C.; JIRU, X.; WALKER, M.J.; EVANS, J.P.; MOORE, J.E. False identification of *Coccidioides immitis*: do molecular methods always get it right? **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.12, p.5778-5780, 2003.



- MIRBOD-DONOVAN, F.; SCHALLER, R.; HUNG, C.Y.; XUE, J.; REICHARD, U.; COLE, G.T. Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. **Infection and Immunity**, v.74, n.1, p.504-515, 2006.
- MORAES, A. P.; MARTINS, R. L. M.; LEAL, I. J. R.; ROCHA, I.S.; MEDEIROS, P. Coccidioidomycose: novo caso brasileiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 31, n. 6, p. 559–562, 1998.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Advances in Immunology**, v. 46, p. 111-147, 1989.
- MUÑOZ, B.; CASTAÑÓN, L.R.; CALDERÓN, I.; VÁZQUEZ, M.E.; MANJARREZ, M.E. Parasitic mycelial forms of *Coccidioides* species in Mexican patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3, p.1247-1249, 2004.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2010.
- NEAFSEY, D. E.; BARKER, B. M.; SHARPTON, T. J. et al. Population genomic sequencing of *Coccidioides* fungi reveals recent hybridization and transposon control. **Genome Research**, p. 1-9, 2010.
- NEGRONI, R. Coccidioidomycosis: epidemiología, clínica y tratamiento. **Revista Argentina de Micología**, v. 17, n. 2, p. 3-8, 1994.
- NEGRONI, P.; VIVOLI, D.; BONFIGLIOLI, H. Estudios sobre el *Coccidioides immitis* Rixford et Gilchrist. VII. Reacciones inmunoalérgicas en la infección experimental del cobayo. **Revista Instituto Malbrán**, v. 14, p. 273-286, 1949.
- NOSANCHUK, J. D.; YU, J. J.; HUNG, C.Y.; CASADEVALL, A.; COLE, G.T. *Coccidioides posadasii* produces melanin in vitro and during infection. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 6, p. 517-520, 2006.
- OBEROI, J. K.; WATTAL, C.; AGGARWAL, P. K.; KHANNA, S.; BASU, A. K.; VERMA, K. Pulmonary coccidiomycosis in New Delhi, India. **Infection**, 2012.
- ODDS, F. C. Coccidiomycosis: flying conidia and severed heads. **Mycologist**, v.17, p.37-40, 2003.
- PADUA Y GABRIEL, A.; MARTINEZ-ORDAZ, V. A.; VELASCO-RODREGUEZ, V. M.; LAZO-SÁENZ, J. G.; CICERO, R. Prevalence of skin reactivity to coccidioidin and associated risks factors in subjects living in a Northern City of México. **Archives of Medical Research**, v. 30, n. 5, p. 388-392, 1999.
- PAIXÃO, G.C.; ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C. Coccidioidomycose e blastomicose. In: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

- PAN, S; SIGLER, L.; COLE, G. T. Evidence for a phylogenetic connection between *Coccidioides immitis* and *Uncinocarpus reesii* (Onygenaceae). **Microbiology**, v. 140, p. 1481-1494, 1994.
- PAN, S; COLE, G. T. Electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 4872-4880, 1992.
- PANACKAL, A. A.; HAJJEH, R. A.; CETRON, M. S.; WARNOCK, D. W. Fungal infections among returning travelers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 9, p. 1088-95, 2002.
- PAPPAGIANIS D. Serologic Studies in coccidioidomycosis. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 16, n. 4, p. 242-250, 2001a.
- PAPPAGIANIS, D. Seeking a vaccine against *Coccidioides immitis* and serologic studies: expectations and realities. **Fungal Genetics and Biology**, v. 32, n. 1, p. 1-9, 2001b.
- PAPPAGIANIS, D. *Coccidioides* antigen. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 243-244, 1999.
- PAPPAGIANIS, D.; ZIMMER, B.L. Serology of coccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, n.3, p.247-268, 1990.
- PARISH, J. M.; BLAIR, J. E. Coccidioidomycosis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 3, p.343-348, 2008.
- PARK, D. W.; SOHN, J. W.; CHEONG, H. J.; KIM, W. J.; KIM, M. J.; KIM, J. H.; SHIN, C. Combination therapy of disseminated coccidioidomycosis with caspofungin and fluconazole. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 26, 2006.
- PEREIRA JUNIOR, H. R. J.; JORGE, W.; BAGAGLI, E. Por que tatu?. **Ciência Hoje**, Brasil, v. 34, n. 199, p. 70-73, nov. 2003.
- PETERSON, C. M.; SCHUPPERT, K.; KELLY, P. C.; PAPPAGIANIS, D. Coccidioidomycosis and pregnancy. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 48, n. 3, p.149-156, 1993.
- PETKUS, A. F.; BAUM, L. L.; ELLIS, R. B.; STERN, M.; DANLEY, D. L. Pure Spherules of *Coccidioides immitis* in Continuous Culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 165-167, 1985.
- PIER, A. C. Prominent animal mycoses from various regions of the world. **Medical Mycology**, v. 38, supp I, p. 47-58, 2000.
- POLESKY, A.; KIRSCH, C. M.; SNYDER, L. S.; LoBUE, P.; KAGAWA, F. T.; DYKSTRA, B. J.; WEHNER, J. H.; CATANZARO, A.; AMPEL, N. M.; STEVENS, D. Airway coccidioidomycosis – report of cases and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 1273-1280, 1999.
- PRADO, M.; DA SILVA, M. B; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in

Brazil : a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 104, n. 3, p. 513-521, 2009.

PROIA, L. A.; TENORIO, A. R. Successful use of voriconazole for treatment of *Coccidioides* meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 48, n. 6, p. 2341, 2004.

PROVOST, N. B.; SHI C.; SHE, Y. M.; CYR, T. D.; MILLER, J. D. Characterization of an antigenic chitosanase from the cellulolytic fungus *Chaetomium globosum*. [Medical Mycology](#), v. 18, 2012.

RANCE, B. R.; ELSTON, D. M. Disseminated coccidioidomycosis discovered during routine skin cancer screening. **Cutis**, v. 70, n. 1, p. 70-2, 2002.

REIDARSON, T. H.; GRINER, L. A.; PAPPAGIANIS, D.; McBAIN, J. Coccidioidomycosis in a bottlenose dolphin. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 3, p. 629-631, 1998.

RESNICK, S.; PAPPAGIANIS, D.; MCKERROW, J. H. Proteinase production by the parasitic cycle of the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 11, p. 2807-2815, 1987.

RESTREPO, M. A. *Coccidioides immitis* Rixford et Rilchrist 1895, y *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore 1912) Almeida 1930: dos hongos patógenos restringidos al continente americano. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 30, n.116, p. 367-386, 2006.

RICHARDS, J. O.; AMPEL, N. M.; LAKE, D. F. Reversal of coccidioidal anergy in vitro by dendritic cells from patients with disseminated coccidioidomycosis. **The Journal of Immunology**, v.169, p. 2020-2025, 2002.

ROSENSTEIN, N. E.; EMERY, K. W.; WERNWE, S. B.; KAO, A.; JOHNSON, R.; ROGERS, D.; VUGIA, D.; REINGOLD, A.; TALBOT, R.; PLIKAYTIS, B. D.; PERKINS, B. A.; HAJJEH, R. A. Risk factors for severe pulmonary and disseminated coccidioidomycosis: Kern County, California, 1995-1996. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 708-715, 2001.

ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia e Saúde**. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2003.

RUHNKE, M. Mucosal and systemic fungal infections in patients with AIDS: prophylaxis and treatment. **Drugs**, v. 64, n. 11, p. 1163-80, 2004.

SAUBOLLE, M. A.; McKELLAR, P.P.; SUSSLAND, D. Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n.1, p. 26-30, 2007.

SCHNEIDER, E.; HAJJEH, R. A.; SPIEGEL, R. A. et al. A coccidioidomycosis outbreak following the Northridge, Calif, earthquake. **Journal of the American Medical Associations**, v. 277, n. 11, p. 904-908, 1997.

SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**, 3 ed. New York Springer-Verlag, 1994.

SEKHON, A. S.; ISAAC-RENTON, J.; DIXON, J. M. S.; STEIN, L.; SIMS, H. V. Review of human and animal cases of coccidioidomycosis diagnosed in Canada. **Mycopathologia**, v. 113, p. 1-10, 1991.

SHARMA, O. P. **Textbook of Fungi**. United States: McGraw-Hill, 1988.

SHUBITZ, L. F.; DIAL, S. M.; PERRILL, R.; CASEMENT, R.; GALGIANI, J. N. Vaccine-Induced Cellular Immune Responses Differ from Innate Responses in Susceptible and Resistant Strains of Mice Infected with *Coccidioides posadasii*. **Infection and Immunity**, p. 5553–5564, 2008.

SIDRIM, J. J. C.; DA SILVA, L. C. I.; NUNES, J. M. A.; ROCHA, M. F. G.; PAIXÃO, G. C. Le nord-est Brésilien, région d'endémie de coccidioidomycose? A propos d'une micro-epidemie. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 7, p. 37–39, 1997.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2004a.

SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Colheita, isolamento primário e laudos laboratoriais. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2004b.

SIGLER, L.; FLIS, A. L.; CARMICHAEL, J. W. The genus *Uncinocarpus* (Onygenaceae) and its synonym *Brunneospora*: new concepts, combinations and connections to anamorphs in *Chrysosporium*, and further evidence of relationship with *Coccidioides immitis*. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 1624–1636, 1998.

SILVA, L. C. L.; NUNES, L. M. A.; SIDRIM, J. J. C.; GONÇALVES, A.J.R. Coccidioidomycose pulmonar aguda: primeiro surto epidêmico descrito no Ceará – segundo no Brasil. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.72, n. 5, p. 49-66, 1997.

SIMON-NOBBE, B.; DENK, U.; PÖLL, V.; RID, R.; BREITENBACH, M. The spectrum of fungal allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 145, n. 1, p. 58-86, 2008.

SIMONS, C. M.; STRATTON, C. W.; KIM, A. S. Peripheral blood eosinophilia as a clue to the diagnosis of an occult *Coccidioides* infection. **Human Pathology**, v. 42, p. 449–453, 2011.

SOARES, E. L.; FREITAS, C. D. T.; OLIVEIRA, J. S.; SOUSA, P. A. S.; SALES, M. P.; BARRETO-FILHO, J. D. M.; BANDEIRA, G. P.; RAMOS, M. V. Characterization and insecticidal properties of globulins and albumins from *Luetzelburgia auriculata* (Allemao) Ducke seeds towards *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v.43, p.459-467, 2007.

SPINELLO, I. M.; JOHNSON, R. H.; BAQI, S. Coccidioidomycosis and Pregnancy: a Review. **Annals New York Academy of Sciences**, p. 358-364, 2007.

STERN, N. G.; GALGIANI, J. N. Coccidioidomycosis among scholarship athletes and other college students, Arizona, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 321-323, 2010.

STEWART, R. A.; MEYER, K. F. Isolation of *Coccidioides immitis* (stiles) from the soil. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 28, p. 937-938, 1932.

TABORDA, C. P.; SILVA, M. B.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview, **Mycopathologia**, v. 165, p. 331-339, 2008.

TALJANOVIC, M. S.; ADAM, R. D. Musculoskeletal coccidioidomycosis. **Seminars in Musculoskeletal Radiology**, v. 15, n. 5, p. 511-26, 2011.

TAUK-TORNISIELO, S. M.; GARLIPP, A.; RUEGGER, M.; ATTILI, D. S.; MALAGUTTI, E. Soilborne filamentous fungi in Brazil. [Journal of Basic Microbiology](#), v. 45, n. 1, p. 72-82, 2005.

