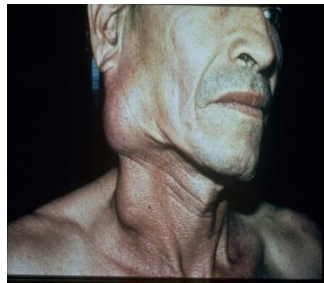
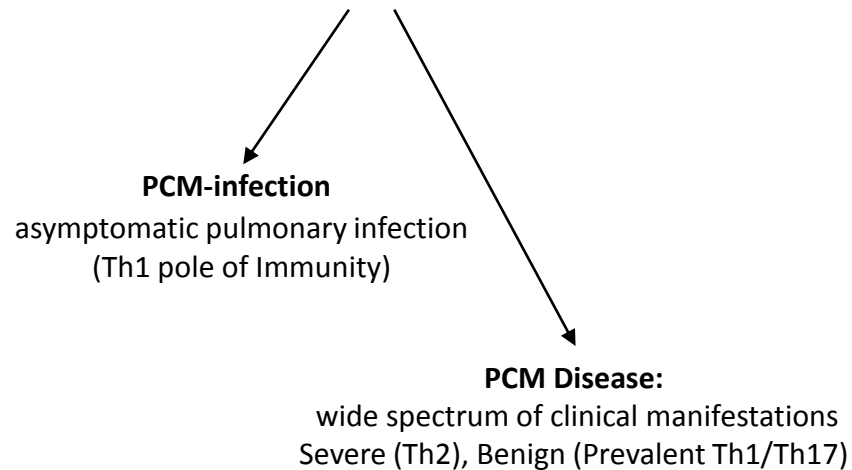


PARACOCCIDIOIDOMICOSE

PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS (Adolpho Lutz, 1908)

Paracoccidioides brasiliensis
Paracoccidioides lutzii



Lymphatic
Disseminated Form



Cutaneous Lesion



Cutaneous
Disseminated Lesions

Paracoccidioides brasiliensis



Forma filamentosa: 25°C
Levedura: 35-37°C



Levedura com brotamentos
em roda de leme (escarro)

- PARACOCCIDIOIDOMICOSE:
 - PCM
 - Pb micose
 - Blastomicose Sul Americana

Quadro 1 Principais infecções micóticas que acometem os seres humanos no Brasil

MICOSES	
CLÁSSICAS	OPORTUNISTAS
– Superficiais • Pitiríase versicolor – Cutâneas • Dermatofitoses – Subcutâneas • Cromomicose, esporotricose – Profundas • Paracoccidioidomicose, Histoplamose	• Superficiais – Candidíases – Dermatomicoses • Invasivas - Candidemia - Criptococose - Aspergilose - Fusariose - Zigomicoses - Outras hialohifomicoses - Feohifomicoses

Regiões endêmicas:

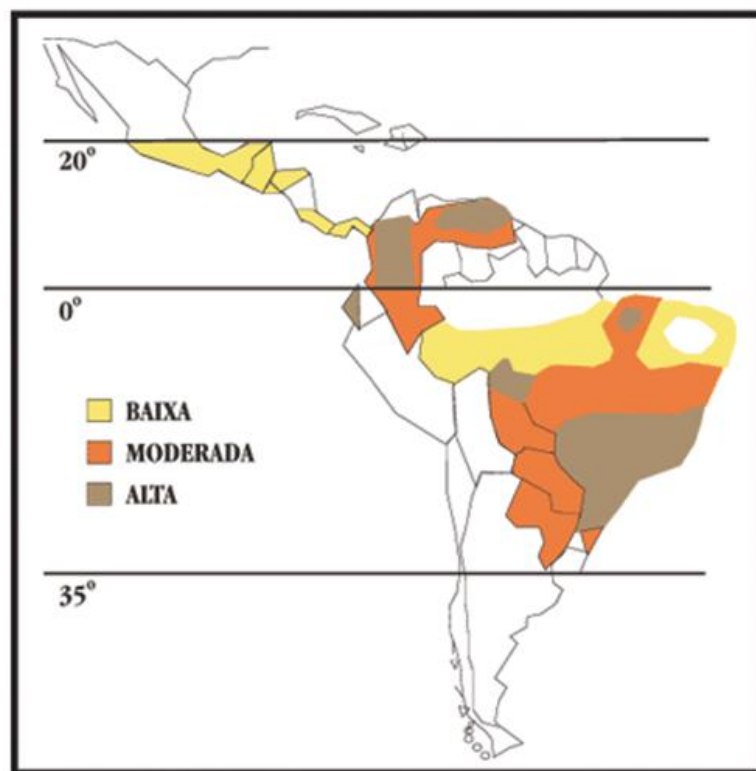


Figura 1 - Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose.

Tabela 1. Distribuição de frequência de hospitalizações devido a PCM, média anual, taxa de internação, as mortes hospitalares e da mortalidade de acordo com as regiões geográficas e dos Estados da residência. Brasil (1998-2006).

Region/State of residence	Total	Annual mean	Hospitalization rate	Hospital death	Hospital mortality
North	735	82	6,1	31	4,2
Rondônia	256	28	20	14	5,5
Acre	88	10	16,5	6	6,8
Amazonas	6	1	0,2	0	0
Roraima	12	1	3,9	2	16,7
Pará	286	32	4,9	7	2,4
Amapá	1	0	0,2	0	0
Tocantins	86	10	7,9	2	2,3
Northeast	687	76	1,6	19	2,8
Maranhão	359	40	6,9	9	2,5
Piauí	136	15	5,2	5	3,7
Ceará	57	6	0,8	1	1,8
Rio Grande do Norte	5	1	0,2	0	0
Paraíba	15	2	0,5	1	6,7
Pernambuco	8	1	0,1	0	0
Alagoas	7	1	0,3	1	14,3
Sergipe	4	0	0,2	0	0
Bahia	96	11	0,8	2	2,1
Southeast	3,823	425	5,7	206	5,4
Minas Gerais	911	101	5,5	50	5,5
Espírito Santo	116	13	4	9	7,8
Rio de Janeiro	873	97	6,6	41	4,7
São Paulo	1.923	214	5,6	106	5,5
South	554	62	2,4	38	6,9
Paraná	280	31	3,2	21	7,5
Santa Catarina	187	21	3,8	8	4,3
Rio Grande do Sul	87	10	0,9	9	10,3
Central-West	907	101	8,3	39	4,3
Mato Grosso do Sul	76	8	3,9	5	6,6
Mato Grosso	625	69	26,7	15	2,4
Goiás	160	18	3,4	15	9,4
Distrito Federal	46	5	2,4	4	8,7
Unknown	26	3	0	0	0
Total	6,732	748	4,3	334	5



O lavrador de café, 1934
Candido Portinari

PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Micose sistêmica endêmica mais prevalente da América Latina

Atinge segmentos sociais específicos como trabalhadores rurais

Faixa etária de 30-50 anos

Impacto social e econômico

Não é doença de notificação compulsória

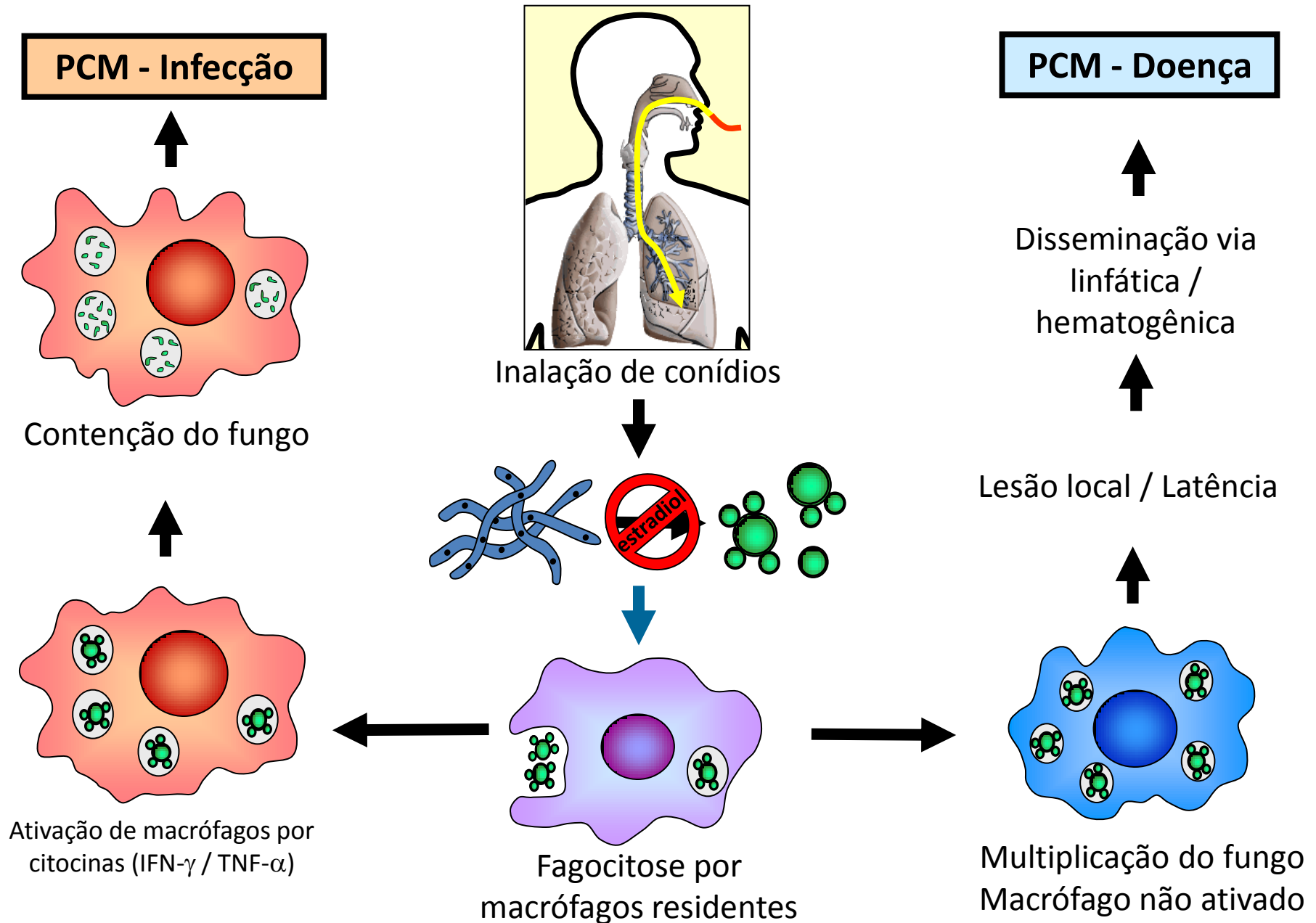
3181 casos de óbito entre 1980-1995 (1,45 casos/milhão de habitantes)

8ª causa de mortalidade por doença infecciosa

Não dispõe de mecanismo de prevenção, não é objeto de vigilância epidemiológica rotineiramente

Coutinho et al. 2002.

Possível mecanismo de infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis*



Classificação das formas clínicas

Paracoccidioidomicose infecção

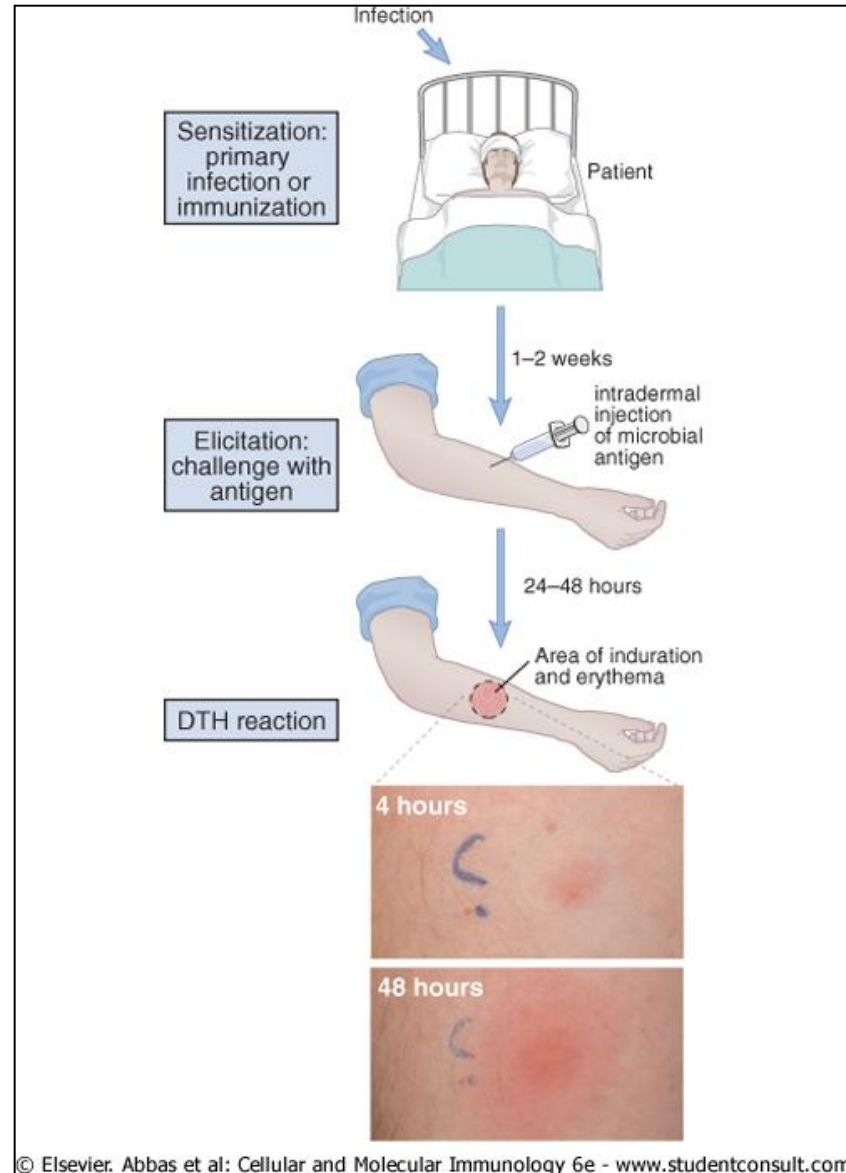
Paracoccidioidomicose doença:

- Forma aguda/subaguda – tipo juvenil
- Forma crônica – tipo adulta
 - Unifocal
 - Multifocal
- Forma residual ou sequelar

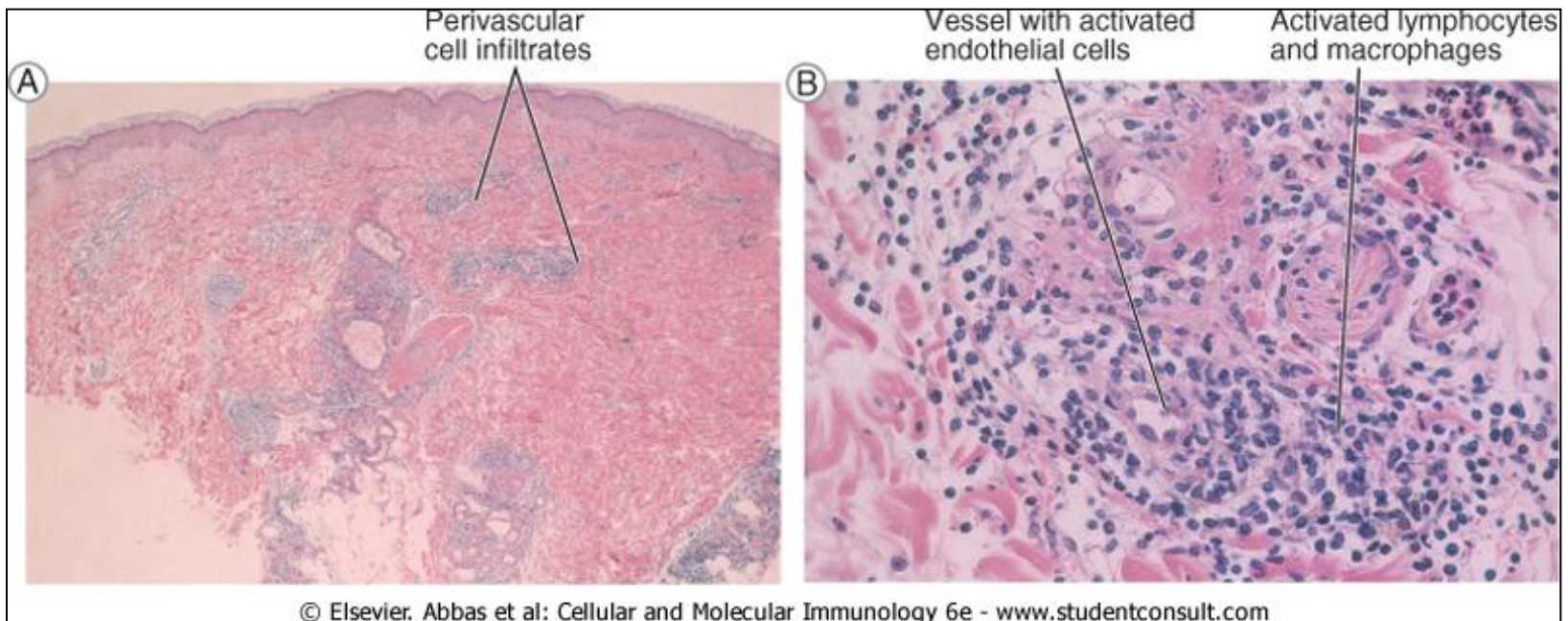
PCM-infecção

- Moradores de zona endêmica, trabalhadores rurais
- Teste cutâneo de HTT positivo a gp43 de *P. brasiliensis*
- Sem sinais ou sintomas da doença
- Anticorpos indetectáveis
- Podem evoluir para a PCM doença?

Reação de HTT (hipersensibilidade do tipo tardio) para detecção de imunidade celular (Th1) in vivo



Histologia de pele com reação positiva de HTT (acúmulo de linfócitos e macrófagos)



Forma aguda – tipo juvenil

Acomete igualmente ambos os sexos, < 25 anos

Progressão rápida e disseminada

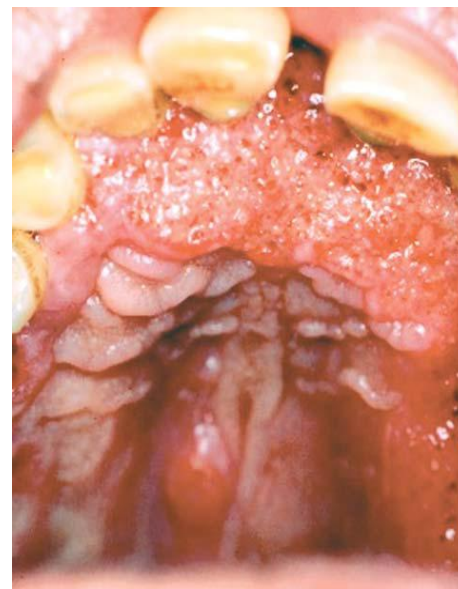
É caracterizada por:

- ✓ Envolvimento de múltiplas cadeias de linfonodos
- ✓ Hepatomegalia, esplenomegalia
- ✓ Lesões de pele
- ✓ Lesões ósteo-articulares
- ✓ Envolvimento das glândulas adrenais
- ✓ Envolvimento do sistema nervoso central



Forma crônica – tipo adulto

- ✓ Mais de 90% dos pacientes, adultos entre os 30 e 60 anos, sexo masculino.
- ✓ Progressão lenta
- ✓ Manifestações pulmonares: mais de 90% dos pacientes
- ✓ **Apresentação unifocal:** micose restrita a somente um órgão (pulmões podem ser o único órgão afetado em até 25% dos casos)
- ✓ **Apresentação multifocal:** envolve mais de um órgão simultaneamente: pulmões, mucosas e pele são os locais mais acometidos pela doença



Tratamento

Tabela 2 - Esquema de tratamento ambulatorial para formas leves e moderadas de paracoccidioidomicose*

Medicamentos	Dose	Duração do tratamento
Itraconazol**	Adultos: 200mg por dia, logo após uma das refeições principais (almoço ou jantar), em uma única tomada. Crianças com < 30kg e > 5 anos, 5 a 10mg/kg/dia, ajustar a dose não abrindo a cápsula***	6 a 9 meses nas formas leves e 12 a 18 meses nas formas moderadas
Sulfametoxazol /trimetoprim**	Adultos: trimetoprim: 160 a 240mg sulfametoxazol 800mg a 1.200mg. VO 12/12hs Crianças – trimetoprim, 8 a 10mg/kg sulfametoxazol, 40 a 50 mg/kg, VO 12/12h	12 meses nas formas leves e de 18 a 24 meses, nas formas moderadas.

*Ver item critérios de gravidade. Casos graves devem ser encaminhados a centros de maior resolutividade.

** Primeira escolha para adultos, com base na facilidade de administração, melhor aderência e tolerabilidade. Crianças que não deglutem cápsulas de itraconazol podem ser tratadas com a solução oral de sulfametoxazol/trimetoprim.

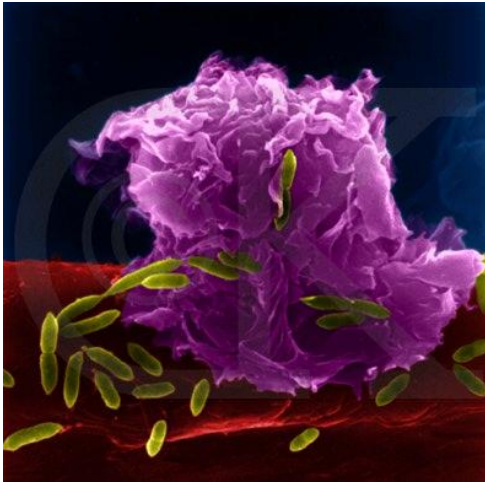
*** Maior experiência em crianças é com sulfametoxazol/trimetoprim.

Sequelas

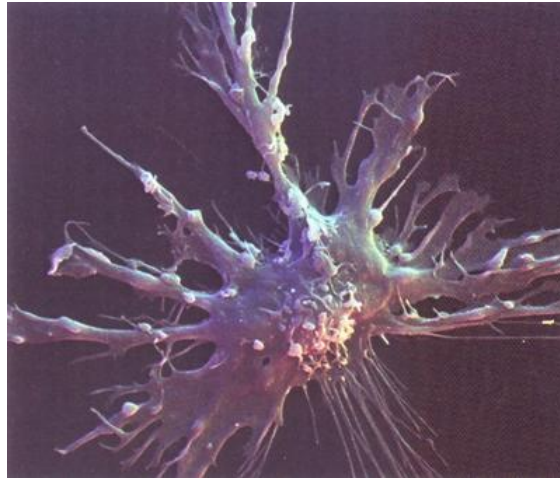


Figura 8 - Sequelas em paracoccidioidomicose, decorrentes de seu tratamento. A e B Microstomia resultante de lesões peri-orais . C - Traqueostomia decorrente de estenose de traquéia. D - Fibrose pulmonar.

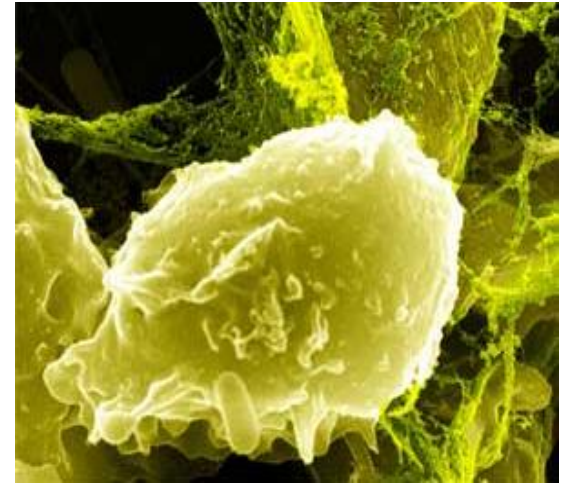
Resposta Inata contra Fungos



Monócitos



Células Dendríticas



Neutrófilos

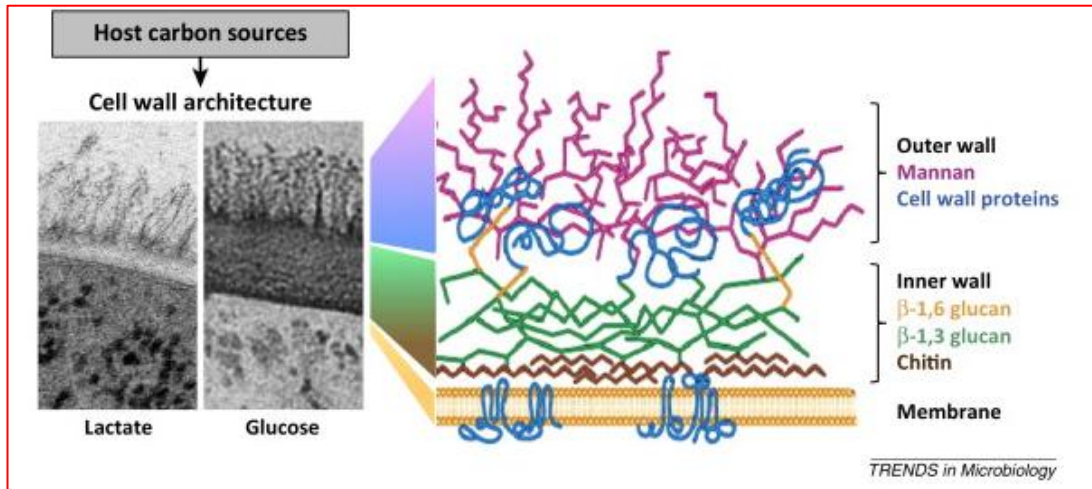
PAMPs

Padrões Moleculares
Associados a Patógenos

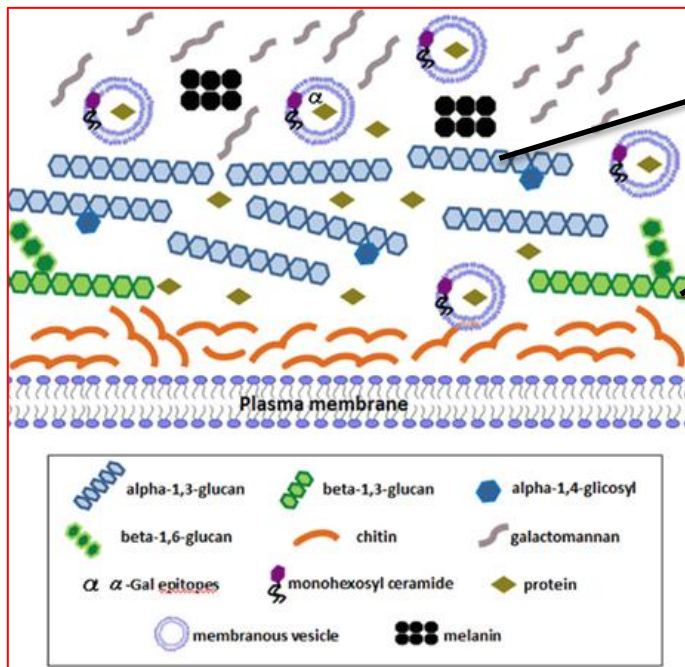
PRRs

Receptores de
Reconhecimento de Padrão

Composição da Parede dos Fungos (PAMPs)



Candida albicans



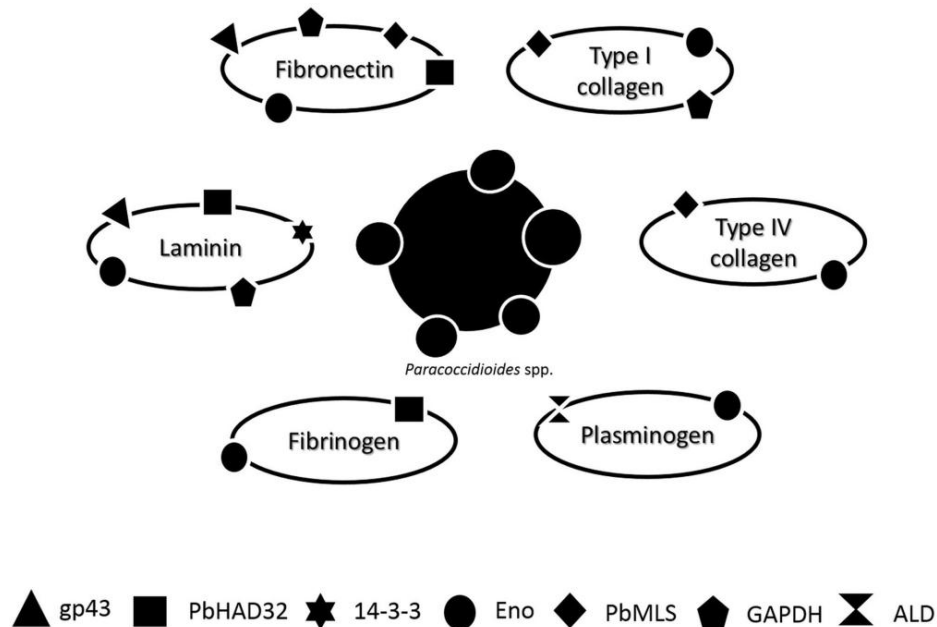
(Alpha-1,3 glucana)

(Beta-1,3 glucana)