THOMPSON, G. R. 3<sup>rd</sup>. Pulmonary coccidioidomycosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 32, n. 6, p. 754-763, 2011.

ULLOA, M.; LAPPE, P.; AGUILAR, S.; PARK, H.; PÉREZ-MEJÍA, A.; TORIELLO, C.; TAYLOR, M. L. Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: an integrative study in Guerrero, **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 77, p. 153-168, 2006.

UMEYAMA, T.; SANO, A.; KAMEI, K.; NIIMI, M.; NISHIMURA, K.; UEHARA, Y. Novel Approach to Designing Primers for Identification and Distinction of the Human Pathogenic Fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR Amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.5, p.1859–1862, 2006.

VALDIVIA, L.; NIX, D.; WRIGHT, M.; LINDBERG, E.; FAGAN, T.; LIEBERMAN, D.; STOFFER, T.; AMPEL, N.M.; GALGIANI, J.N. Coccidioidomycosis as a common cause of community-acquired pneumonia. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.6, p.958-962, 2006.

VASCONCELOS E. A. R.; NOGUEIRA F. C. S.; ABREU E. F. M.; GONÇALVES E. F.; SOUZA P. A. S.; CAMPOS F. A. P. Protein extraction from cowpea tissues for 2D electrophoresis and MS analysis. **Chromatographia**, v. 62, p.447–450, 2005.

VERAS, K. N. et al. Coccidioidomycosis: an unusual cause of acute respiratory distress syndrome. **Jornal de Pneumologia**, v. 29, n. 1, p. 45-48, 2003.

VERGHESE, S.; ARJUNDAS, D.; KRISHNAKUMAR, K. C.; PADMAJA, P.; ELIZABETH, D.; PADHYE, A. A.; WARNOCK, D. W. Coccidioidomycosis in India: report of a second imported case. **Medical Mycology**, v. 40, n. 3, p. 307-309, 2002.

VERSIANI, O. Blastomicose sul-americana. Teste cutâneo com coccidioidina. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 6, n. 2, p. 211–214, 1946.

VIANNA, H.; PASSOS, H.V.; SANT´ANA, A.V. Coccidioidomycose: relato do primeiro caso ocorrido em nativo do Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 21, n. 1, p. 51-55, 1979.

WANKE, B.; LAZERA, M.; MONTEIRO, P.C.; LIMA, F.C.; LEAL, M.J.; FERREIRA FILHO, P.L.; KAUFMAN, L.; PINNER, R.W.; AJELLO, L. Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's northeastern state of Piauí with a review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. **Mycopathologia**, v.148, n.2, p. 57-67, 1999.

WANKE, B. Coccidioidomycose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. IV, p. 375-378, 1994.

WHEAT, L. J. Approach to the Diagnosis of the Endemic Mycoses. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, p. 379-389, 2009.

WHEAT, L. J. ; GOLDMAN, M.; SAROSI, G. State-of-the-art review of pulmonary fungal infections. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 17, n. 2, p. 158-81, 2002.

WHEAT, R. W.; TRITSCHLER, C.; CONANT; N. F.; LOWE, E. P. Comparison of *Coccidioides immitis* arthrospore, mycelium, and spherule cell walls and influence of growth medium on mycelial cell wall composition. **Infection and Immunity**, v. 17, n. 1, p. 91-97, 1977.

WHITE, T. J.; BRUNS T.; LEE S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M Innisr, T White, J J Sninsky, **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, New York, p. 315-322, 1990.

WILSON A. M.; LUO W.; MILLER, J. D. Using human sera to identify a 52-kDa exoantigen of *Penicillium chrysogenum* and implications of polyphasic taxonomy of anamorphic ascomycetes in the study of antigenic proteins. **Mycopathologia**, v.168, n. 5, p. 213-26, 2009.

WU, J.; LINSKOTT, A. J.; OBERLE, A.; FOWLER, M. Pathology case of the month. Occupational hazard? Coccidioidomycosis (*Coccidioides immitis*). **Journal of the Louisiana State Medical Society**, v. 155, n. 4, p. 187-188, 2003.

YUAN, L.; COLE, G. T. Isolation and Characterization of an Extracellular Proteinase of *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 9, p. 1970-1978, 1987.

ZACHARIUS, R. M.; ZEN, T. E.; MORRISON, J. H.; WOODLOCK J. J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 30, p. 148-152, 1969.

ZEPEDA, M. R, KOBAYASHI, G. K. , APPLEMAN, M. D., NAVARRO, A. *Coccidioides immitis* presenting as a hyphal form in cerebrospinal fluid. **Journal of the National Medical Association**, v. 90, n. 7, 1998.

ZIMMERMAN, C. R.; SNEDKER, C. J.; PAPPAGIANIS, D. Characterization of *Coccidioides immitis* Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 12, p. 3040-3042, 1994.

---

## **ANEXOS**

---

## ANEXO A - MATERIAIS E MÉTODOS

### Tipo de pesquisa

Trata-se de pesquisa descritiva, explicativa, de campo e experimental.

### Locais do estudo

O estudo foi realizado nos seguintes locais:

- 1) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais e *Laboratório de Toxinas e Proteínas Tóxicas de Plantas* (Figura 6A);
- 2) Setor de Animais em Experimentação e Setor de Isolamento Primário e Taxonomia do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), do Centro de Biomedicina da UFC (Figura 6B);
- 3) Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) da UFC: hemograma completo dos camundongos;
- 4) Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Faculdade de Medicina da UFC: análise histopatológica das vísceras dos camundongos;
- 5) Laboratório de Investigação em Osteoartropatias (LIO) do Centro de Biomedicina da UFC: dosagem sérica das citocinas, por ELISA, dos camundongos.



Figura 5 – Locais do estudo:

A - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC;

B - Centro de Biomedicina – UFC.

(Fonte: Moreira Filho – 2012).



## Seleção da cepa fúngica

Foi utilizada cepa de *C. posadasii* estocada no CEMM (registro 05-2-063) obtida a partir de material clínico de paciente com quadro respiratório agudo de coccidioidomicose proveniente do município de Ibiapina (3° 55' 24' S, 40° 53' 22' W), Estado do Ceará, nordeste do Brasil. A manipulação de culturas fúngicas, no decorrer da pesquisa, foi realizada sob rígidas normas de biossegurança nível 3 (NB3).

## Obtenção do antígeno protéico

A produção do antígeno foi realizada de acordo com protocolo descrito por Brilhante et al (2008). A cepa fúngica selecionada foi retirada da micoteca do CEMM, repicada para tubo de ensaio contendo ágar batata inclinado, incubada durante 10 dias a 28°C, para confirmação de viabilidade e pureza da mesma. Após este período, 5 mL de solução salina NaCl 0,9% estéril era adicionada ao tubo de ágar batata contendo o crescimento fúngico.

Com delicada raspagem, utilizando-se alça de platina, o micélio fúngico foi transferido para a solução salina. Esta suspensão fúngica foi transferida a 100 mL de meio de cultura contendo glicose 2% (p/v) e extrato de levedura 1% (p/v), constituindo o pré-inóculo. Este, era incubado a 28°C por 10 dias. Após este período, o pré-inóculo foi transferido a recipiente contendo 1500 ml do mesmo caldo nutritivo, sendo incubado a 28°C, por 30 dias, de forma estacionária. Com o objetivo de inativação da cepa, a cultura foi mantida em contato com timerosal (0,2 g/L) (*Synth, Brazil*), durante 10 dias. Durante este período, alíquotas da cultura foram retiradas e inoculadas em ágar batata a 28°C, a fim de confirmar a inativação da mesma.

Somente após essa verificação, prosseguia-se o protocolo. A seguir, a cultura foi filtrada em papel de filtro e o filtrado obtido foi precipitado com sulfato de amônio sólido (*Sigma Chemical Corporation, USA*), no intervalo de saturação de 0-90%, de forma continuada. A quantidade de sal a ser acrescentada foi determinada conforme fórmula de Scopes (1994), ilustrada a seguir:

$$g = 535 (S2 - S1) / 100 - 0,3 S2$$

Na fórmula:

g – quantidade de sulfato de amônio a ser acrescentada em gramas a cada litro de solução;

S1 – saturação inicial do sal em solução (%); S2 – saturação final do sal em solução (%).

Após a completa adição do reagente, a mistura foi deixada em repouso a 4°C por 24 horas e, em seguida, centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos. O precipitado obtido da cultura foi ressuspensão em tampão PBS, dialisado exaustivamente contra água destilada em membrana com *cut off* de 10 KDa, aliquoteado e estocado a -20 °C até o momento da utilização.

Ao ser removida do estoque, a amostra antigênica extraída foi liofilizada e, objetivando a eliminação de possíveis componentes indesejáveis, foi submetida a um novo preparo por meio da mistura com polivinilpirrolidona em um tampão de extração (piridina 50 mM, tiouréia 10 mM, SDS 1%, pH 5,0), conforme descrito por Vasconcelos et al (2005).

## **Análise bioquímica**

### Determinação do conteúdo protéico do antígeno extraído

A quantificação da concentração de proteína no antígeno extraído foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

### Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras antigênicas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (PAGE) contendo SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), conforme protocolo descrito por Laemmli (1970). As preparações protéicas foram fixadas com tampão de corrida contendo 0,5 % de ágar e azul de bromofenol, em um sistema vertical. Para tanto foram utilizados géis de poliacrilamida (12,5%) de 14 x 14 cm. A corrida foi realizada a 25°C nas condições de 30mA e 150V. As proteínas foram visualizadas através do coramento do gel com a solução de Coomassie Coloidal (G-250).

### Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE)

Tiras de 11 centímetros, contendo gel com gradiente de pH imobilizado variando na faixa de 4-7 (*Amersham*), foram re-hidratadas durante 12 horas com solução tampão de re-hidratação (Uréia 7M, Tiouréia 2M, 1% de (3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amónio]-propano- sulfonato)[CHAPS], 0,5% de Pharmalyte 3-10, ditioneitol [DTT] 65mM) em uma cuba *Reswelling Tray* (*Pharmacia Biotech*) contendo as amostras protéicas. A focalização isoeétrica foi realizada utilizando o aparelho *Ettan IPGphor II* (*Amersham Biosciences*) nas condições elétricas descritas pelo fornecedor (Figura 7A). Após a etapa de focalização isoeétrica, as tiras foram transferidas para tubos de vidro contendo 3 mL de tampão de

equilíbrio (Tris 50mM, Glicerol 30 %, 6M uréia, 2 % de SDS, 1 L de azul de bromofenol) contendo 57,8 mg de DTT e deixados sob agitação lenta durante 15 minutos.

A segunda dimensão foi realizada com a deposição das tiras no topo de um gel de poliacrilamida (12,5%) de 14 x 14 cm, em um sistema vertical, e fixados com tampão de corrida contendo 0,5 % de ágar e azul de bromofenol. A corrida foi realizada a 25° C nas condições de 30mA e 150V. Os *spots* protéicos foram visualizados através do coramento do gel com a solução de Coomassie Coloidal (G-250).

Após descoramento, os géis foram digitalizados no *scanner ImageScanner UTA-1100 (Amersham Bioscience)* e as imagens capturadas pelo programa *LabScan* versão 5.0 (*Amersham Bioscience*) foram analisadas no programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare)*, conforme Soares et al (2007) (Figura 7B).