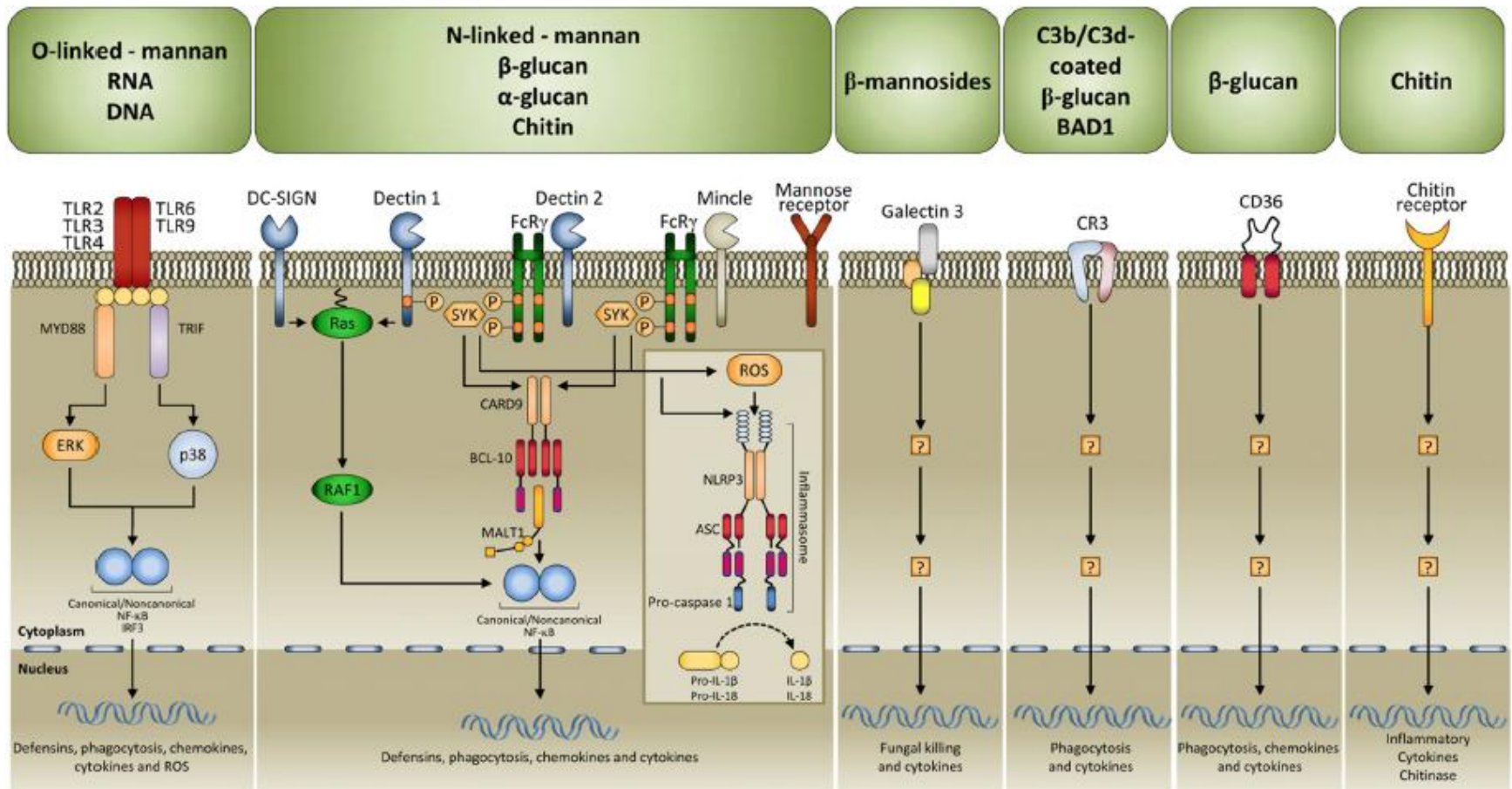
Paracoccidioides brasiliensis

Adesinas – *P. brasiliensis*

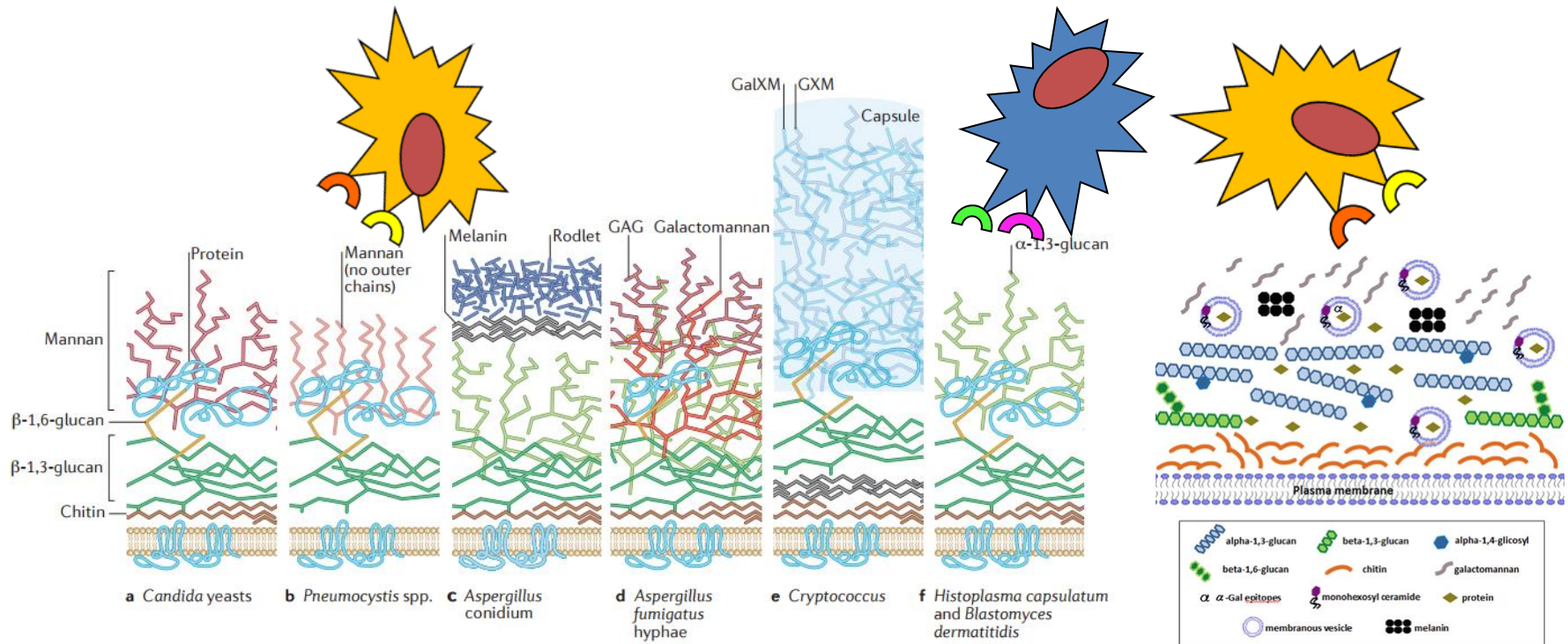
- A gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* é um antígeno diagnóstico da paracoccidioidomicose.
- promove adesão do fungo com a laminina ou a outras moléculas da matriz extracelular, sendo assim, ligação da gp43 a laminina facilita a **adesão e disseminação** do fungo para outros tecidos.



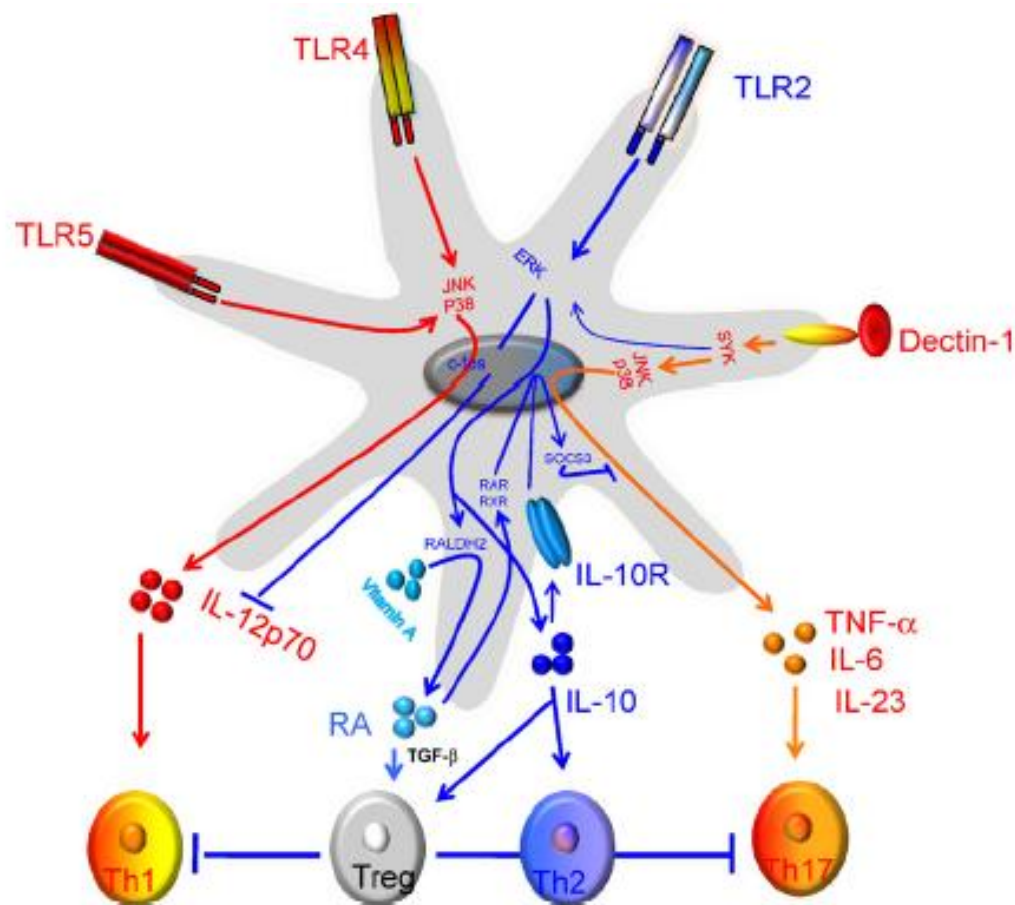
Major Pathogen Molecular Patterns and Pathogen Recognizing Receptors Involved in Innate Responses to Fungi



O *P. brasiliensis* pode ser reconhecido pelas diversas subpopulações de fagócitos ao invadir o hospedeiro



PRRs Program DCs to induce Th1, Th2, Th17 or Regulatory T cell responses



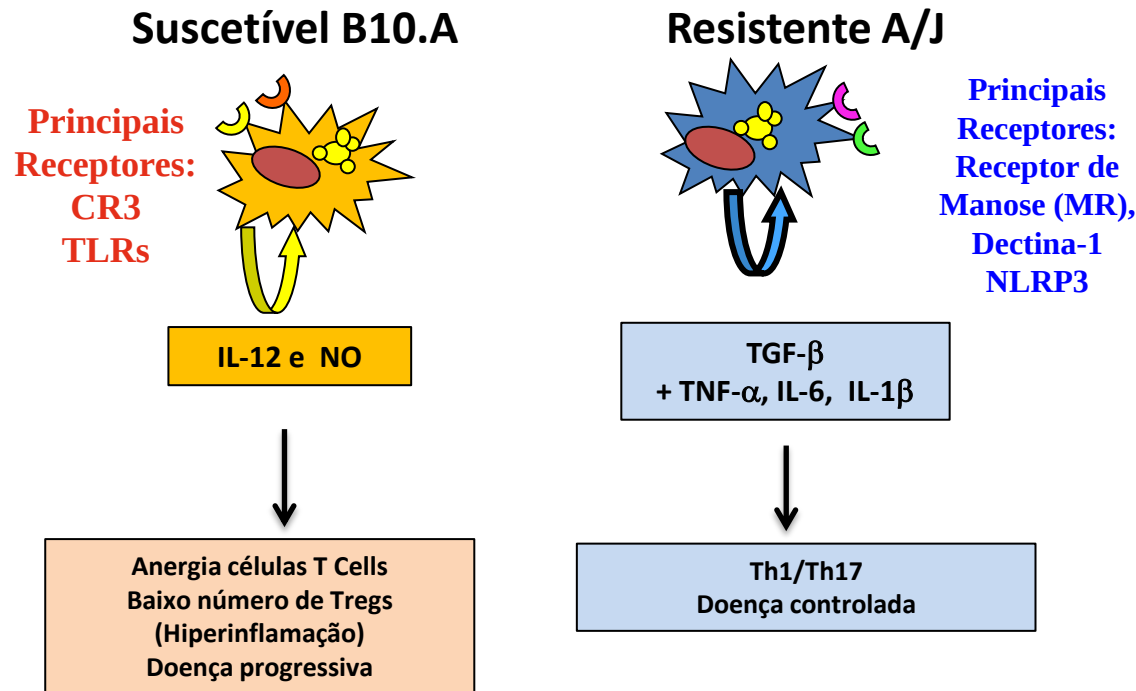
Intracellular
Infections

Protective

Deleterious

Protective
+ Inflammation

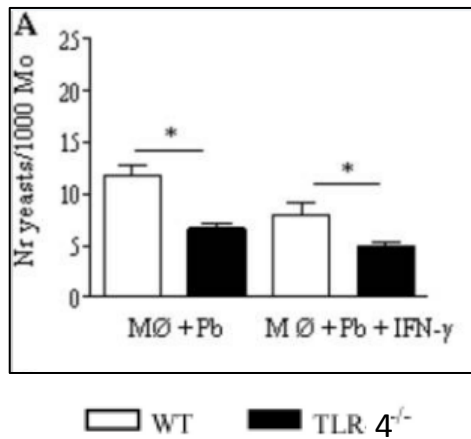
Influência dos receptores de imunidade inata nos mecanismos de susceptibilidade e resistência durante a infecção pelo fungo *P. brasiliensis* em camundongos



Pina et al., J. Leuk. Biol., 2008; Pina et al., Infect & Immun. 2013; Araujo et al. PLoS Neglet., 2014; Feriotti et al. PLoS One 2012; Feriotti et al. Frontiers Micr., 2015; Loures et al. Frontiers Micr., 2015

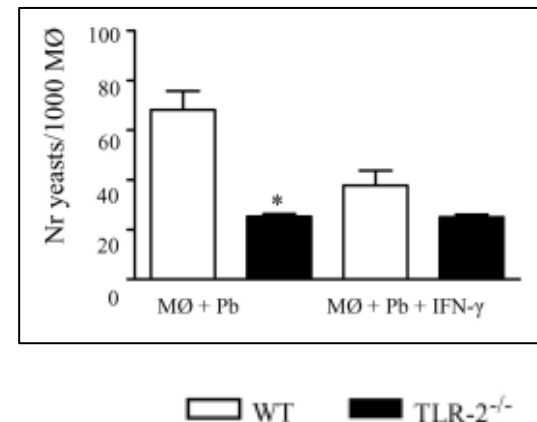
TLRs- *P.brasiliensis*

TLR-4



Infect Immun. 2010 Mar;78(3):1078-88

TLR-2

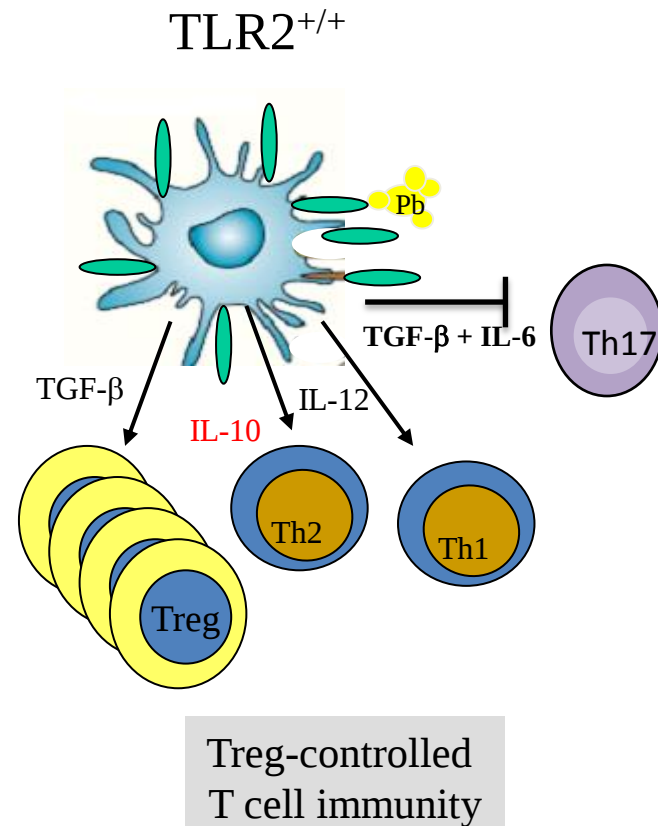
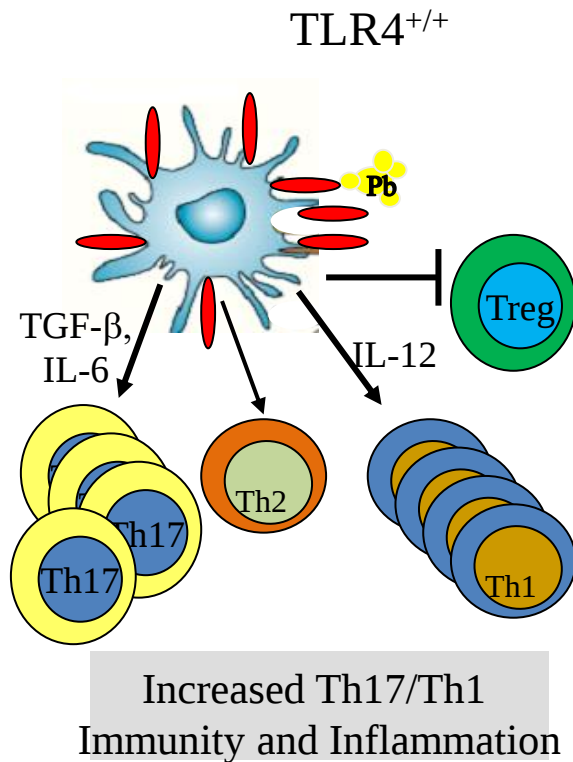


J Immunol. 2009 Jul 15;183(2):1279-90.

TLR4 e TLR2 Induzem Respostas Opostas Contra o *P. brasiliensis*

TLR4 induz Th1 e Th17 inibindo Treg

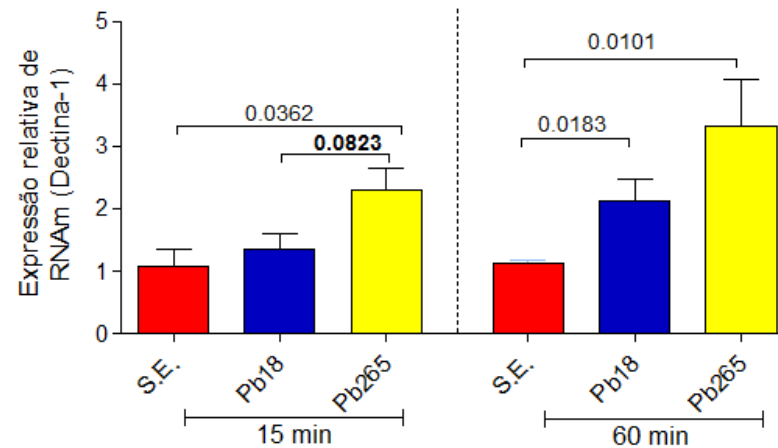
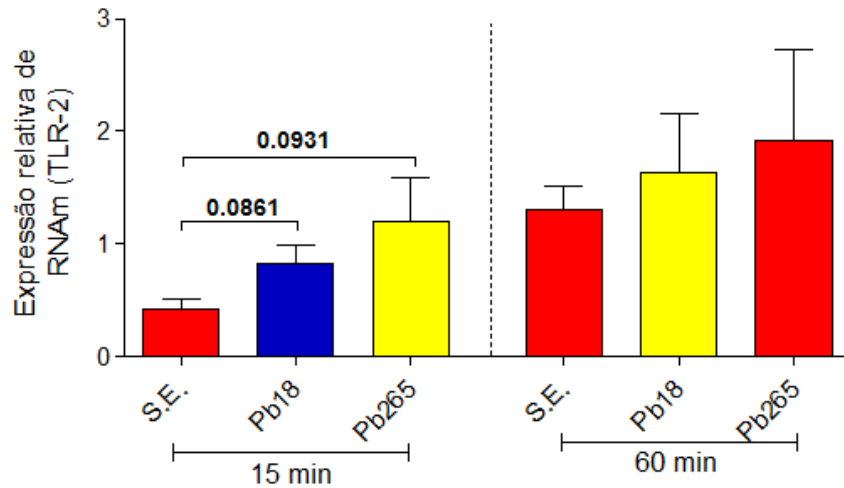
TLR2 Induz Treg e Inibe Th17



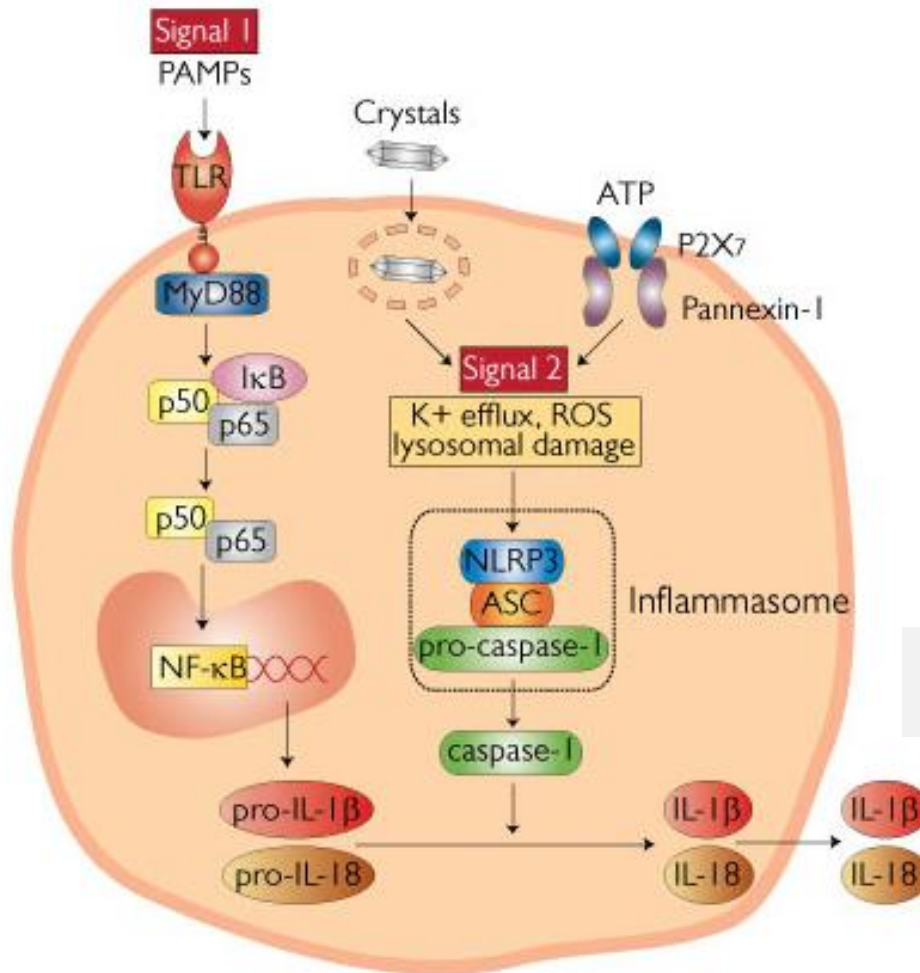
Loures et al.,
Infect & Immun. 78: 1078-1088, 2010.

Loures et al.
J. Immunol. 183, 1279-90, 2009.

***P. brasiliensis* induz a expressão de mRNA para TLR4, TLR2 e Dectina-1 em monócitos e neutrófilos humanos**



NLRP3 Inflammasome is also involved in the immunoprotection against *P. brasiliensis*

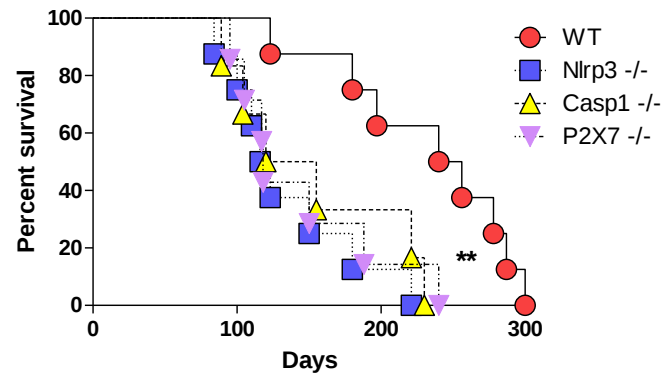
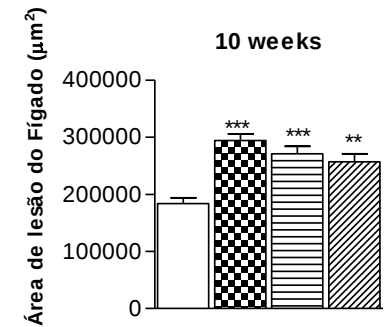
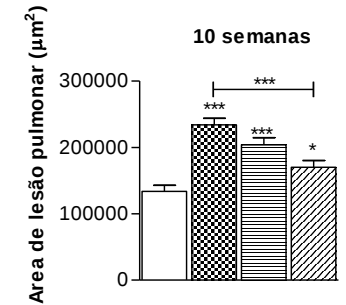
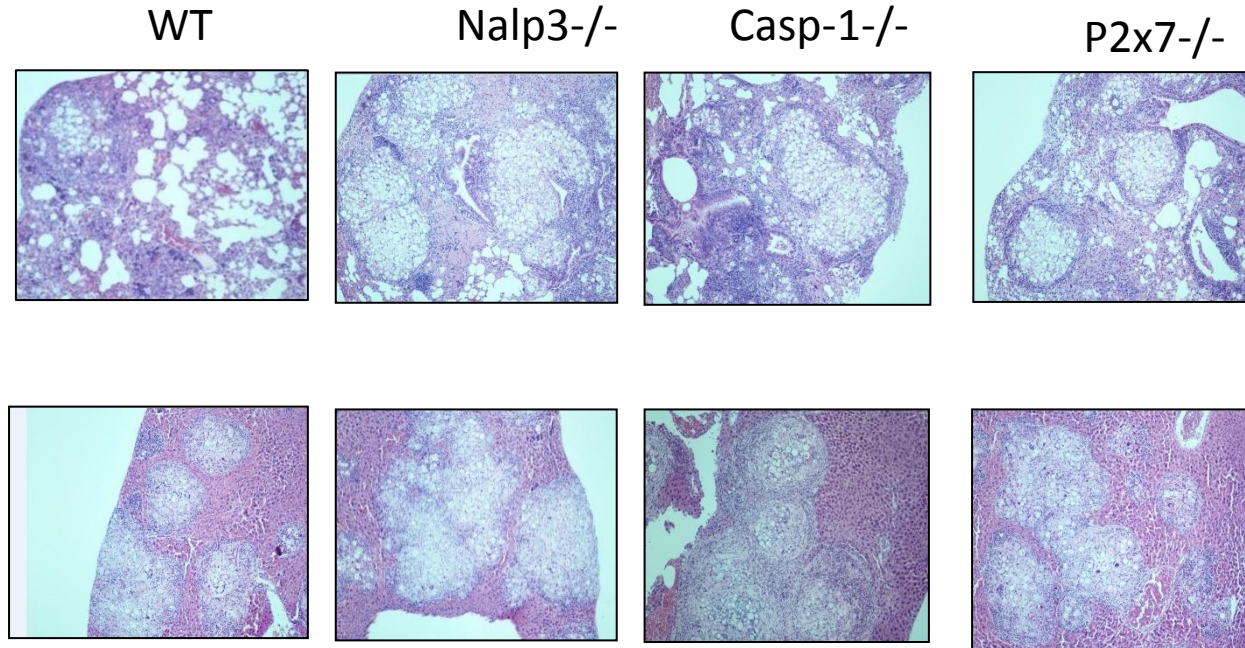


P. brasiliensis Induces Nlrp3 Activation of DCs:
Tavares et al, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2013

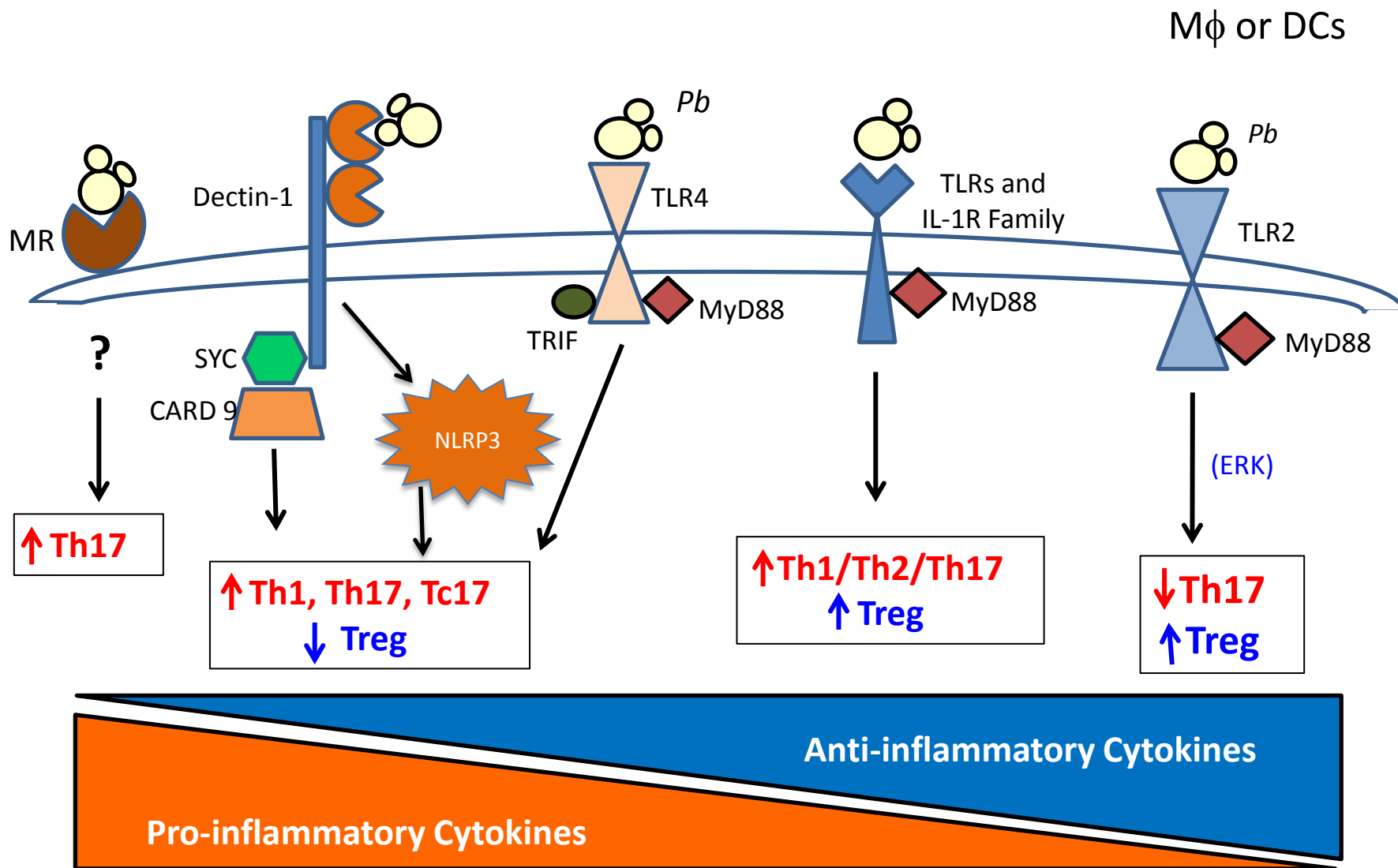
Inflammasome Inducers

Systemic infection (i.v. route): IL-18 produced by Nlrp3 activation induces Th1 immunity that controls *P. brasiliensis* :
Ketelut et al. *J. Immunol.*, 2015

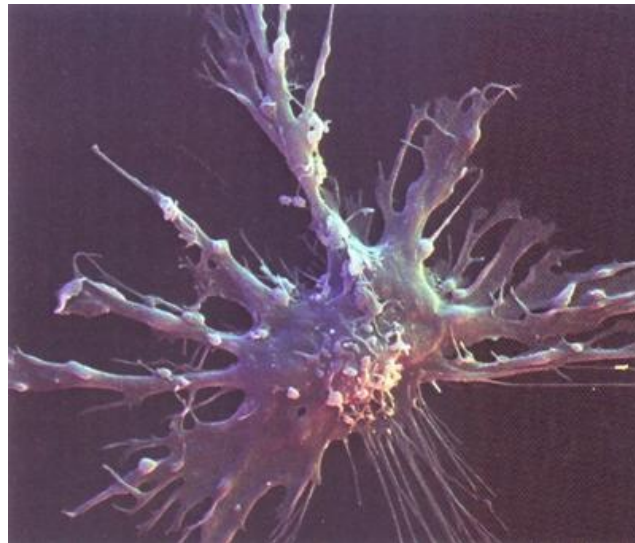
NLRP3, Caspase-1 and P2x7 Deficient Mice Develop More Severe Pulmonary Lesions and Increased Mortality Rates than WT Mice