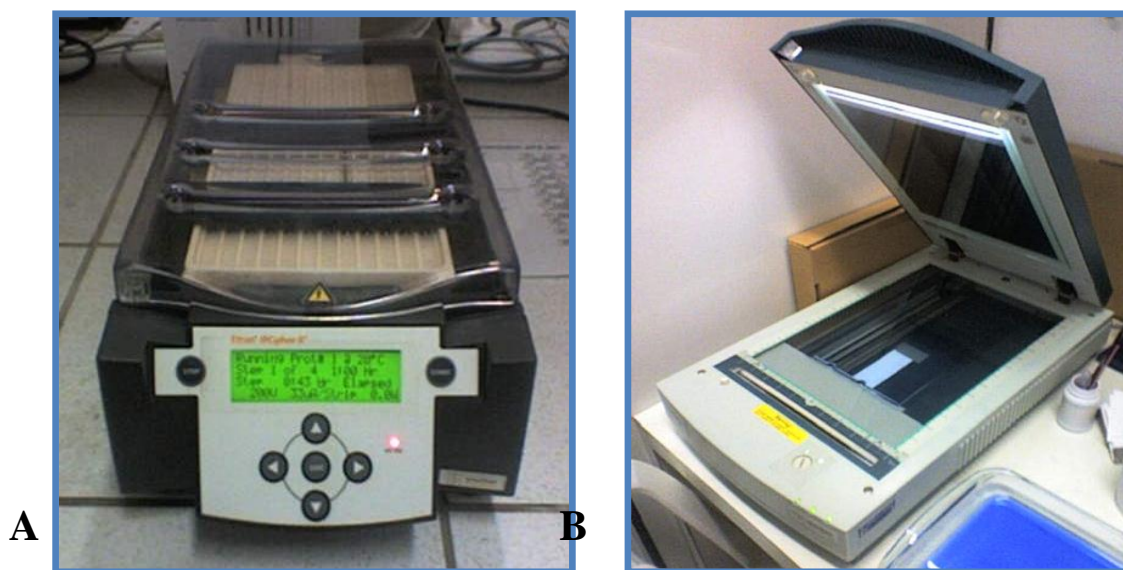


Figura 6 – 2D-PAGE: A – Focalizador Isoelétrico; B – *Image Scanner UTA 1100*.

(Fonte: Moreira Filho – 2012).

#### Detecção de proteases por zimograma

A amostra foi separada por eletroforese conforme protocolo descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforeses, o gel foi imerso em uma solução de Triton X-100 2,5 % em água por 40 min a 25 °C sob agitação constante para remoção do SDS e permitir o rearranjo das proteínas. Em seguida, o gel foi incubado em tampão PBS 50 mM pH 6,0 contendo 10 mM de CaCl<sub>2</sub> durante 16 h a 37 °C. Subsequentemente, o gel foi corado com uma solução de azul

brilhante de Coomassie R-350 0,1 % (*PhastGel Blue R*) em água: ácido acético: metanol (8:1:3,5 v/v/v) durante 4 horas e descorado com a mesma solução na ausência do corante. A atividade enzimática foi detectada pela presença de bandas transparentes (Macedo et al, 2004).

#### Detecção de glicoproteínas

A fração antigênica foi analisada quanto a presença de glicoproteínas com realização de eletroforeses unidimensionais, conforme protocolo de Laemmli (1970), utilizando uma solução de Schiff. Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso em ácido tricloroacético (TCA) 10 % por 30 min e posteriormente em uma solução de periodato 1 % e ácido acético 3 %, por uma hora, a 25 °C. O gel foi então deixado em contato com a solução de Schiff, no escuro por 50 min, e depois descorado com bissulfito 0,5 % (Zacharius et al, 1969).

#### Determinação do sequenciamento N-terminal

A fração antigênica foi novamente submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (conforme descrita anteriormente) e, em seguida, eletrotransferida (sistema *trans blot*, Multiphor II Pharmacia-LKB) para membrana de fluoreto polivinidileno (PVDF). A eletrotransferência foi conduzida a 50 V, 150 mA, por 45 minutos. Ao término, a membrana foi saturada com metanol 100% e, em seguida, lavada com água grau milli-Q e corada com Coomassie Blue R-250 0,1% em metanol 50% e ácido acético 1%, por 15 minutos. Decorrido esse tempo, a membrana foi descorada com uma solução de metanol 50% e ácido acético 1%, tendo sido trocada várias vezes até a visualização das bandas protéicas. As bandas bem definidas na faixa de massa molecular de 45-67 kDa e 67-97 kDa foram recortadas da membrana e submetidas à determinação de suas respectivas sequências de aminoácidos N-terminal. As sequências obtidas foram submetidas ao alinhamento automático através do programa BLASTp (ALTSCHUL et al, 1990).

#### Avaliação da imunorreatividade antigênica pela técnica de imunodifusão radial dupla (Ouchterlony)

A imunorreatividade do antígeno foi avaliada através de imunodifusão radial dupla, conforme protocolo descrito por Camargo (2004). Para tanto, foram utilizadas lâminas de vidro

montadas com 3ml de gel de agarose 1% em solução salina NaCl 0,9% (p/v) com 07 perfurações (01 central e 06 radiais equidistantes).

O antígeno foi inoculado no orifício central e, perifericamente, os soros-teste. O volume inoculado foi de 20 µl, divididos em duas etapas de igual volume, a fim de garantir a completa difusão da solução sem transbordamentos.

A lâmina foi incubada em câmara úmida a temperatura de 24°C, por 48 horas, com verificações visuais da reação a cada 24 horas. Após incubação, a lâmina foi lavada com solução salina NaCl 0,9% com 3 a 4 trocas durante 24 horas, sendo então submetidas a secagem em estufa a 37°C *overnight*, e coloração com Coomassie brilliant blue R para visualização das linhas de precipitação.

O antígeno protéico foi testado contra soros de pacientes portadores de coccidioidomicose, histoplasmose e paracoccidioidomicose estocados no CEMM da UFC.

## **Busca ativa, caracterização clínica e laboratorial de casos de coccidioidomicose humana no Estado do Ceará**

### Aspectos Éticos

Esta etapa do estudo foi submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital São José de Doenças Infecciosas (CEP-HSJ) da Secretaria da Saúde do Estado do Ceará e obteve parecer favorável à execução sob o número 22/2011 (Apêndice B).

### Busca de casos e caracterização clínica de coccidioidomicose humana

Foram avaliados casos clínicos, compatíveis com coccidioidomicose, assistidos no ano de 2010, no Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) visando relatar possíveis surtos epidêmicos com diagnóstico fundamentado em aspectos epidemiológicos e, posteriormente, confirmados com técnicas laboratoriais.

Foram acompanhados três caçadores de tatu, provenientes do município de Santa Quitéria (4° 19' 55" S, 40° 9' 25" W), Ceará, Brasil. Inicialmente, em junho de 2010, pai e filho, com 48 e 13 anos, foram internados no HSJ, apresentando febre, dor torácica, tosse, dispnéia e perda de peso há 11 dias. A ausculta pulmonar demonstrava crepitações em base, bilateral. Ambos estiveram internados, por 4 dias, no hospital de Santa Quitéria, com diagnóstico de pneumonia bacteriana. Informavam, ainda, diversas participações em caçada

de tatus, com escavações em solo, sendo a última realizada acerca de 15 dias, em um grupo constituído por cinco caçadores e um cão. Foi indicada antibioticoterapia com ceftriaxona, sem melhora. Os exames admissionais mostraram radiografias com infiltrados opacos, nodulares, perihilares e de base. Exames bioquímicos, hematológicos e a gasometria arterial se mostraram inconclusivos. Foi realizada pesquisa de fungos e germes piogênicos em aspirado medular, creme leucocitário, lavado brônquio-alveolar e hemocultura, todos com resultado negativo. No paciente de 13 anos, foi realizada, ainda, ultrassonografia de tórax que evidenciou derrame pleural em hemitórax direito com volume, aproximado, de 380 ml. Devido à procedência de região endêmica de coccidioidomicose, além do típico revolvimento da terra, realizado durante as caçadas de tatu, foram solicitados exames microbiológicos e imunodifusão radial dupla ao CEMM/UFC, para pesquisar a presença de *C. posadasii*. Após a coleta de amostra de sangue e escarro, iniciou-se esquema terapêutico com anfotericina B (endovenoso). Observada a melhora clínica progressiva, após 18 dias de internação, pai e filho receberam alta hospitalar com uso oral de fluconazol. Após cerca de 2 meses, retornaram para avaliação ambulatorial, sem queixas clínicas.

Em face dos quadros descritos, o CEMM/UFC, ainda em julho de 2010, enviou grupo para busca ativa de novos casos de contaminação, no município de Santa Quitéria, no local da realização das referidas caçadas de tatu dos casos descritos. Após contato e esclarecimento com grupo de caçadores da região, foram coletadas amostras de sangue nos 3 demais participantes da última caçada referida pelos pacientes internados, além de dez outros nativos e de 1 cão partícipes de outras caçadas. O grupo compareceu, também, ao local onde foram realizadas escavações durante a última caçada de tatu, a fim de coletar amostras de solo para análise laboratorial.

No início de julho de 2010, um dos partícipes da última caçada de tatus relatada, de 46 anos, foi transferido para internamento no mesmo hospital dos casos previamente descritos, com quadro de dor torácica à direita, com irradiação para o dorso, associada com febre e sudorese noturna há 21 dias. A ausculta pulmonar não apresentava alterações. Fizera uso de trimetoprim/sulfametoxazol e cefalexina, sem resposta terapêutica. Os exames admissionais mostraram radiografias com opacidades, nodulares, mal delimitadas, dispersas no parênquima pulmonar. Exames bioquímicos e hematológicos se mostraram inespecíficos. Foi realizada pesquisa de fungos em escarro, cujo exame direto foi inconclusivo. Entretanto, após cultivo em tubo contendo ágar-Sabouraud, foi evidenciado crescimento de colônias cotonosas, brancas, compatíveis com *C. posadasii*. O material foi enviado ao CEMM para confirmação diagnóstica.

Foi, então, iniciado esquema terapêutico, via oral, com fluconazol. Após 5 dias de internação, com progressiva melhora clínica, recebeu alta com orientação de retorno para avaliação ambulatorial. Como não mais regressou, foi realizado novo contato em Santa Quitéria. O paciente referiu ausência de queixas clínicas e retorno as caçadas de tatu, a despeito das orientações recebidas.

#### Avaliação laboratorial realizada no CEMM

##### Avaliação microbiológica (exame micológico direto e cultivo)

Amostras de escarro dos casos clínicos descritos foram depositadas sobre uma lâmina de vidro e acrescida de duas gotas de hidróxido de potássio a 40% (agente clarificador), coberta com uma lamínula e levada ao microscópio óptico a fim de verificar a presença de estruturas fúngicas. Foram utilizadas objetivas com aumento de 10X e 40X.

Em conjunto com o exame direto, realizou-se semeadura de alíquota do escarro coletado, em meio de cultura ágar-batata, distribuído em tubos de ensaio. Vencida essa etapa, os tubos foram incubados a temperatura de 25 a 28 °C, por um período de até 10 dias, com observações diárias, até que se detectasse o crescimento e a maturação de colônias fúngicas.

##### Avaliação imunológica (imunodifusão radial dupla - Ouchterlony)

Foram realizados ensaios de imunodifusão radial dupla, conforme protocolo realizado por Cordeiro et al (2006a), a partir do sangue total coletado dos casos clínicos descritos, de dez outros caçadores de tatu da região, bem como, do cão partícipe das caçadas. O soro das amostras coletadas foi separado por centrifugação e testado frente ao antígeno comercial de *Coccidioides* sp produzido pela Immy Immunodiagnostics®. Como controle positivo, foi utilizado soro reagente produzido pelo mesmo fabricante.

##### Extração do DNA e identificação molecular das cepas isoladas dos casos clínicos

###### - Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído utilizando o detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e o agente redutor betamercaptoetanol. O complexo ácido nucléico/CTAB foi separado das proteínas desnaturadas, polissacarídeos e debris celulares pela exposição à diluição de clorofórmio/álcool isomílico (24:1). A precipitação dos ácidos nucléicos foi realizada utilizando álcool isopropílico 100%. O precipitado de DNA foi ressuspenso em tampão TE pH 8 (BURT et al, 1995).