PRRs and *P. brasiliensis*: Pro- and Anti-Inflammatory Responses

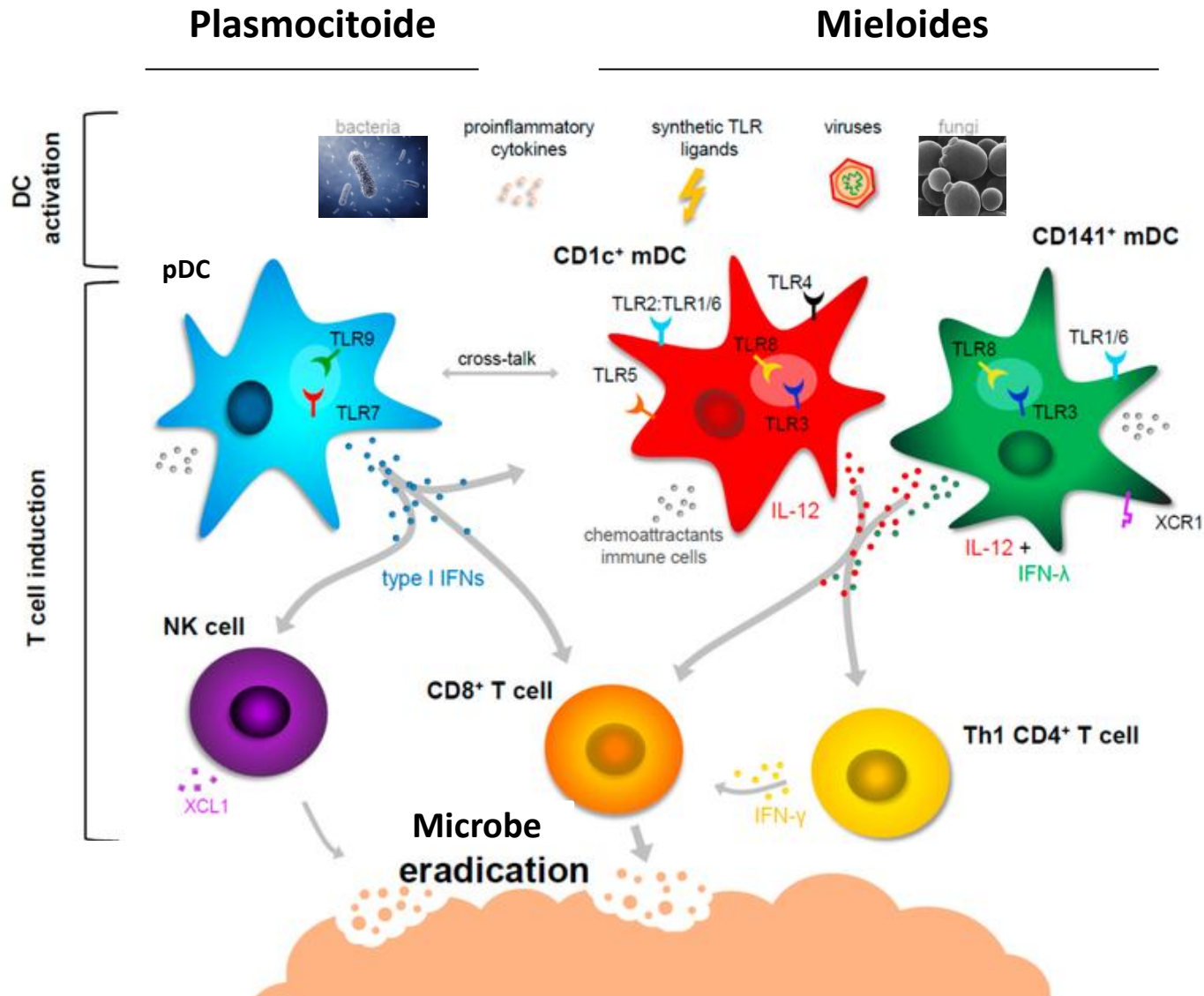


DCs



Células Dendríticas

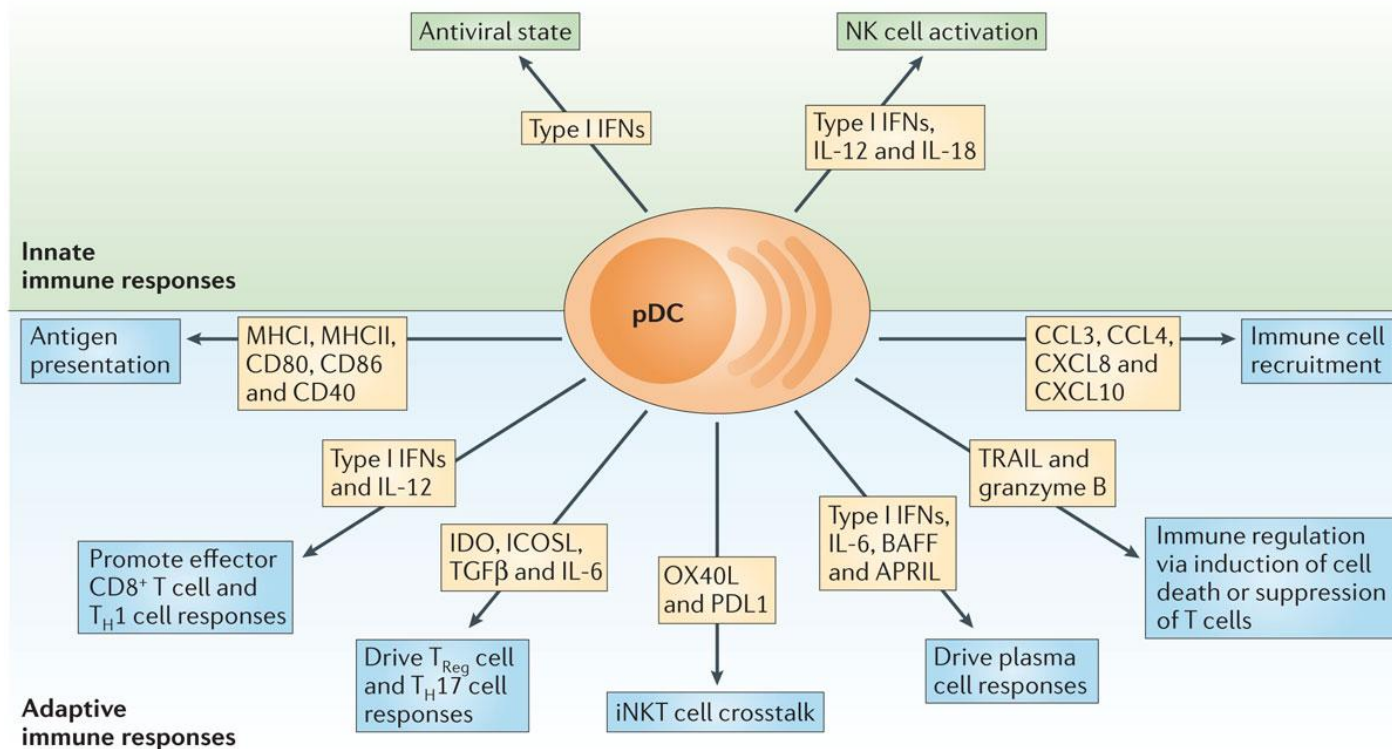
Como os fungos são reconhecidos pelos hospedeiros?



Adaptado de Front. Microbiol 10 September 2012

Fungos podem ser reconhecidos e desencadear respostas em pDCs?

A despeito de seu papel especializado em infecções virais relatado na literatura.



Dogma de especialização das pDCs contra vírus é contestado!!

[Infect Immun.](#) 2013 Apr;81(4):1064-77. doi: 10.1128/IAI.00736-12. Epub 2013 Jan 22.

Myeloid dendritic cells (DCs) of mice susceptible to paracoccidioidomycosis suppress T cell responses whereas myeloid and plasmacytoid DCs from resistant mice induce effector and regulatory T cells.

[Pina A¹](#), [de Araujo EF](#), [Felonato M](#), [Loures FV](#), [Feriotti C](#), [Bernardino S](#), [Barbuto JA](#), [Calich VL](#).

➡ Author information

¹Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

[Cell Host Microbe.](#) 2011 May 19;9(5):415-24. doi: 10.1016/j.chom.2011.04.007.

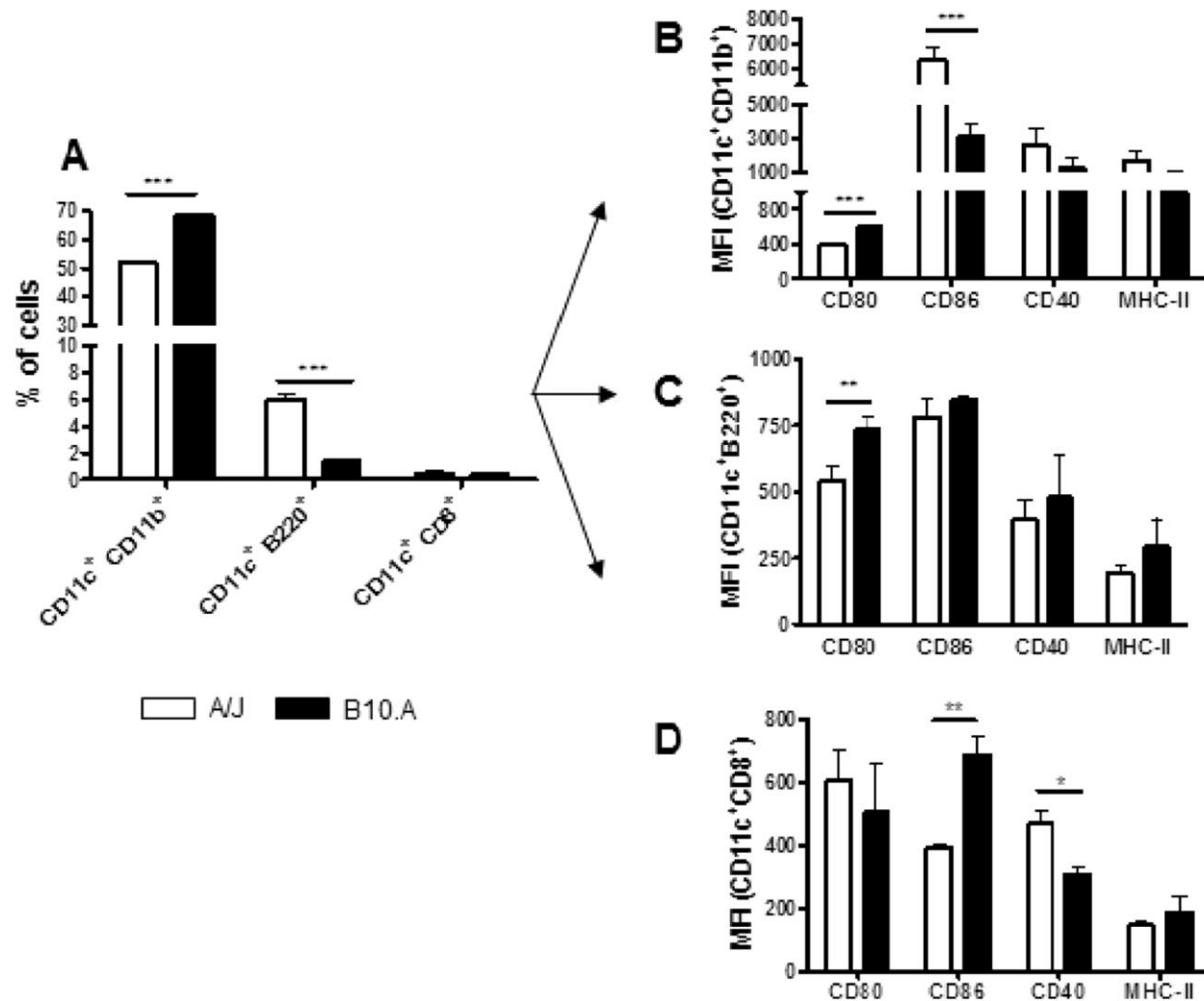
A nonredundant role for plasmacytoid dendritic cells in host defense against the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*.

[Ramirez-Ortiz ZG¹](#), [Lee CK](#), [Wang JP](#), [Boon L](#), [Specht CA](#), [Levitz SM](#).

➡ Author information

¹Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01655, USA.

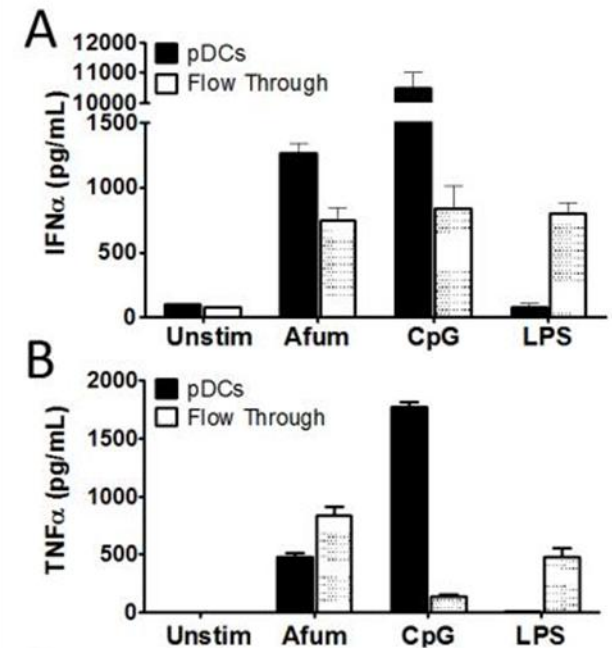
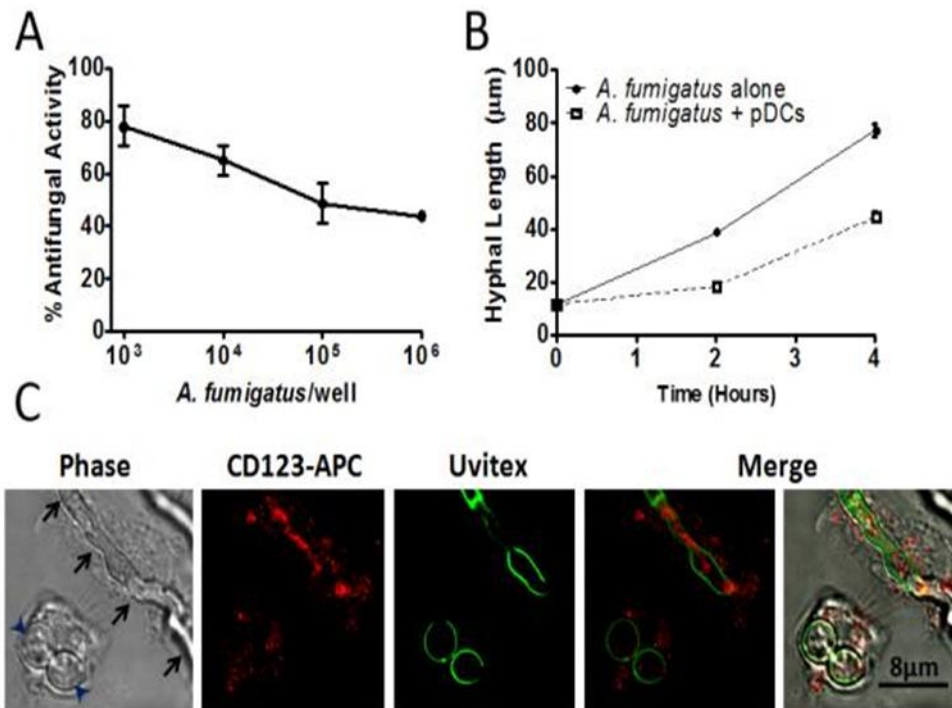
Subsets and activation profile of dendritic cells developed by resistant and susceptible mice.