- Identificação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Os isolados foram identificados por PCR utilizando os iniciadores Coi9-1F e Coi9-1R. A reação foi realizada com um volume final de 25 µL, contendo 10 µL de amostra de DNA (20 ng/µL), 2,5 µL de tampão de reação 10X (New England Biolabs, UK), 1mmol/L de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, USA), 50 pmol de cada iniciador Coi9-1F e Coi9-1R (Invitrogen, USA), 10 mmol/L de cada desoxirribonucleotídeo e 1 U de *Taq* DNA polimerase (New England Biolabs, UK). A amplificação do DNA foi realizada em termociclador Mastercycler (Eppendorf, USA). Primeiramente, seguiu-se a etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, por fim, um ciclo de extensão final a 72°C por 3 minutos. A visualização dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (UMEYAMA et al, 2006).

Análise do solo do local da caçada de tatu

Para análise do solo do local da caçada de tatu, foi realizado ensaio com modelo murino a fim de flagrar possível continuidade do foco de contaminação fúngica. Dezenove amostras de solo, provenientes da toca do tatu onde foram feitas escavações durante a última caçada, foram coletadas na profundidade de 15 cm e com intervalo de 10 cm entre cada sítio de coleta, conforme descrito por Cordeiro et al (2006a). As amostras foram então acondicionadas em tubos falcon de 45 ml e estocadas a temperatura de -20 °C.

Posteriormente, conforme protocolo descrito por Ulloa et al (2006), foi pesada 1g de cada amostra de solo coletada e misturada a 10 ml de solução salina 0,9% contendo penicilina benzantina (100U/ml) e gentamicina (0,08 mg/ml) a fim de inibir o crescimento de possíveis contaminantes bacterianos. A suspensão foi levada ao vórtex por 5 minutos e deixada sedimentar, por 1 h, a 28 °C. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos.

Na etapa seguinte; camundongos machos, *Swiss*, procedentes do biotério da UFC, pesando 20-40 g e com 6 a 8 semanas de vida, foram inoculados, por via intraperitoneal, com 0,5 ml do sobrenadante da solução centrifugada. Foram, então, deixados em observação em gaiolas de contenção isoladas, com água e ração ad libitum, durante quinze dias.

Após esse período, foi realizada coleta, por via retroorbitária e sob sedação, de cerca de 2 ml de sangue total dos animais. Com a amostra coletada, foi realizado ensaio com imunodifusão radial dupla, após separação do soro por centrifugação, frente ao antígeno comercial de *Coccidioides* sp, produzido pela Immy Immunodiagnostics®.



Em seguida, os camundongos foram eutanasiados e imediatamente dissecados, com remoção de seus pulmões, fígado e baço. Com o auxílio de lâminas de bisturi estéreis, número 12, foi retirado fragmento de cerca de 0,5 cm de comprimento, de cada víscera removida, com subsequente cultivo em tubos de ensaio contendo ágar-Sabouraud e Mycosel suplementados com polimixina B (16 mg/l) e vancomicina (100mg/ml). Os tubos foram incubados a 28°C e verificados diariamente por 20 dias, a fim de constatar possível crescimento fúngico.

O restante do material das vísceras removidas foi fixado em solução contendo formol 37%, tamponado com fosfato monobásico e dibásico. Após cerca de 10 dias de formalização, as vísceras foram seccionadas e os fragmentos resultantes foram destinados inicialmente ao processo de desidratação, utilizando para isto concentrações crescentes de álcool etílico (70 - 100%). A etapa seguinte correspondeu à diafanização em xilol. Posteriormente, os fragmentos foram impregnados e incluídos em parafina fundida (600°C). Seccionaram-se os blocos contendo o tecido, em micrótomo, a uma espessura de corte de 5µm. Em seguida, conduziram-se os cortes obtidos ao banho-maria e após, esses foram recuperados em lâminas histológicas. Finalizada a secagem das lâminas, submeteram-se os cortes ao processo de coloração pelos métodos da hematoxilina-eosina, Grocott, PAS (Periodic acid-Schiff) e tricrômica de Masson, conforme descrito em Copetti (1996).

Materiais infectados, incluindo carcaças, vísceras, fezes e maravalha, foram descontaminados em autoclave, por 30 minutos a 121 °C. As gaiolas de contenção foram descontaminadas com solução de glutaraldeído a 2%.

## **Ensaio de imunoproteção em coccidioidomicose experimental**

### Aspectos éticos

O estudo foi submetido à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC. O projeto obteve parecer favorável à execução, sem alterações, sob o número 77/09 (Apêndice A).

### Biossegurança

Foi de suma importância o adequado manejo da amostra utilizada. Isso posto, foi observado, de forma intransigente, o máximo de cautela no momento da retirada e manejo do material biológico, com o intuito de preservar a segurança do pesquisador, conforme as

normas de biossegurança na manipulação de microrganismos com nível 3 de risco de contaminação.

#### Preparo do inóculo fúngico

Cepa de *C. posadasii* (registro 05-2-063), da micoteca do CEMM da UFC, foi cultivada em ágar batata a 28°C, em tubo, por um período de 7 dias. Foi, então, adicionado 1 ml de solução de NaCl (0,9%) estéril e preparada uma suspensão contendo artroconídios e hifas, a partir de suave rotação de *swab* estéril sobre a colônia. A suspensão foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto (CORDEIRO et al, 2006a) e ajustada até obter nível 2 de turvação, quando comparada com a escala bacteriana de McFarland.

#### Preparo do antígeno *in house*

Conforme protocolo descrito por Brilhante et al (2008), cepa de *C. posadasii* foi mantida na fase micelial e cultivada em meio contendo glicose a 2% e extrato de levedura a 1%, por um período de 30 dias a 30°C, sem agitação. Após esse período, o cultivo foi inativado com 0.2 g/l de thimerosal (*Synth, Brazil*) e o sobrenadante filtrado em papel de filtro. As proteínas da amostra foram precipitadas, por meio de adição de sulfato de amônio sólido (*Sigma Chemical Corporation, USA*), até obtenção de saturação de 90%, conforme fórmula de Scopes (1994). A solução foi mantida a 4°C por 24 horas, com posterior recuperação do precipitado protéico por centrifugação. Subsequentemente, foi realizada diálise exaustiva com água destilada em membrana com *cutoff* de 10 kDa e armazenamento a -20°C até o uso.

#### Grupos experimentais

Camundongos *Swiss (Mus musculus)*, machos, procedentes do Biotério Central (BIOCEN) da UFC, com 6 semanas de vida, foram divididos em 4 grupos experimentais (grupo 1 composto por 5 animais e os demais com 11 camundongos), mantidos em gaiolas de contenção, com ração e água *ad libitum* (observadas as orientações sobre manipulação de animais disponíveis no *site* do BIOCEN)(BRASIL, 2010). Os grupos foram assim distribuídos:

I - Grupo 1: animais sadios, que não sofreram qualquer intervenção, eutanasiados, após 30 dias do início do experimento;

II - Grupo 2: animais sadios, infectados, por via intraperitoneal (Figura 8A), com 0,1 ml do inóculo fúngico descrito; eutanasiados após 30 dias da infecção;

III - Grupo 3: animais sadios, inoculados duas vezes, por via subcutânea, na região dorsal, com 10 µg de *Antígeno total* e 10 µg de adjuvante de Freund completo, com intervalos de 15 dias (Figura 8B). Decorridos 15 dias da última inoculação, os animais foram infectados e eutanasiados, da mesma forma que no grupo 2;

IV - Grupo 4: animais sadios, inoculados duas vezes, por via subcutânea, na região dorsal, com 10 µg de adjuvante de Freund completo, com intervalos de 15 dias. Decorridos 15 dias da última inoculação, os animais foram infectados e eutanasiados, da mesma forma que no grupo 2.

A eutanásia foi realizada com depressão respiratória progressiva, induzida por éter etílico 98%.

#### Pesagem dos animais e análise macroscópica das vísceras

Antes da eutanásia, cada animal foi pesado e comparado o peso, em gramas, com o registrado no início do experimento. Após a eutanásia, foi realizada incisão mentoxifopubiana, mediana, com uso de tesoura estéril. Foram removidas as seguintes vísceras: pulmões, fígado, baço e rins. Adotaram-se, então, como parâmetros para avaliação macroscópica das vísceras analisadas: (0) ausência de sinais macroscópicos de infecção; (1) presença de 1 a 2 granulomas; (2) 2 a 8 granulomas; (3) coalescência de granulomas correspondendo a aproximadamente 33 a 70% do órgão; (4) pelo menos 70% de comprometimento tecidual do órgão (SHUBITZ et al, 2008).

#### Hemograma completo

Durante o procedimento de eutanásia, foram coletadas amostras de sangue total de cada camundongo, por meio de punção retroorbitária (Figura 8C), com pipeta de Pasteur. Foi separado 0,5 ml de sangue total de cada animal e acondicionado em tubo BD Vacutainer (K2E) 3.6 mg<sup>®</sup> contendo anticoagulante (EDTA). Após homogenização, durante 20 segundos, foi enviada para análise em aparelho Roche<sup>®</sup> (modelo SYSMEX KX 21N) com o escopo de fornecer os seguintes parâmetros hematológicos: quantificação da hemoglobina, quantificação de hematócrito, determinação de índices hematimétricos, contagem total de leucócitos e contagem de plaquetas.

Foi realizada, ainda, avaliação microscópica, de esfregaço sanguíneo em lâmina (método de coloração rápida de Field) para contagem diferencial e análise qualitativa de leucócitos (LEE et al, 1993).

#### Análise histopatológica das vísceras

Após a remoção de fragmento para o cultivo; os pulmões, baço, fígado e rim dos animais foram fixados em formalina tamponada a 10%, para análise histopatológica, após coloração com a técnica da hematoxilina-eosina. A extensão das lesões observadas na análise microscópica foi caracterizada em uma escala como se segue: (0) sem evidências de lesões ou de linfonodos agregados; (1) 20% de tecido afetado; (2) 20 a 40% de tecido afetado; (3) 40 a 60% de tecido afetado; (4) 60 a 80% de tecido afetado e (5) > 80% de tecido afetado (SHUBITZ et al, 2008).

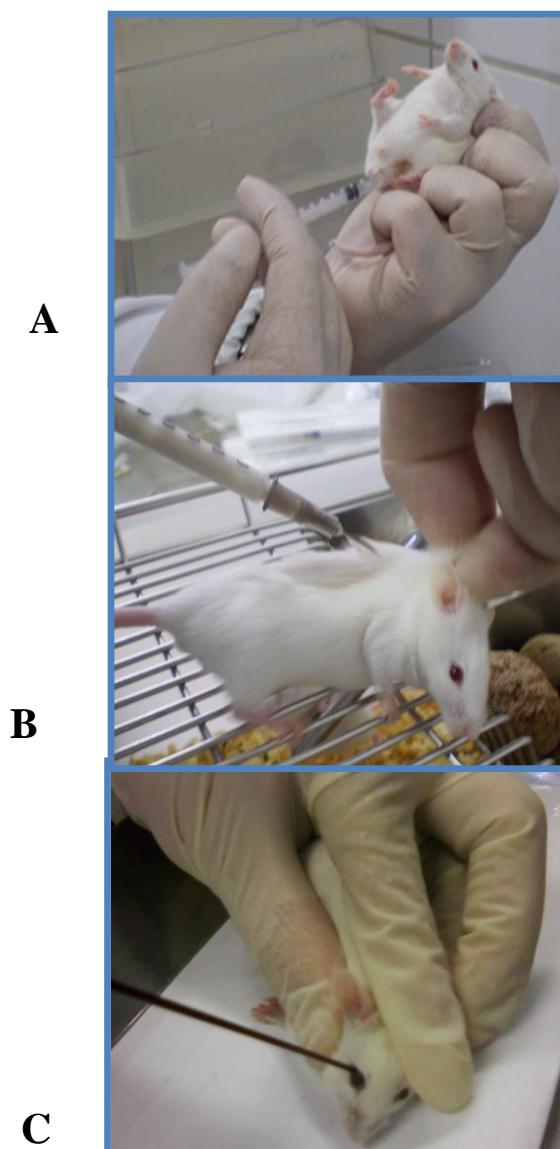


Figura 7 – Ensaio de imunoproteção em coccidiodomicose experimental:

A – Inoculação da cepa fúngica; B – Inoculação do antígeno; C – Punção retroorbitária  
(Fonte: Moreira Filho – 2012).

#### Dosagem de interleucinas no soro dos animais

Durante o procedimento da eutanásia, foi separado 0,5 ml de sangue total de cada camundongo, por meio de punção retrorbitária, com agulha estéril, para dosagem de citocinas. As amostras foram depositadas em microtubo de centrifuga e deixada por 15 min. a 37 °C. Em seguida, foram acondicionadas a 4°C, durante 1 h, com posterior remoção cuidadosa dos coágulos localizados nas laterais do microtubo. Foi, então, realizada centrifugação das amostras a 4000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. Logo após, transferiu-se o soro do microtubo centrifugado, por meio de pipeta, para um novo microtubo, estéril. O material foi identificado e armazenado a -20 °C. Foi, então, realizada dosagem sérica das seguintes citocinas: IL 6 (relacionada a resposta Th2), IL-12 e TNF $\alpha$  (relacionadas a resposta Th1), todas por meio de kit de ELISA, conforme protocolo do fabricante *eBioscience* (Mouse ELISA READY-SET-GO).

#### Análise estatística

Para a análise da diferença entre o peso inicial e o peso final dos camundongos foi construída a variável ganho de peso, por intermédio da razão entre o peso final e o peso inicial de cada camundongo. Para a análise da histopatologia foram inicialmente aplicados os valores médios das classificações dos percentuais de infecção. O teste utilizado para a comparação das variáveis: ganho de peso, dosagem de hemoglobina, contagem de leucócitos, contagem de linfócitos e macroscopia das vísceras, foi a ANOVA com a utilização *post hoc* por intermédio do teste LSD de Fisher, para as comparações múltiplas entre os grupos. Dado o reduzido tamanho amostral e a observação de diferenças pequenas entre os grupos, não foi realizado a análise da macroscopia. Para a análise das variáveis IL6, IL12 e TNF $\alpha$ , foi utilizado apenas a ANOVA.

## **ANEXO B**

### **MANIPULAÇÃO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO**

Conforme orientações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008b; BRASIL, 2005), destacam-se os seguintes cuidados frente a modelos de experimentação com animais.

I) Vias para administração de substâncias

= Via oral e gavage

A substância a ser testada é introduzida na cavidade oral ou no aparelho digestório por meio de um tubo no esôfago ou estômago. Para a maior parte das espécies, um tubo flexível (ou agulha) com a ponta arredondada é introduzido na boca do animal e gentilmente empurrado até o estômago. É necessário ser cauteloso para assegurar que o tubo não penetre, inadvertidamente, a traquéia. Os tubos utilizados para camundongos (4 cm) são menores do que para os ratos (8 cm de comprimento). O volume máximo para roedores é de 1mL de solução para cada 100 g de peso corporal. Não obstante, se a administração for de solução aquosa, o volume pode ser de até 2 mL para cada 100 g de peso corporal. Deve-se lembrar que os roedores ingerem alimento e água muitas vezes ao dia, e, assim, dificilmente estão com o estômago vazio. A distensão máxima do estômago ocorre ao final do período escuro. De outra forma, a quantidade mínima é observada no final do período claro. Nesse sentido, pequenos volumes devem ser administrados no início do período claro;

= Subcutânea (SC)

Nesta via, injeta-se a substância a ser testada sob a pele do animal, a qual deve ser levantada antes da aplicação. É realizada com agulha hipodérmica curta (25x5 mm ou mais fina), passando apenas pela derme, o mais próximo da superfície, formando uma pápula após a administração da substância. As áreas dorsolaterais do pescoço, ombro e flancos são as regiões de escolha. Trata-se de via que raramente induz dor e é realizada em animais conscientes. Antes de injetar a substância, deve-se aspirar exercendo uma leve pressão no êmbolo da seringa para assegurar que a agulha não esteja penetrando em um vaso sanguíneo;

= Intramuscular (IM)

Realizam-se injeções no músculo esquelético na forma de soluções oleosas ou suspensões. Os músculos de grande superfície, como os da porção posterior dos músculos posteriores, são preferenciais. Devem ser utilizadas agulhas de tamanho similar às das injeções subcutâneas. A profundidade da agulha, no tecido, deve ser de aproximadamente 5mm. Estruturas ósseas, nervos e vasos sanguíneos devem ser evitados. Antes de injetar, é oportuno assegurar-se que a agulha não está em um vaso sanguíneo, exercendo uma leve pressão de retirada no êmbolo da seringa. O tamanho da agulha utilizada costuma ser de 25x5 ou 25x7 mm ou mais fina, e o volume máximo, de 0,5 ml por sítio de administração em ratos e hamster e de 0,3 ml em camundongos;

= Endovenosa

Nesta via, administra-se, a substância a ser testada, diretamente na corrente sanguínea, em regra, por meio de vasos venosos superficiais. As soluções a serem aplicadas não devem ser irritantes e o veículo deve ser do tipo aquoso. A veia da cauda é o vaso sanguíneo de escolha em camundongos não-anestesiados; entretanto, sua perfuração requer habilidade e treinamento. O movimento do animal também pode ser contido dentro de um pequeno recipiente a fim de facilitar a administração. A visualização da veia é facilitada por procedimentos, a exemplo da imersão da cauda em água quente a 40-50 °C por alguns segundos ou pela proximidade de uma lâmpada quente;

= Intraperitoneal

Trata-se da via mais utilizada na experimentação com roedores. A substância é injetada na cavidade peritoneal, entre os órgãos abdominais. Comumente, injeta-se na metade inferior do abdome com o animal contido pelo dorso. O tamanho das agulhas utilizado frequentemente é o 25x5 ou 25x7 mm. A imobilização adequada é condição *sine qua non* para o sucesso desta via.

## II) Anestesia

Eventualmente, para a adequada manipulação do animal, necessita-se, por questões de melhor manejo, submetê-lo à anestesia. Deve-se anestésicar sempre que o procedimento implique em dor ou desconforto dos animais. Entretanto, não serão necessários anestésicos ou analgésicos em procedimentos que incluem administração de fluidos, imunização, medicação oral ou coleta de sangue (exceto se intracardíaca ou periorbital).

## III) Coleta de sangue ou sangria

Diversos estudos necessitam que seja realizada coleta de sangue para verificar alterações hematológicas ou outros parâmetros necessários ao entendimento, avaliação e conclusão da pesquisa.

O pesquisador deve ter a consciência de que essa coleta representa, em diferentes graus, um estresse para o animal, seja pelo procedimento *per si* ou pelo uso de anestésicos. Também é altamente recomendável que o operador seja treinado e tenha conhecimento da anatomia do animal, de forma a localizar o vaso correto definido pelo protocolo, de maneira rápida e precisa. É importante que os métodos sejam refinados a fim de que se necessite coletar apenas pequenos volumes de sangue. Entretanto, há situações onde o pequeno tamanho dos animais influencia no volume ou frequência da coleta. Neste caso, deve-se evitar colocar em risco o bem estar dos animais ou usar um número maior dos mesmos.

Em coletas de sangue com volume até 0,1 mL, procura-se puncionar uma veia superficial. Em geral, não necessita anestesia, uma vez que, esta submeteria o animal a um estresse maior do que o causado pelo uso de uma agulha, por exemplo. Em geral, pequenos animais podem ser sangrados pela veia caudal (coccígea). Camundongos, ao contrário dos ratos, podem ter a extremidade da cauda amputada para coleta de sangue, uma vez que, não oferece risco de eliminação de vértebra. Recomenda-se o corte na cauda, no máximo, duas vezes. Como alternativa, pode-se retirar o tampão cicatricial para nova coleta. Pequenos animais sem cauda (cobaias e *hamsters*) podem ter o sangue coletado pela veia jugular ou da orelha, sendo que esta última necessita de grande habilidade. Em animais grandes se utiliza veias superficiais.

Tratando-se de coletas de sangue com volumes acima de 0,1 mL, comumente se consegue coletar, em animais maiores, sem o uso de anestesia. Entretanto, em animais menores, uma anestesia de curta duração pode ser necessária, sempre levando em consideração que seu uso poderá afetar parâmetros hematológicos ou bioquímicos. Deve-se ter especial atenção ao calibre da agulha, pois, um calibre pequeno pode provocar coagulação e um calibre maior pode danificar o vaso. Em alguns casos, a dilatação do vaso por obstrução suave ou aquecimento poderá facilitar a coleta.

A coleta pelo plexo orbital somente é recomendada quando não há a recuperação do animal. Coletas repetidas por esta via somente é justificável quando não for possível o uso de outro método. Quanto à punção cardíaca, deverá sempre ser realizada sob anestesia. Quando se aplica este procedimento com fim terminal, deverá se assegurar o óbito pós-exsanguinação pela administração de uma sobredose de anestésico. A punção cardíaca repetida não é recomendada, mas, se necessária, deverá ser cuidadosamente justificada em função de seus efeitos adversos. Neste último caso, deverá se preferir a canulação de longa duração.

#### IV) Eutanásia

É considerada a forma correta de interromper procedimentos experimentais quando é detectado qualquer tipo de reação adversa, ou ao final de uma experimentação, mesmo que bem sucedida. Pelas normas éticas, a não ser em casos específicos e excepcionais, animais não devem ser reutilizados.

Evitar o sofrimento, minimizar o desconforto e dor durante qualquer procedimento envolvendo o uso de animais em experimentação é um compromisso do pesquisador. A determinação do momento da eutanásia deve levar em consideração o protocolo experimental e o bem-estar do animal. A escolha dos protocolos deve contemplar o maior benefício, o melhor resultado, com a utilização do menor número de animais possível.



Os critérios primários para a eutanásia em termos de bem-estar animal são:

- Utilização de métodos sem dor;
- Os animais devem atingir rápido estado de inconsciência e morte;
- Requerer um mínimo de contenção, e evitar a excitabilidade do animal;
- Adequado para a idade e estado de saúde do animal em questão;
- Causar um mínimo de sofrimento e estresse;
- Simples de administrar;
- Seguro para o operador;
- Deve ser realizada distante de outros animais.

A eutanásia costuma ser realizada por várias razões, entre elas:

- Conclusão do experimento;
- Obtenção de material como sangue e outros tecidos para fins científicos;
- Quando os níveis de estresse e sofrimento do animal excedem o previsto;
- Quando os animais não estão mais aptos à reprodução;
- Quando os animais apresentando características não desejáveis ao biotério.

São considerados duas categorias de técnicas para a eutanásia de animais em experimentação: métodos físicos e métodos químicos.

I) Métodos físicos: utilizados somente quando não puderem ser utilizados métodos químicos, sendo possível a utilização de uma das técnicas infradescritas.