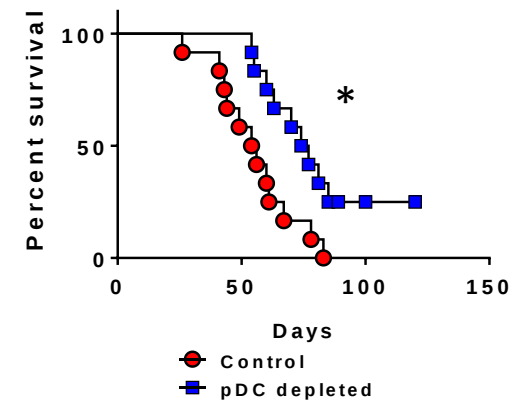
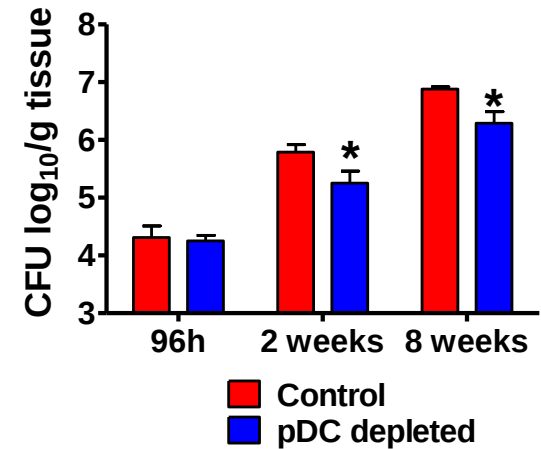
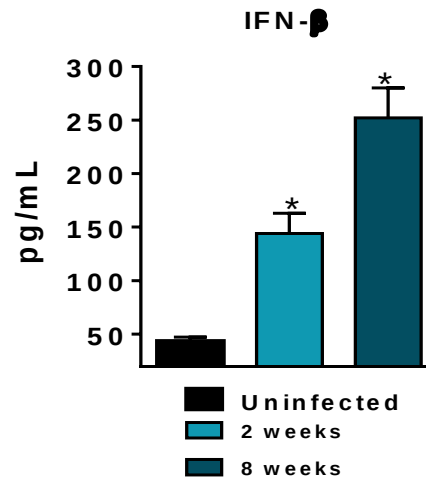
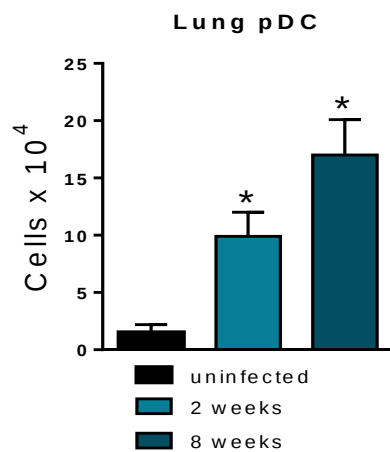
Adriana Pina et al. Infect. Immun. 2013;81:1064-1077

Infection and Immunity

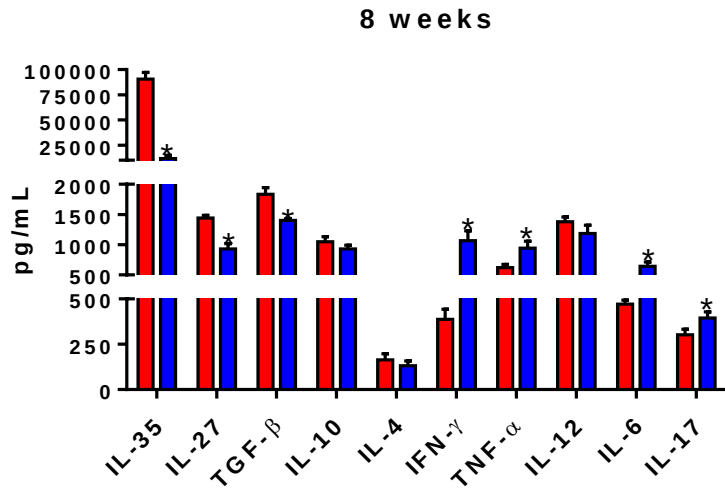
Dogma de especialização das pDCs contra vírus é contestado!!



Qual o efeito que a infecção pelo *P. brasiliensis* causa nas pDCs pulmonares?



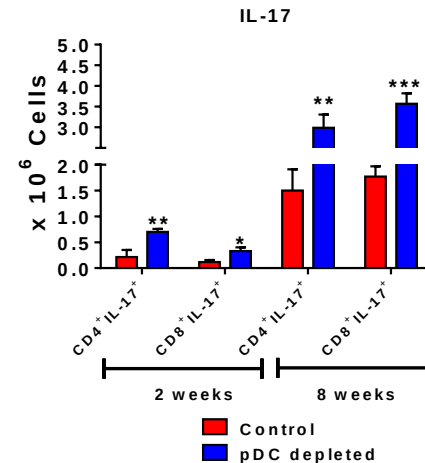
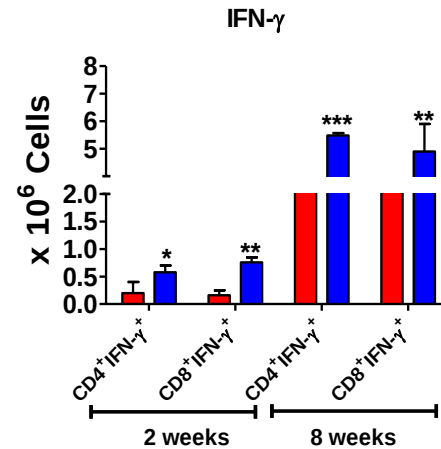
Qual o curso da doença na ausência dessas células?



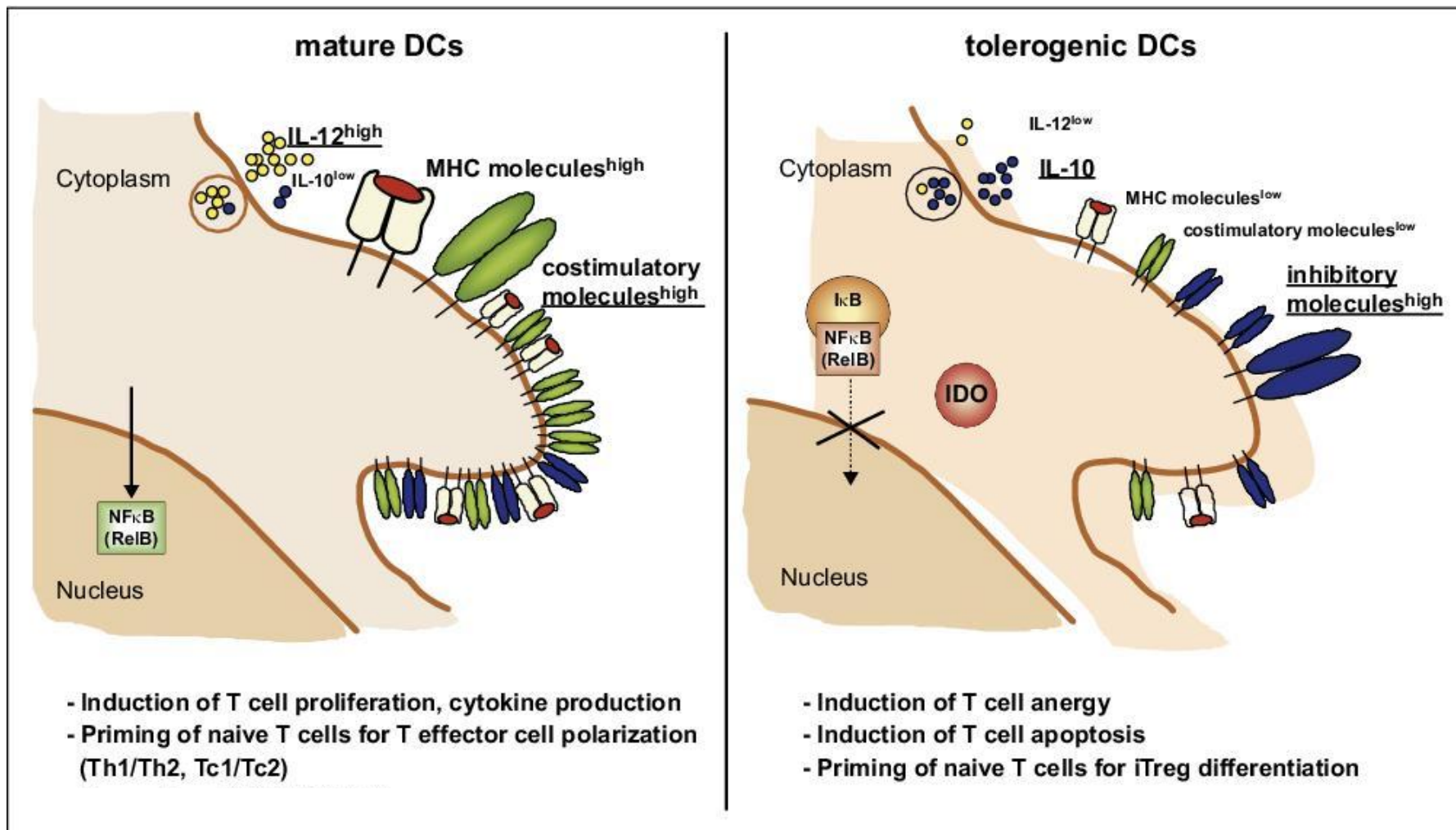
Reguladoras

Inflamatórias

pDC tolerogênica?

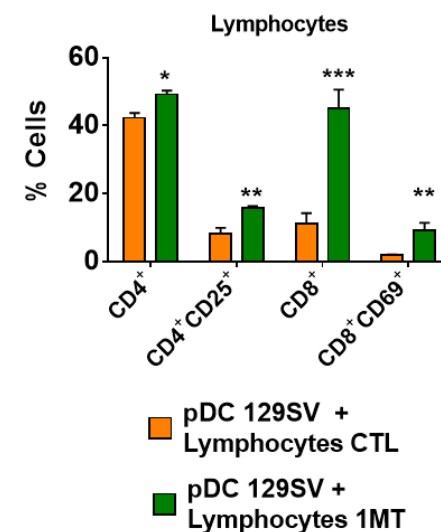
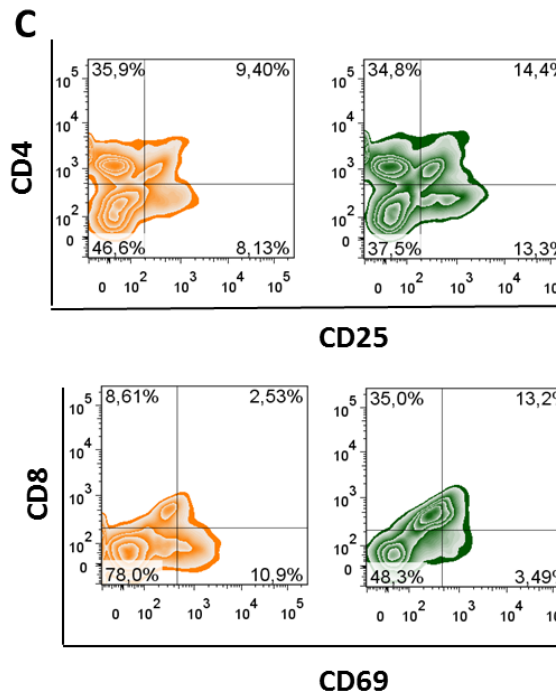
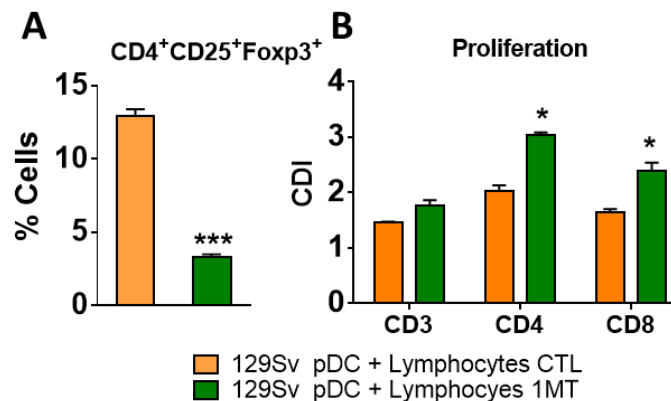
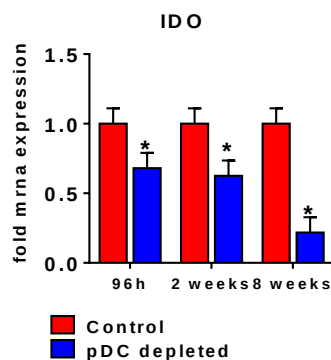
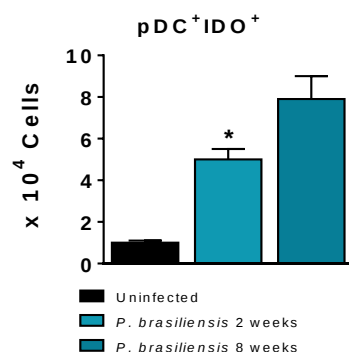