I.a) Deslocamento cervical: utilizado em roedores com menos de 150 g. Deve ser evitado em hamsters e cobaias, devido ao pescoço curto, musculatura forte e pele solta na região do pescoço e ombros, o que dificulta a realização adequada da técnica. Roedores maiores devem ser sedados antes do deslocamento. Trata-se de uma manobra rápida, que, em frações de segundos leva o animal a perda total de sensibilidade devido ao rompimento da medula espinhal e a morte. É indicado somente quando a adoção de outros métodos possa invalidar o resultado final de determinado experimento e somente deve ser realizada por pessoal treinado. Para roedores de laboratório, o animal deve ser apoiado sobre uma superfície na qual ele possa se agarrar, propiciando maior firmeza na realização da eutanásia. O

deslocamento cervical consiste em segurar a cauda do animal com uma das mãos (pela base) e com a outra apoiar uma pinça cirúrgica, ou objeto similar, transversalmente sobre sua região cervical. A seguir, pressiona-se firmemente a pinça para baixo e para frente, empurrando a cabeça do animal, enquanto que, simultaneamente, traciona-se a cauda em sentido oposto, para trás. Durante alguns segundos pode-se ainda detectar alguma atividade muscular, todavia tratam-se de movimentos reflexos, pois a perda total de sensação dolorosa e a morte são imediatas;

I.b) Decapitação: neste método não é recomendada anestesia prévia, uma vez que, envolve maior manipulação e mais estresse para o animal. Deve ser utilizado material específico, a exemplo da guilhotina. Destaque-se que o sangue coletado após a decapitação, com frequência, apresenta-se contaminado por secreções salivares e respiratórias;

I.c) Congelamento rápido: executa-se colocando o animal rapidamente no nitrogênio líquido. Deve ser utilizado somente para fetos e pequenos neonatos (< 4g). Animais maiores não morrerão imediatamente;

1. Exsanguinação: realizada por meio de punção cardíaca ou de vasos sanguíneos de grande calibre, é frequentemente utilizada para a obtenção de soro hiperimune de roedores e coelhos, os quais devem ser previamente sedados ou anestesiados, pois pode-se observar inquietação associada a hipovolemia;

I.e) Eletrocussão: produz depressão cerebral direta e parada cárdiorrespiratória imediata, se usada na dosagem correta - que pode variar com a espécie do animal, idade, peso etc. No entanto, comumente vem acompanhada de contrações musculares involuntárias. Devido à dificuldade de execução e ao efeito adverso observado este método não é indicado em nosso meio.

II. Métodos químicos: não causam trauma aparente ao animal e são realizados por meio do uso de agentes farmacológicos inalantes e não-inalantes.

#### II.a) Agentes inalantes

Éter e clorofórmio: deve-se cuidar para que os animais não entrem em contato direto com o produto químico, uma vez que, no estado líquido, são irritantes. O roedor é colocado em uma câmara, com gaze ou algodão embebido com o inalante. O clorofórmio apresenta efeitos tóxicos para o fígado, rins e gônadas masculinas dos animais e é carcinogênico para humanos. O éter é irritante para as mucosas e em altas concentrações pode ser estressante para os animais, além de requerer cuidado para o operador em virtude de suas propriedades explosivas;

Halotano, enflurano e isoflurano: atuam deprimindo os sistemas respiratório e cardiovascular. Induzem a anestesia e subsequente morte. Embora onerosos, são todos agentes

aceitáveis quando utilizados com o equipamento apropriado, para evitar o desperdício e a contaminação do ambiente.

Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>): é o mais recomendado para pequenos roedores de laboratório entre os inalantes, principalmente para grande quantidade de animais, pois é baixo custo, não inflamável e não explosivo, desde que aplicado com equipamento apropriado. É recomendado o uso de 70% de CO<sub>2</sub> no oxigênio ou ar para a rápida perda de consciência, sem hipóxia. Isto resulta em rápida anestesia, seguida por morte, com efeitos reduzidos quanto à irritação das vias aéreas. Somente CO<sub>2</sub> disponível comercialmente em cilindros deve ser utilizado. Possui rápida ação letal por provocar depressão do sistema nervoso central, mas ainda assim, após detecção de parada respiratória, recomenda-se manter os animais na câmara por mais de 10 minutos, para confirmação de sua morte.

Monóxido de carbono (CO): embora seja método relativamente rápido e humano para ser utilizado em roedores, em virtude do perigo para o operador, deve ser utilizado com extremo cuidado. Deve ser utilizado somente o gás comercializado em cilindros e com o equipamento adequado. Os roedores devem ser colocados em contêineres previamente vaporizados com 6% de CO;

#### II.b) Agentes injetáveis

Em animais onde há dificuldades na punção venosa, é preferível a injeção intraperitoneal. Entretanto, por esse método, o anestésico leva mais tempo para agir e pode causar irritação peritonias. Injeções intracardíacas e intrapulmonares não devem ser realizadas, a menos que o animal esteja anestesiado.

Pentobarbital sódico: injetado via intravenosa ou intraperitoneal age rapidamente e é uma forma aceitável de eutanásia. Os pesquisadores devem ser treinados no método de injeção. Esta droga pode causar irritação do peritônio, o que pode ser evitado pela diluição. Para a realização da eutanásia é recomendada a utilização de três vezes a dose anestésica. Para a eutanásia de ratos e hamsters o pentobarbital pode ser administrado por via intraperitoneal, na dose de 100 mg/Kg e 80-150 mg/Kg, respectivamente, ao passo que, para coelhos, é utilizado na dose de 200 mg/Kg, por via intravenosa.

Quetamina: não é um método aceitável quando utilizada como droga única. Em combinação com outras drogas (xilazina, benzodiazepínicos), torna-se apropriada para a eutanásia.

## RESULTADOS

### Análise bioquímica do antígeno protéico extraído

#### Conteúdo protéico do antígenos extraído

Após extração do antígeno da cepa fúngica, foi verificado seu teor protéico, por meio da técnica descrita por Bradford. Esta revelou que o antígeno extraído se apresentava com concentração protéica de 54,5 µg /100 µl.

#### Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE)

A amostra antigênica foi submetida à eletroforese SDS-PAGE e 2D-PAGE. As eletroforeses realizadas mostraram que o antígeno, extraído com sulfato de amônia, produziu perfis de proteínas distintas, com vários *spots* protéicos, observados no gel 2D (Figura 9B). Por seu turno, entre as bandas detectadas no SDS-PAGE, duas foram bem delimitadas nas faixas de 45-67 kDa e 67-97 kDa (Figura 9A).

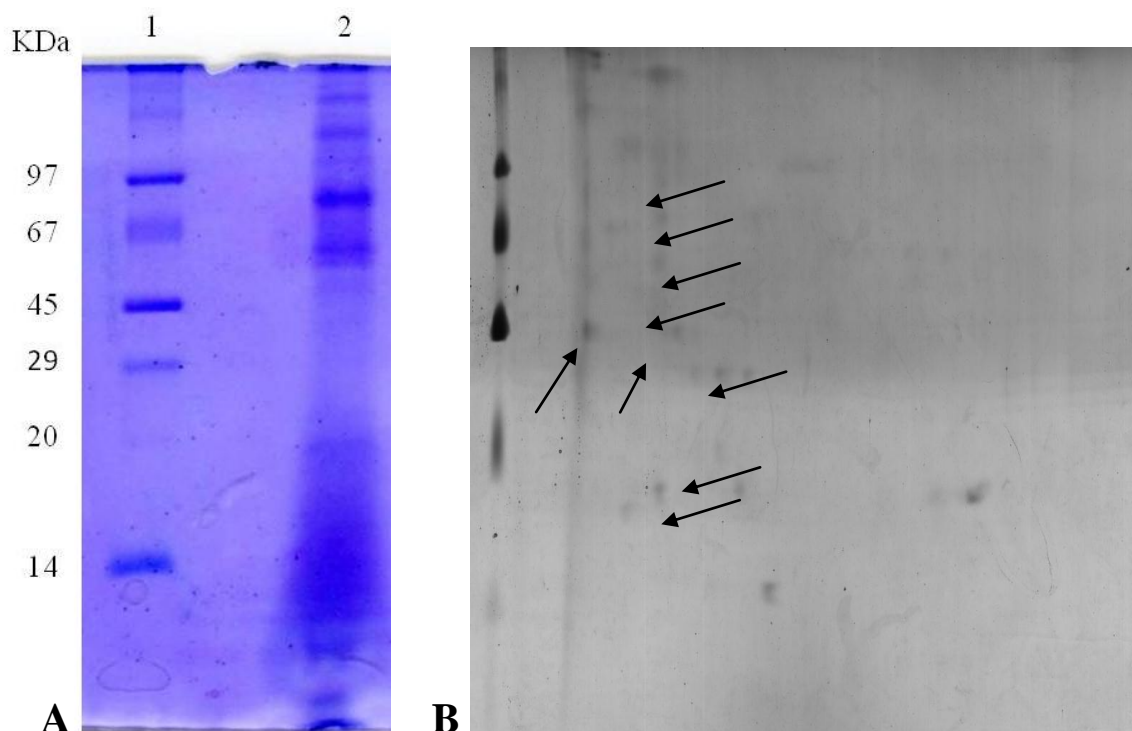


Figura 8 – Eletroforeses do antígeno protéico extraído:

A – SDS-PAGE: Raia 1 – Marcadores de massa molecular (fosforilase b – 97,0 kDa; albumina sérica bovina – 67,0 kDa; albumina do ovo – 45,0 kDa; anidrase carbônica – 29,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz – 20,1 kDa e  $\alpha$ -lactoalbumina – 14,2 kDa). Raia 2 – antígeno protéico extraído;

B – 2D-PAGE (pH 4-7): as setas apontam diversos *spots* protéicos visibilizados.

(Fonte: Moreira Filho – 2012).

## Detecção de proteases por zimograma e detecção de glicoproteínas

O antígeno extraído foi analisado quanto a presença de proteases através de zimograma, bem como, quanto a presença de glicoproteínas com realização de eletroforeses unidimensionais. Foram detectadas a presença de discretas bandas de glicoproteínas e banda forte de proteases no gel avaliado (Figura 10).

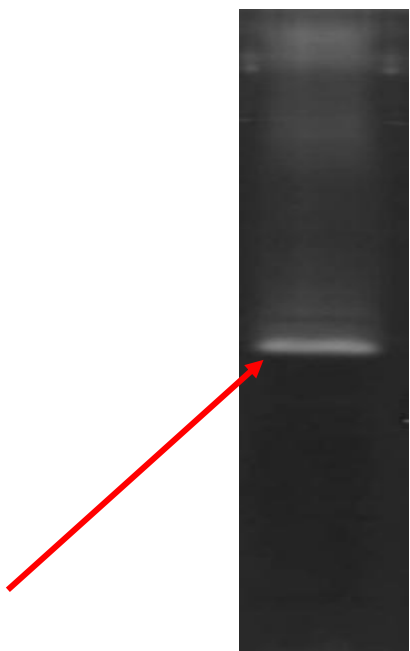


Figura 9 – Eletroforese unidimensional demonstrando a presença de banda de proteases no antígeno extraído (Fonte: Moreira Filho – 2012).

## Determinação do sequenciamento N-terminal

Após nova eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), o antígeno extraído revelou a presença de várias bandas protéicas. Entre as bandas protéicas detectadas, duas delas, localizadas nas faixas de 45-67 kDa e 67-97 kDa, apresentaram-se melhor definidas e intensas, as quais foram designadas de banda 45-67 kDa e banda 67-97 kDa, respectivamente. A sequência de aminoácidos N-terminal da banda 45-67 kDa foi AGKLGFALGVKNADGSKS, enquanto a da banda 67-97 kDa foi NAHYVLAIVALGWRG (Tabela 1). As sequências obtidas foram submetidas ao alinhamento automático através do sistema NCBI-BLAST, tendo sido encontrada 100% de similaridade das bandas 45-67 kDa e 67-97 kDa com uma  $\beta$ -glucosidase e com uma glutamina sintetase, respectivamente, de *Coccidioides posadasii*.