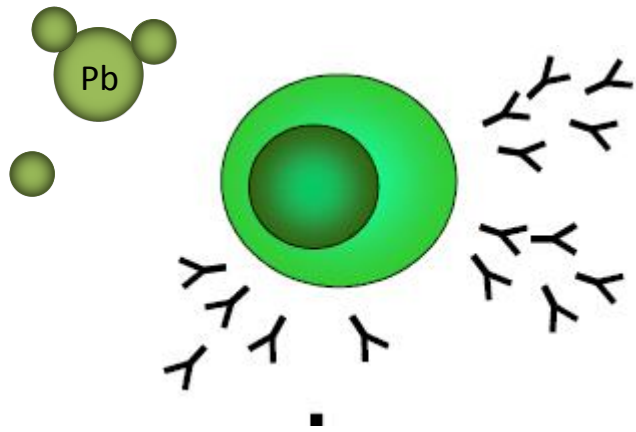
DCs imunogênicas x tolerogênicas



Adaptado de Eur J Dermatol. 2007 Nov-Dec;17(6):476-91

pDC: expansão de Treg por mecanismos dependentes de IDO

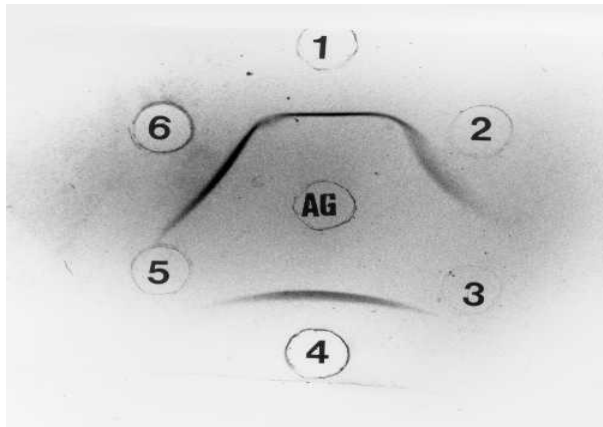




Imunidade Humoral na PCM

Soro do paciente contém anticorpos contra vários Ags do *P. brasiliensis*

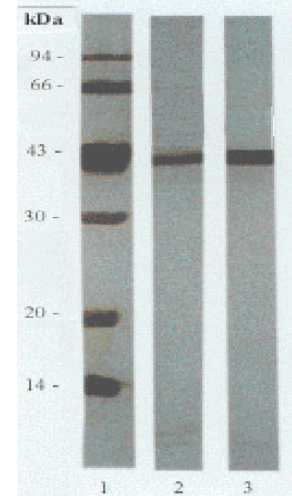
IMUNODIFUSÃO



ELISA

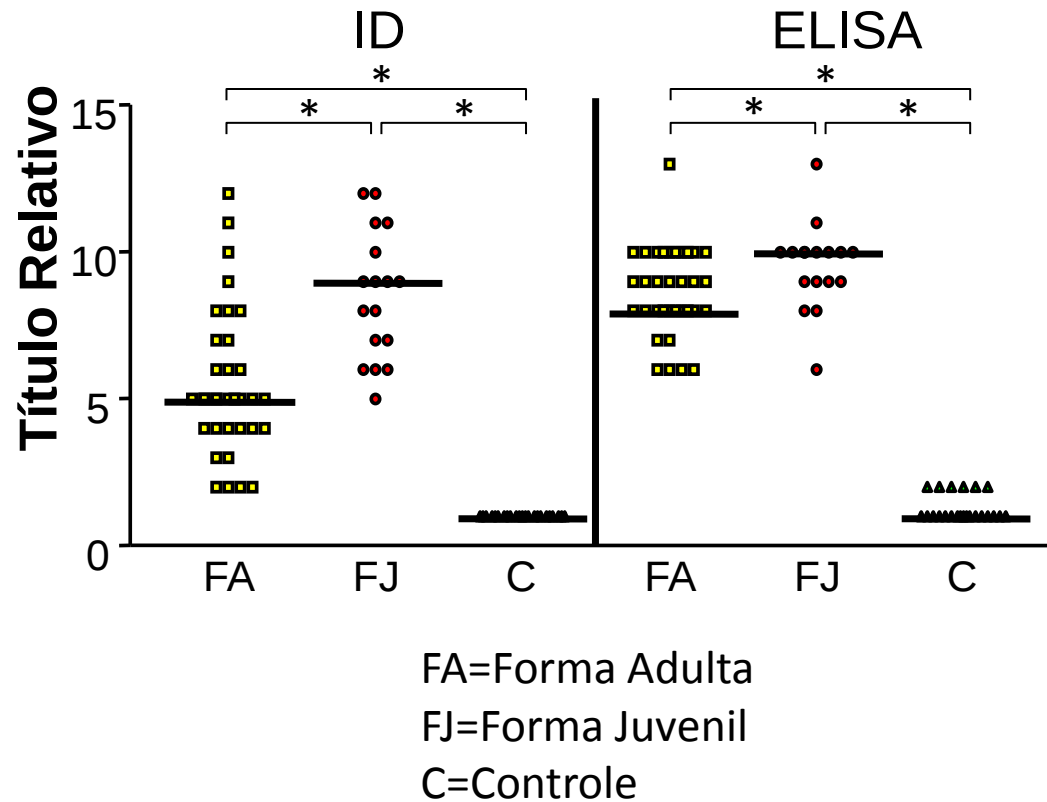


Imunoblot

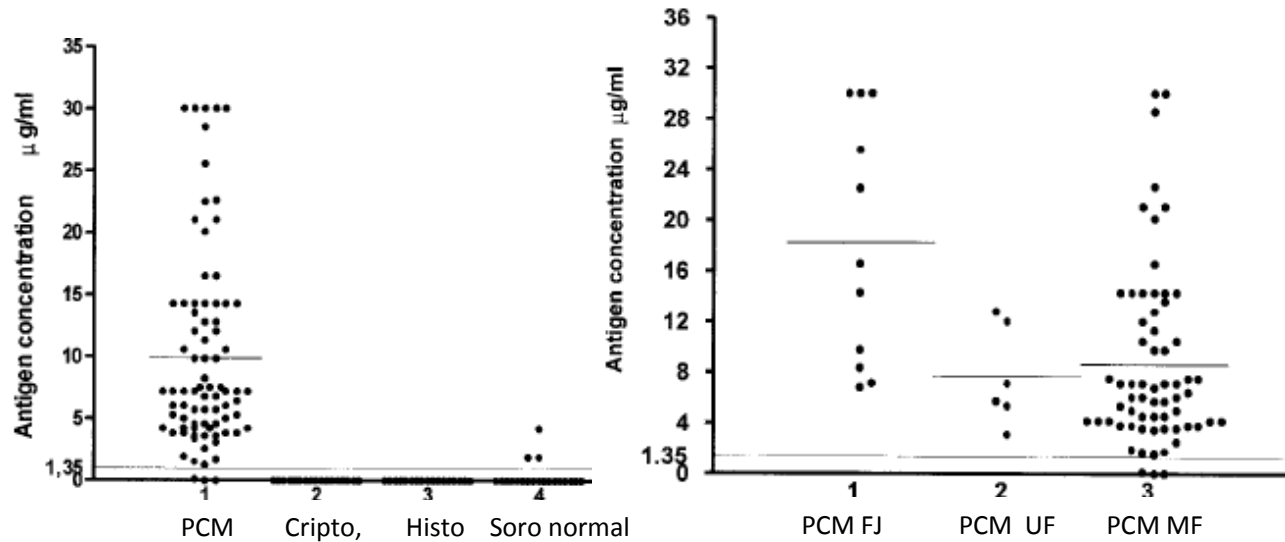


Resposta humoral nas diferentes formas clínicas da paracoccidioidomicose

Níveis de Acs: marcador da gravidade, atividade e recaída da doença



Detecção de antígeno circulante **gp43** de *P. brasiliensis* no soro de pacientes com PCM – acompanhamento do tratamento



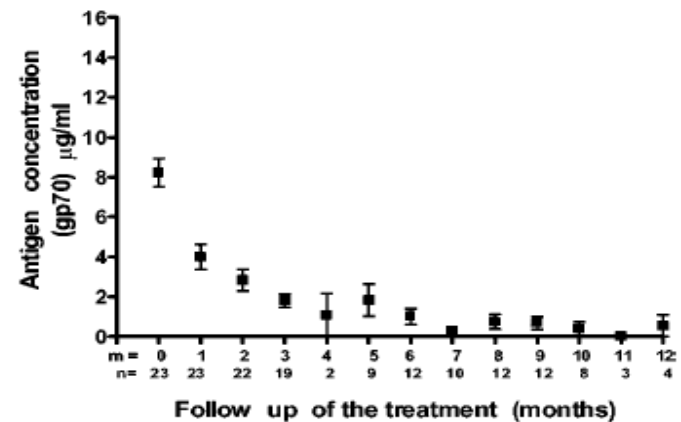
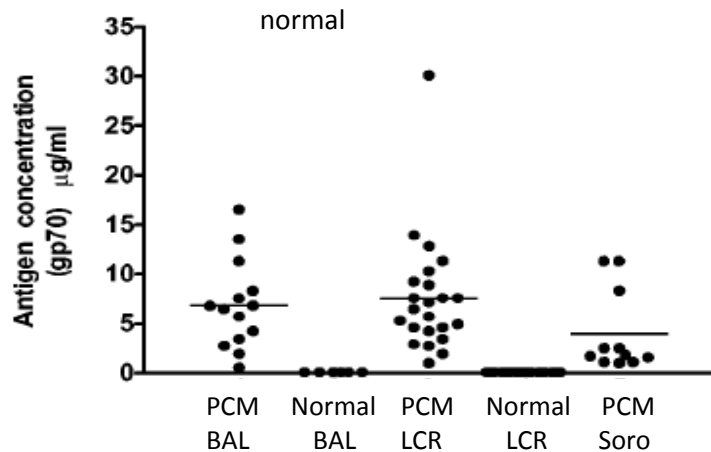
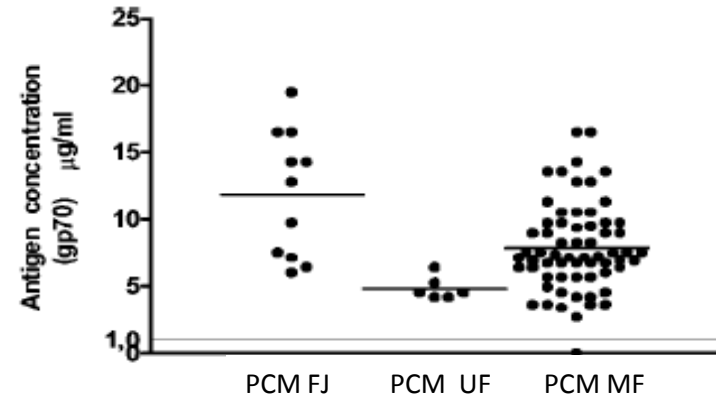
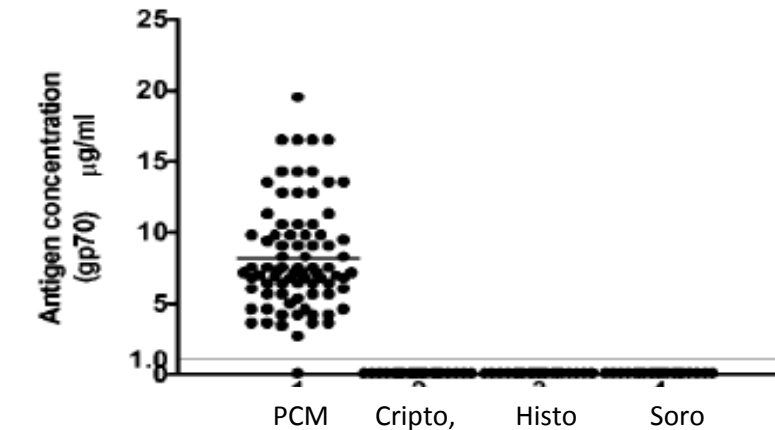
FJ= F. Juvenil

UF= F. Adulta Unifocal

MF= F. Adulta Multifcal

Detecção de antígeno circulante **gp70** de *P. brasiliensis* no soro, liquor e BAL de pacientes com PCM – acompanhamento tratamento

ELISA



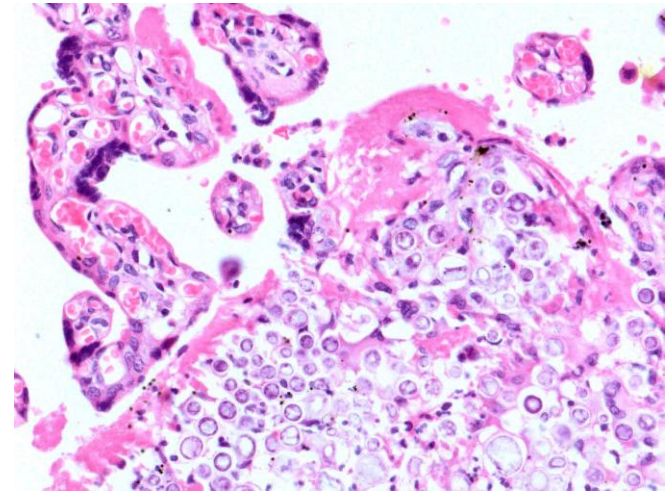
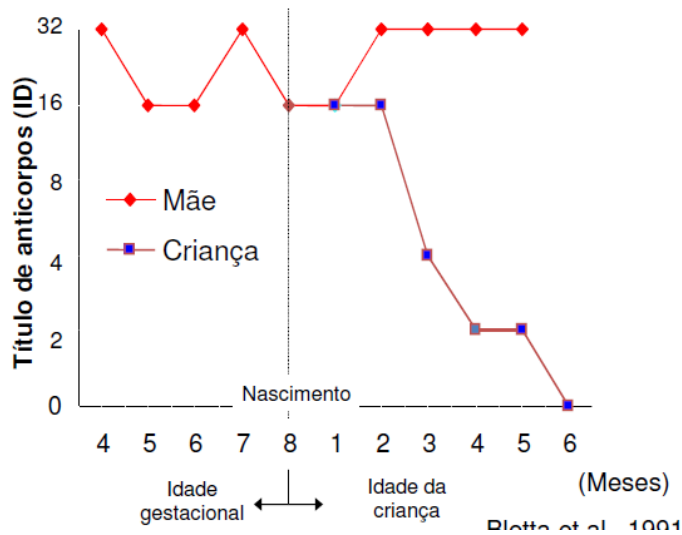
FJ= F. Juvenil

UF= F. Adulta Unifocal

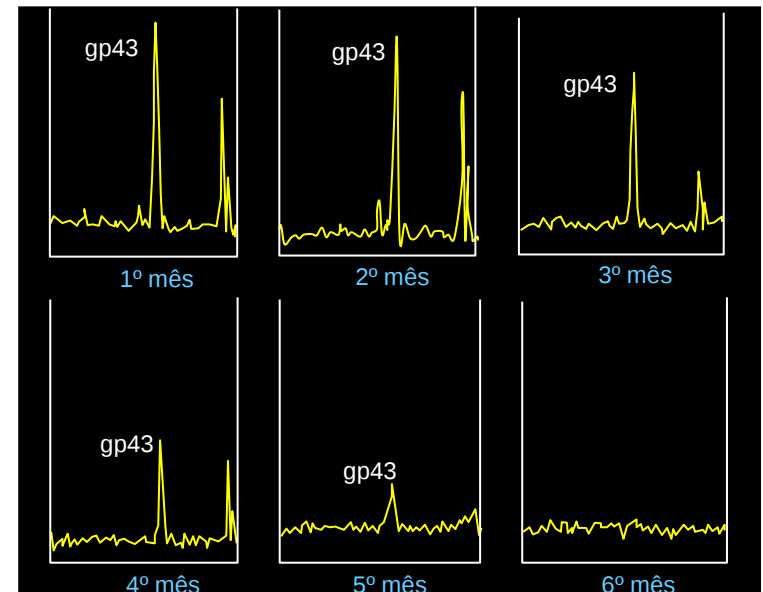
MF= F. Adulta Multifocal

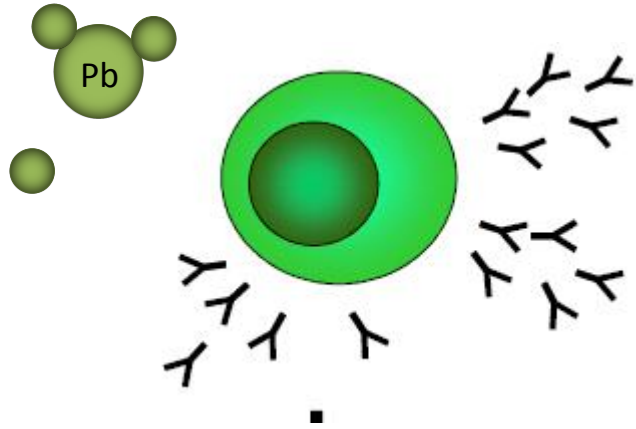
Envolvimento da placenta na PCM

Relato de caso: Paciente sexo feminino, 17 anos, trabalhadora rural, vinha recebendo tratamento para PCM há 3 meses quando engravidou. Doença disseminada durante gestação. Avaliação imunológica da mãe (comprometimento da resposta imune celular, mas não humoral) e da criança. Acompanhamento sorológico do RN por 6 meses.



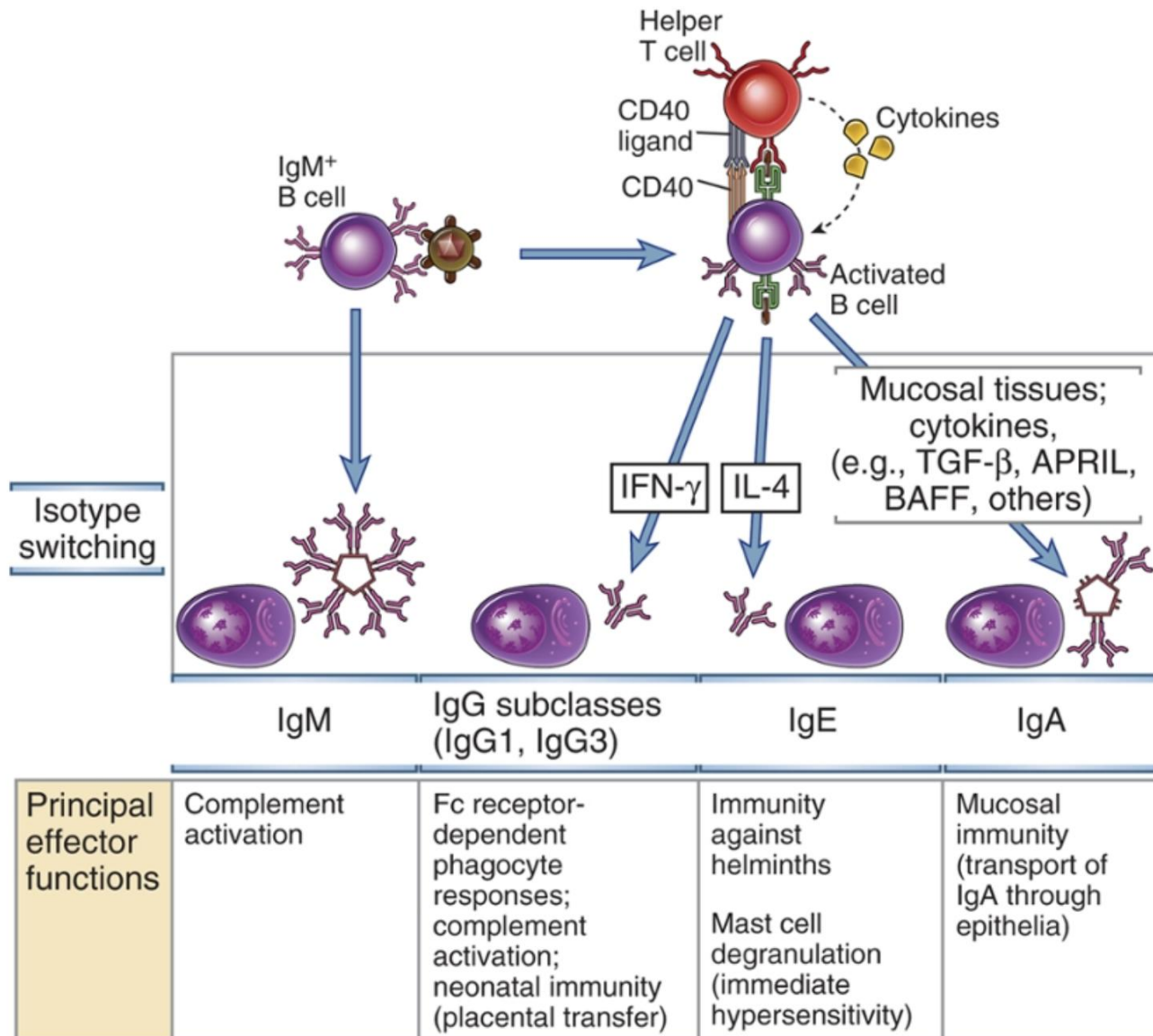
Placenta: inúmeras células leveduriformes de *P. brasiliensis* no espaço intervilloso.