Tabela 1

Comparação das sequências de aminoácidos N-terminal das bandas 45-67 kDa e 67-97 kDa presentes no antígeno extraído com sequências protéicas similares

Proteína	Espécie	Sequência de aminoácidos
Banda 45-67 kDa (no presente estudo)	<i>Coccidioides posadasii</i>	<sup>1</sup> AGKLG FALGVKNADGSCKS <sup>19</sup>
β-Glucosidase*	<i>Coccidioides posadasii</i>	<sup>20</sup> AGKLG FALGVKNADGSCKS <sup>38</sup>
Banda 67-97 kDa (no presente estudo)	<i>Coccidioides posadasii</i>	<sup>1</sup> NAHYVLAAIVALGWRG <sup>16</sup>
Glutamina sintetase*	<i>Coccidioides posadasii</i>	<sup>403</sup> NAHYVLAAIVALGWRG <sup>418</sup>

Fonte: NCBI Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Avaliação da imunorreatividade antigênica pela técnica de imunodifusão radial dupla (Ouchterlony)

O antígeno protéico foi testado, por imunodifusão radial dupla, frente a soros de pacientes com coccidioidomicose, histoplasmose e paracoccidioidomicose. Todos os soros de portadores de coccidioidomicose foram reconhecidos pelo antígeno extraído. Os soros de portadores das demais micoses profundas avaliadas, não demonstraram reatividade frente ao antígeno testado (Figura 11).

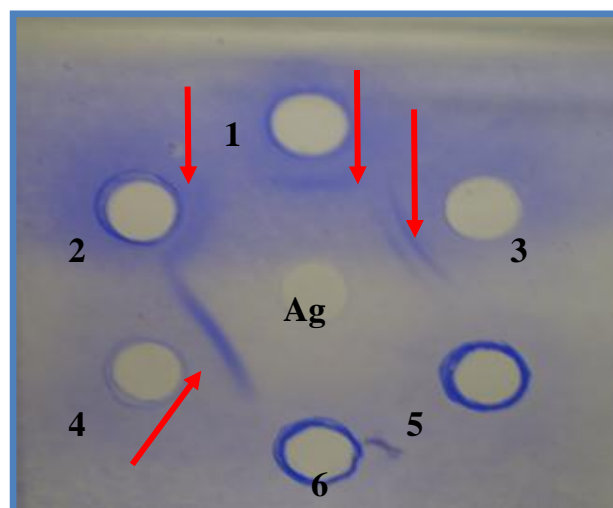


Figura 10 - Imunodifusão radial dupla (Ouchterlony) do antígeno extraído: Ag - antígeno extraído; 1, 2, 3 e 4 – Soro de portadores de coccidioidomicose; 5- Soro de portador de histoplasmose ; 6 – Soro de portador de paracoccidioidomicose. Observar reação positiva nas linhas de precipitação, indicadas pelas setas em vermelho.

### **Análise laboratorial frente aos casos humanos de coccidioidomicose**

### Avaliação microbiológica

No exame micológico direto, realizado no escarro dos dois casos clínicos iniciais, foi evidenciada a presença de esférulas, de parede celular espessa, forma cilíndrica, com liberação, por fragmentação e ruptura da parede celular, de endósporos. No cultivo das amostras provenientes dos três casos clínicos iniciais, em meio ágar-batata, observou-se formação de colônias inicialmente úmidas e glabras, tornando-se, rapidamente, cotonosas, brancas e creme, com variação quanto à textura.

### Avaliação imunológica

Na imunodifusão radial dupla, utilizando-se o soro dos cinco partícipes da última caçada, foi possível obter positividade em quatro dos soros utilizados. Em um dos membros do grupo, não foi observada precipitação, sendo considerada, portanto, reação negativa. Da mesma forma, constatou-se negatividade no soro do cão que acompanhou o grupo durante as caçadas. Nos demais caçadores de tatu da região, sem queixas clínicas e sem história de participação na última caçada, não foram observadas reações positivas nos soros testados.

### Extração do DNA e identificação molecular das cepas isoladas dos casos clínicos

Após a adequada extração do DNA, foram confirmadas, pela análise da PCR, que todas as cepas se tratavam de *Coccidioides posadasii*.

### Análise do solo

A análise por meio da imunodifusão radial dupla, dos soros dos camundongos com inoculação intraperitoneal do solo da toca do tatu, frente ao antígeno de *Coccidioides* sp produzido pela Immy Imunodiagnosics®, não demonstrou positividade em qualquer das amostras coletadas.

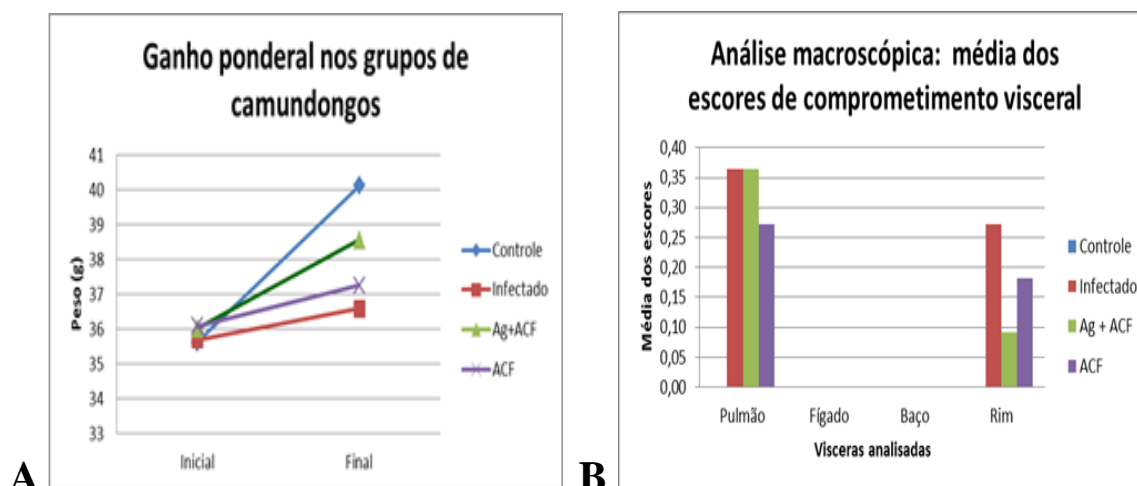
Após análise, por microscopia óptica em aumento de 10X e 40X, das lâminas contendo cortes histológicos das vísceras removidas dos camundongos e coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina, Grocott, PAS e tricômica de Masson, foi observado: hiperemia ativa vascular associada à exsudação neutrofílica abundante, presença de granulócitos íntegros e desintegrados, além de áreas irregulares de necrose, características de processo inflamatório agudo, sem evidência da presença de microrganismos fúngicos.

### **Ensaio de imunoproteção em coccidioidomicose experimental**

## Pesagem dos animais e análise macroscópica das vísceras

O grupo 1, não infectado, apresentou média de peso final 0,4 g superior aos grupos infectados. Entre os inoculados com a cepa fúngica, o grupo 2 apresentou comprometimento ponderal, média de 0,2 g, inferior aos demais grupos infectados (Gráfico 1A).

No que concerne ao comprometimento macroscópico das vísceras analisadas, o escore máximo de comprometimento em todos os grupos infectados foi 1, é dizer, presença de 1 a 2 granulomas (Gráfico 1A)(Figura 12). Foi observado menor comprometimento no grupo 3 (4 animais com 1 granuloma, em pelo menos uma víscera) e no grupo 4 (5 animais com 1 granuloma em pelo menos uma víscera) do que no grupo 2 (7 animais com 1 granuloma em pelo menos uma víscera) (Gráfico 1B).



Controle: camundongos não infectados e não imunizados

Infectado: camundongos infectados e não imunizados

Ag + ACF: camundongos infectados e imunizados com o antígeno extraído e Adjuvante Completo de Freund

ACF: camundongos infectados e imunizados com Adjuvante Completo de Freund

Gráfico 1 – Peso e macroscopia visceral nos grupos experimentais. (A) Pesagem dos animais, em gramas, no início e no final do experimento; (B) Análise da média de comprometimento macroscópico das vísceras, conforme escores de infecção do órgão.

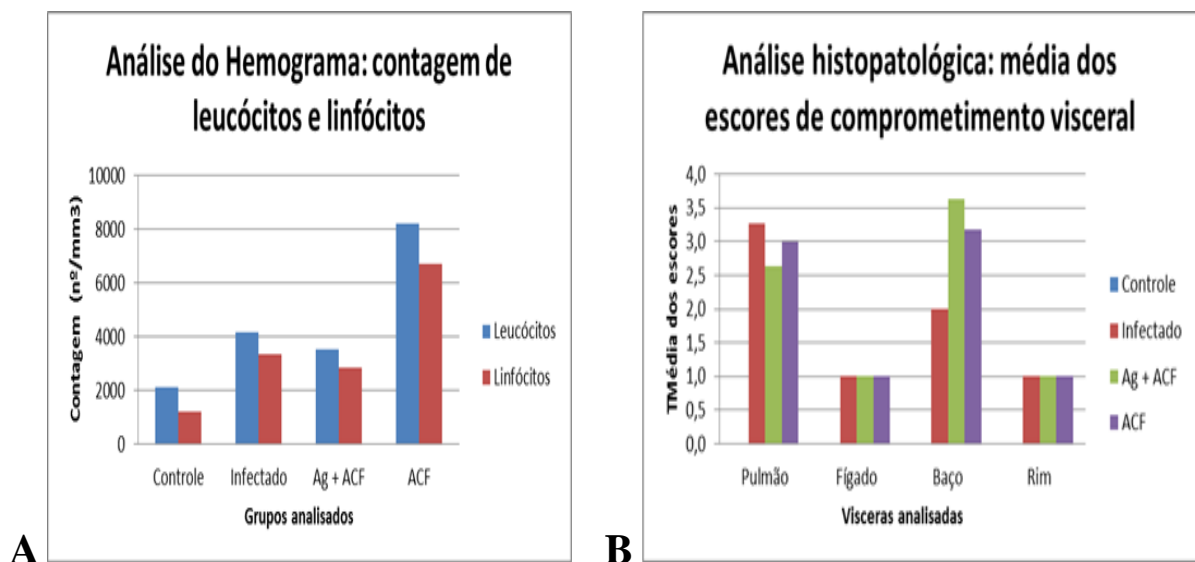
Hemograma completo



Quanto à análise dos hemogramas, a série branca foi a que demonstrou maiores diferenças entre os grupos. Destaca-se a contagem total de leucócitos entre o grupo 3 (que variou de 1800 a 6700/mm<sup>3</sup>) e o grupo 4 (com variação de 2700 a 19200/mm<sup>3</sup>)(Gráfico 2A).

#### Análise histopatológica das vísceras

O maior comprometimento foi observado nos pulmões do grupo 2, infectado, sem antígeno ou adjuvante (escore 3 e 4, em 7 e 4 animais, respectivamente) (Figura 12). O grupo 3, infectado, na presença de antígeno e adjuvante apresentou menores alterações pulmonares que os grupos 2 e 4 (escore 3 em 7 animais e 2, em 4 animais). A análise do baço do grupo 3 também revelou maior estímulo linfóide que nos grupo 2 e 4 (Gráfico 2B). Não foram observadas diferenças histopatológicas significativas no acometimento de rins e fígado entre os grupos.



Controle: camundongos não infectados e não imunizados

Infectado: camundongos infectados e não imunizados

Ag + ACF: camundongos infectados e imunizados com o antígeno extraído e Adjuvante Completo de Freund

ACF: camundongos infectados e imunizados com Adjuvante Completo de Freund

Gráfico 2 – Hemogramas e análise histopatológica nos grupos experimentais. (A) Hemograma: contagem média de leucócitos (LEU) e de linfócitos (LINF) por mm<sup>3</sup> em cada grupo observado; (B) Análise histopatológica das vísceras, conforme média de escores de lesão tecidual promovida.

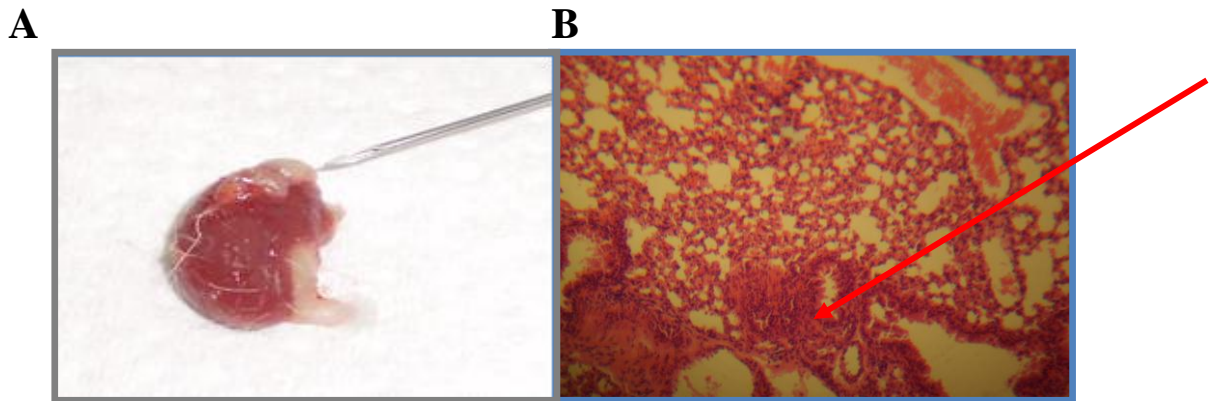
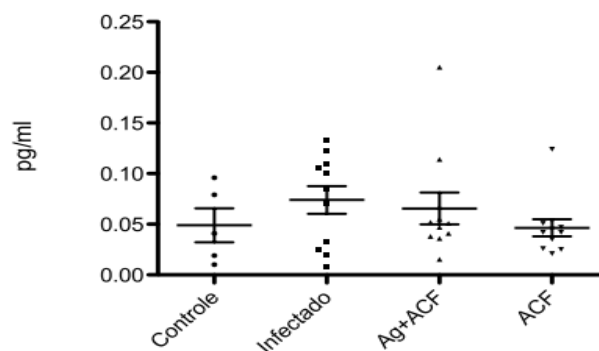


Figura 11 – Aspecto macroscópico e histopatológico de vísceras dos camundongos infectados (grupo 2). (A) granulomas renais; (B) histopatologia do tecido pulmonar revelando infiltrados inflamatórios, microhemorragia e necrose focal, na coloração de hematoxilina-eosina (Aumento original – 100X).

### Dosagem de interleucinas no soro dos animais

No que concerne a dosagem sérica de IL-6, foram observadas variações: grupo 1 (2,7 a 31,19 pg/ml), grupo 2 (2,1 a 44,1 pg/ml), grupo 3 (10,9 a 69,9 pg/ml) e grupo 4 (6,1 a 40,9 pg/ml). Quanto a dosagem sérica de TNF $\alpha$ , foram verificados os seguintes resultados: grupo 1 (1,4 a 2,8 pg/ml), grupo 2 (1 a 2,6 pg/ml), grupo 3 (1,1 a 2,4 pg/ml) e grupo 4 (1 a 4,6 pg/ml). A dosagem de IL-12, por seu turno, demonstrou o seguinte: grupo 1 (1,7 e 2,5 pg/ml), grupo 2 (1,1 a 2 pg/ml), grupo 3 (1 a 3,4 pg/ml) e grupo 4 (0,9 a 1,6 pg/ml).

IL-6 sérica em camundongos infectados com *C. posadasii* e/ou imunizados com o antígeno proteico extraído deste fungo.



Controle: camundongos não infectados e não imunizados

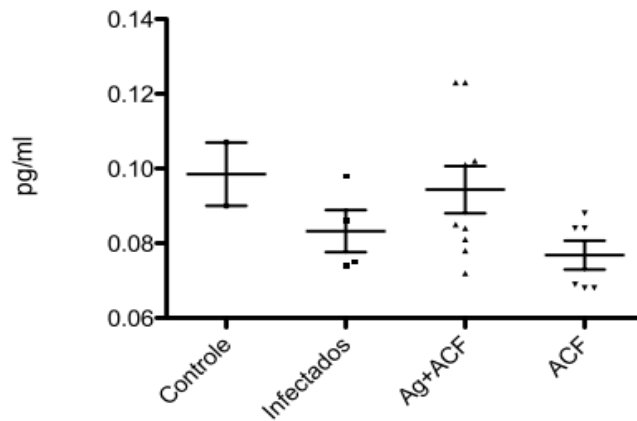
Infectado: camundongos infectados e não imunizados

Ag + ACF: camundongos infectados e imunizados com o antígeno extraído e Adjuvante Completo de Freund

ACF: camundongos infectados e imunizados com Adjuvante Completo de Freund

Gráfico 3: Dosagem da concentração sérica de IL-6 nos grupos de camundongos

IL-12 sérica em camundongos infectados com *C. posadasii* e/ou imunizados com o antígeno proteico extraído deste fungo.



Controle: camundongos não infectados e não imunizados

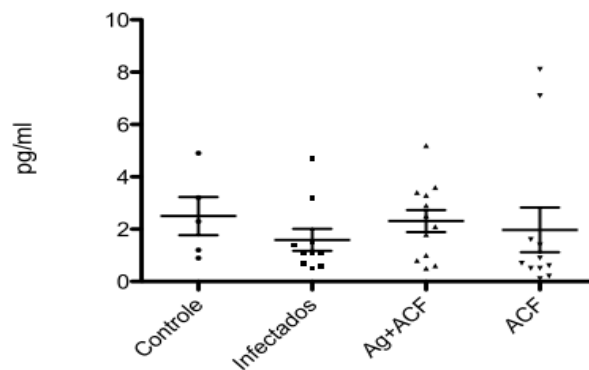
Infectado: camundongos infectados e não imunizados

Ag + ACF: camundongos infectados e imunizados com o antígeno extraído e Adjuvante Completo de Freund

ACF: camundongos infectados e imunizados com Adjuvante Completo de Freund

Gráfico 4: Dosagem da concentração sérica de IL-12 nos grupos de camundongos

TNF-alfa sérico em camundongos infectados com *C. posadasii* e/ou imunizados com o antígeno protéico extraído do fungo.



Controle: camundongos não infectados e não imunizados

Infectado: camundongos infectados e não imunizados

Ag + ACF: camundongos infectados e imunizados com o antígeno extraído e Adjuvante Completo de Freund

ACF: camundongos infectados e imunizados com Adjuvante Completo de Freund

Gráfico 5: Dosagem da concentração sérica de TNF-α nos grupos de camundongos

## Análise estatística

Em face dos parâmetros analisados, há ganho de peso maior entre o grupo sem infecção do que os demais ( $p=0,0000$ ). O ganho de peso é maior no grupo que recebeu o antígeno e adjuvante de Freund (AF), do que o grupo que recebeu somente o AF ( $p=0,0004$ ), assim como do grupo somente infectado ( $p=0,0000$ ). Quanto a análise macroscópica, dado o reduzido tamanho amostral, não há diferença significativa na presença de granulomas, nas vísceras analisadas, quando são comparados os grupos.

No que concerne a análise histopatológica, há um maior percentual de infecção no pulmão quando comparado o grupo somente infectado com todos os demais grupos infectados ( $p=0,0000$ ). No pulmão, há um menor percentual de infecção no grupo que utilizou o antígeno, tanto na comparação com os infectados ( $p=0,0003$ ) como com a comparação com o grupo que utilizou somente o AF ( $p=0,0285$ ), não havendo diferença significativa na comparação entre o grupo de infectados e o que utilizou somente o adjuvante ( $p=0,0954$ ). Há um maior percentual de estímulo linfóide no baço quando comparado o grupo infectado com todos os demais grupos ( $p=0,0000$ ), sendo o percentual menor no grupo somente infectado. No fígado e nos rins, não há diferença significativa na comparação entre os grupos.

Quanto ao hemograma completo, há uma maior concentração de hemoglobina no grupo que utilizou somente o AF do que no grupo somente infectado ( $p=0,0014$ ), não sendo constatadas diferenças significativas nas demais comparações entre os grupos. Há uma maior contagem de leucócitos totais no grupo que utilizou somente o adjuvante do que no grupo sem infecção ( $p=0,0000$ ), assim como no grupo somente infectado ( $p=0,0025$ ), não sendo constatadas diferenças significativas nas demais comparações entre os grupos. Há uma menor contagem de linfócitos quando comparado o grupo sem infecção com todos os demais grupos ( $p=0,0000$ ), não sendo constatadas diferenças significativas nas demais comparações entre os grupos.

Ao avaliar-se as concentrações séricas de IL-6, IL-12 e TNF $\alpha$ , por meio de ELISA, não foi observada diferença significativa entre os grupos analisados, embora se observe uma tendência ao efeito imunoprotetor.

## CONCLUSÃO

Na presente pesquisa, demonstra-se:

As principais bandas imunorreativas do antígeno *in-house* revelaram tratar-se de uma  $\beta$ -glicosidase e uma glutamina sintetase, apresentando-se como possível ferramenta, célere e de baixo custo, sem o risco da manipulação direta do microrganismo;

A coccidioidomicose, não raras vezes, é tratada, inicialmente, como uma pneumonia bacteriana comunitária. Sendo assim, a descrição de casos contribui para a difusão do diagnóstico precoce da coccidioidomicose e requer investigações laboratoriais complementares;

O antígeno *in-house* de *Coccidioides* sp tende a estimular a resposta celular do hospedeiro, em modelo murino, o que aponta que estudos devem continuar a serem conduzidos a fim de estabelecer a possível aplicação no hospedeiro humano.

---

## **APÊNDICES**

---

## APÊNDICE A



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 77/09, sobre o projeto intitulado: **“ANÁLISE DA VIRULÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA DE ISOLADO CLÍNICA DE COCCIDIOIDES POSADASIP”**, de responsabilidade de Renato Evando Moreira Filho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 03 de setembro de 2009.

Fortaleza, 04 de setembro de 2009.

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

## APÊNDICE B



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ  
SECRETARIA DA SAÚDE

HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS (1970-2010)  
40 anos promovendo a saúde e valorizando a vida



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP-HSJ)

PROTOCOLO: 022/2011

C.A.A.E. – 0004.0.040.042-11

TÍTULO DO PROJETO: "Coccidioidomicose: microepidemia no estado do Ceará, Brasil- aspectos diagnósticos e epidemiológicos"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Renato Evandro Moreira Filho †

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS: Hospital São José de Doenças Infecciosas – HSJ  
Universidade Federal do Ceará - UFC

### PARECER CONSUBSTANCIADO

Analizamos o projeto em questão na reunião ordinária de 17 de outubro de 2011 e entendemos que as pendências elencadas pelo parecer CEP/HSJ datado em 20 de setembro do corrente ano foram todas resolvidas, diante do exposto, julgamos que o protocolo está apto para ser iniciado.

### CONCLUSÃO: APROVADO.

Lembramos a necessidade do envio de relatório anual do andamento do projeto e de relatório final quando de sua conclusão, além de que qualquer mudança na proposta do estudo, deverá passar por uma prévia avaliação deste comitê. Outrossim, comunicamos que, mensalmente, o CEP-HSJ está monitorando pesquisas em execução no Hospital São José de Doenças Infecciosas escolhidas aleatoriamente.

Fortaleza, 21 de outubro 2011.

Dr. Robério Dias Leite

Coordenador do CEP/HSJ