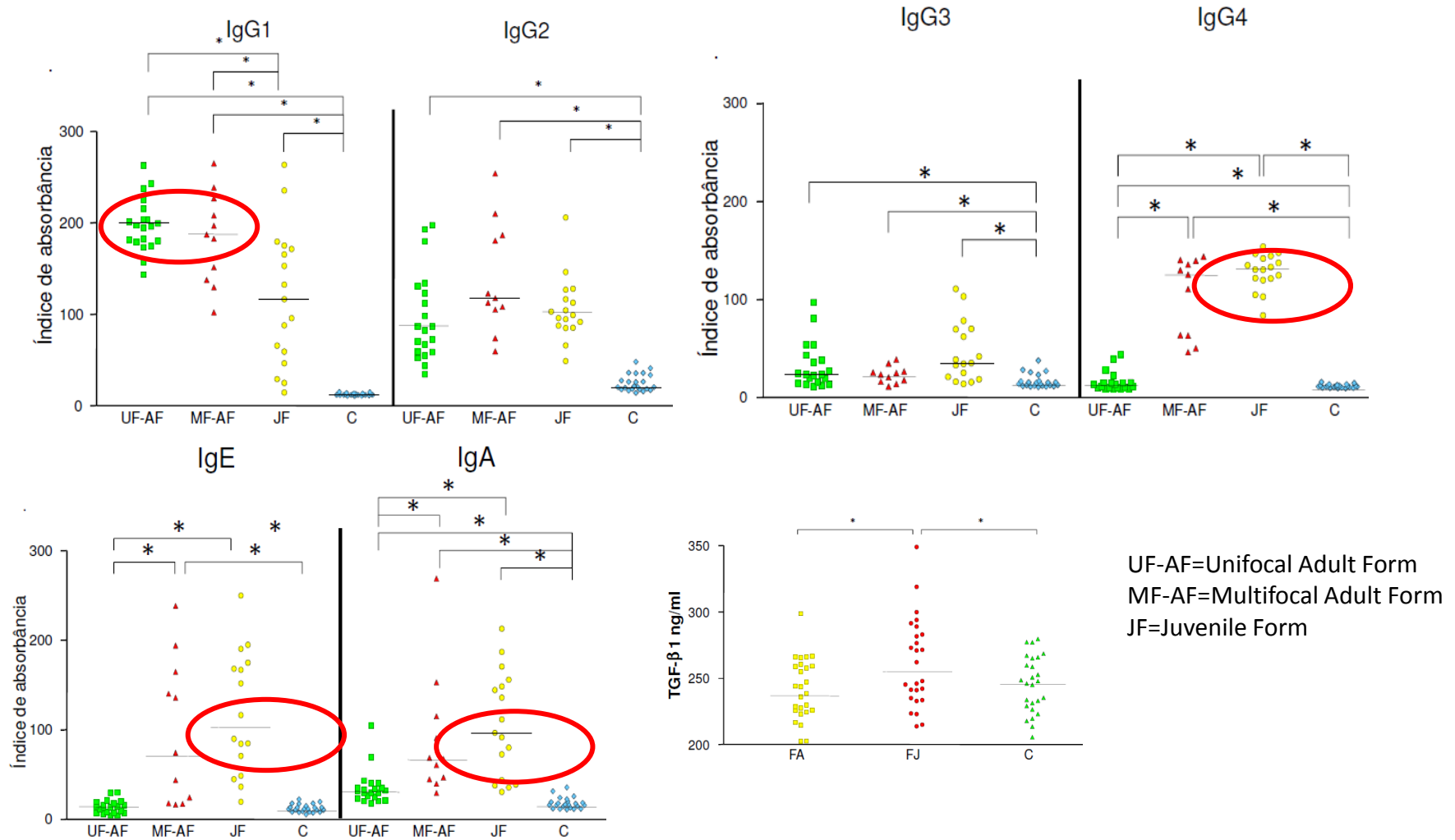


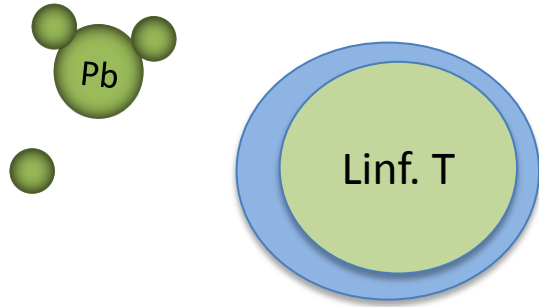
Acs de diferentes isótipos
distinguem as diferentes formas da doença?

A Citocina Secretada por Linfócitos T Regula a Classe ou Isótipo de Anticorpo



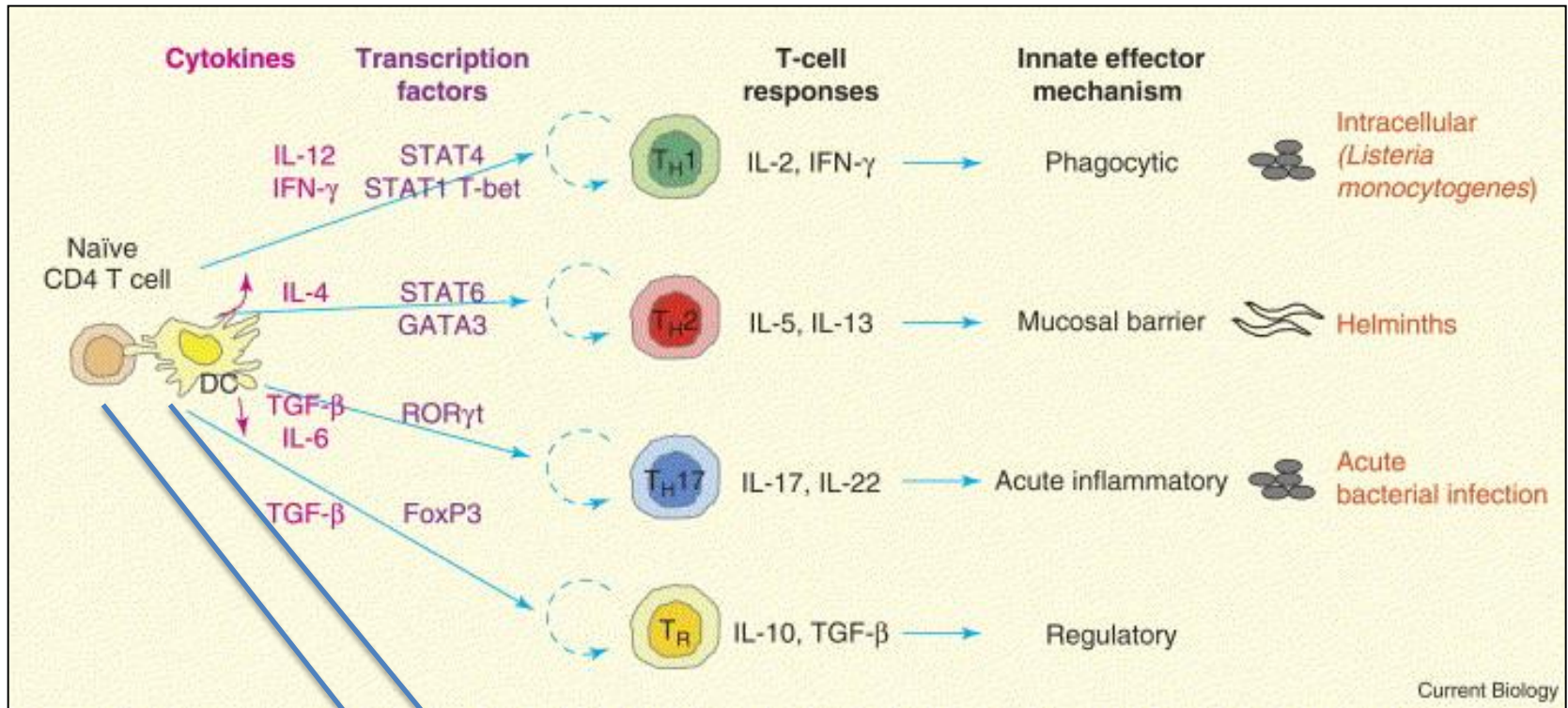
Pacientes com a **F. Crônica** da PCM Têm Altos Níveis de **IgG1**,
mas os da **F. Juvenil** Têm Níveis Elevados de **IgG4, IgE e IgA** no Soro





A resposta imune celular (linfoproliferação e citocinas) distingue as diferentes formas da doença?

O tipo de citocina produzida durante a ativação de cels T naive induz a expressão de fatores de transcrição característicos e diferenciação de cels T



IL-10

TGF-b

TR1

IL-10

Regulatory

Th3

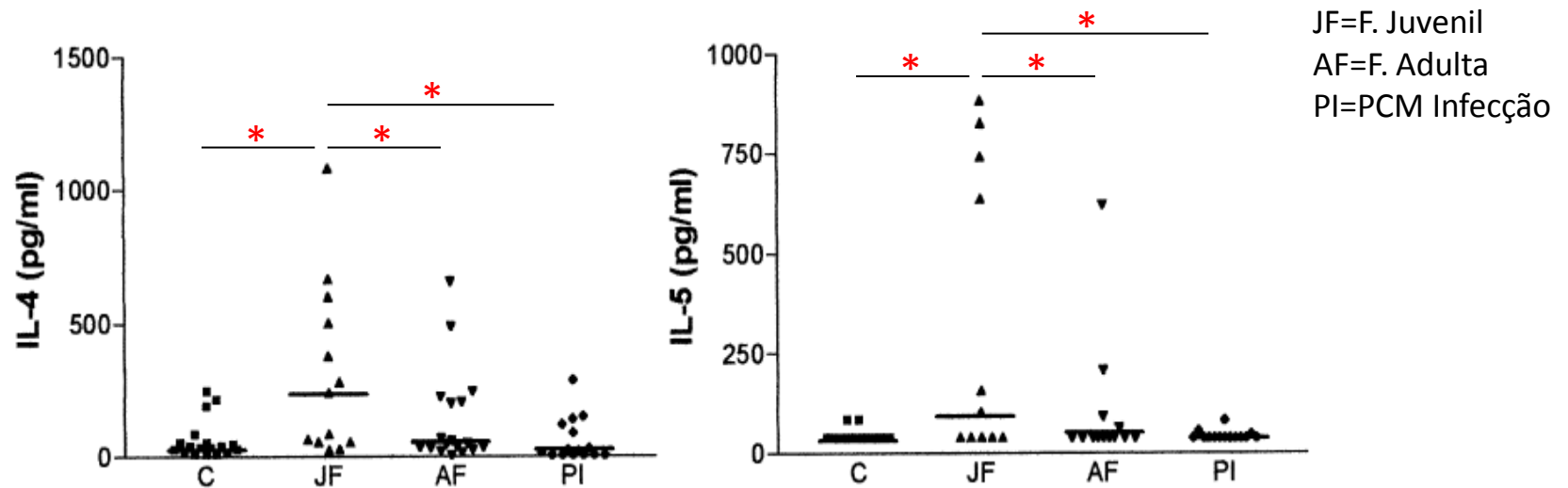
TGF-b

Regulatory

Ferramentas para avaliação da imunidade celular

- Cultura de linfócitos e proliferação celular
- Separação de populações celulares: Linfócitos, monócitos, DCs
- Dosagem de citocinas
- Imunofluorescência e citometria de fluxo (detecção de marcadores de superfície, fatores de transcrição e citocinas intracelulares)
- RT PCR qualitativo: citocinas e fatores de transcrição

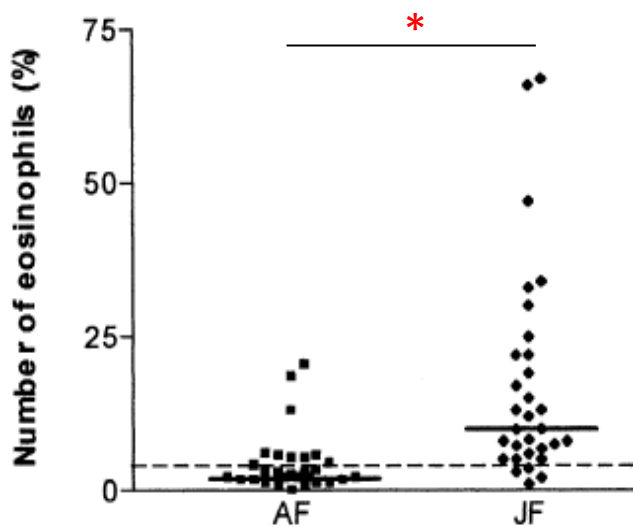
Produção de Citocinas na PCM-Infecção e nas Formas Adulta e Juvenil da PCM



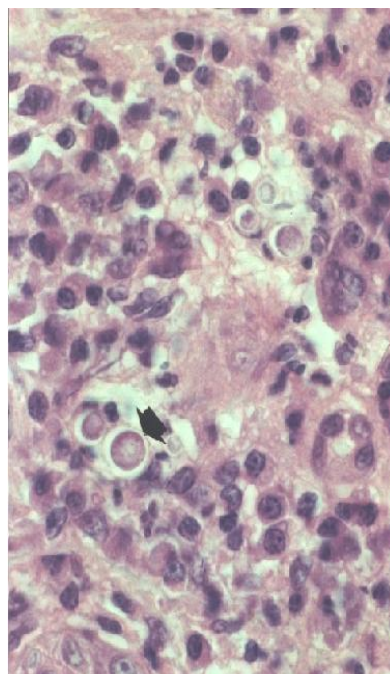
Oliveira et al., Micr.& Infec., 2002, 4: 139-144

Pacientes com a Forma Aguda da PCM Têm Elevado Número de Eosinófilos no Sangue e nas Lesões

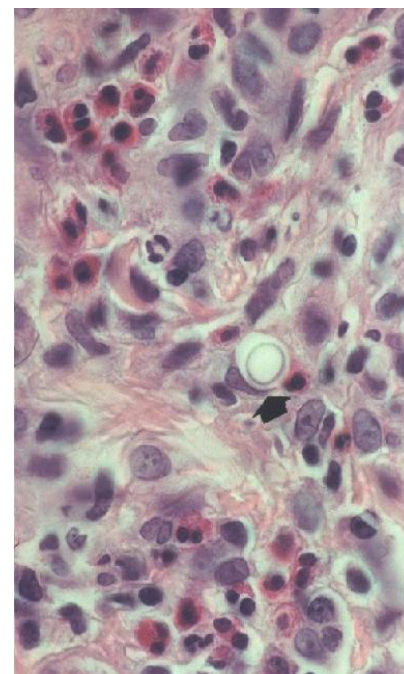
(Oliveira et al., Micr.& Infec., 2002, 4: 139-144)



JF=F. Juvenil
AF=F. Adulta
PI=PCM Infecção



MO - FA - 400 x - HE



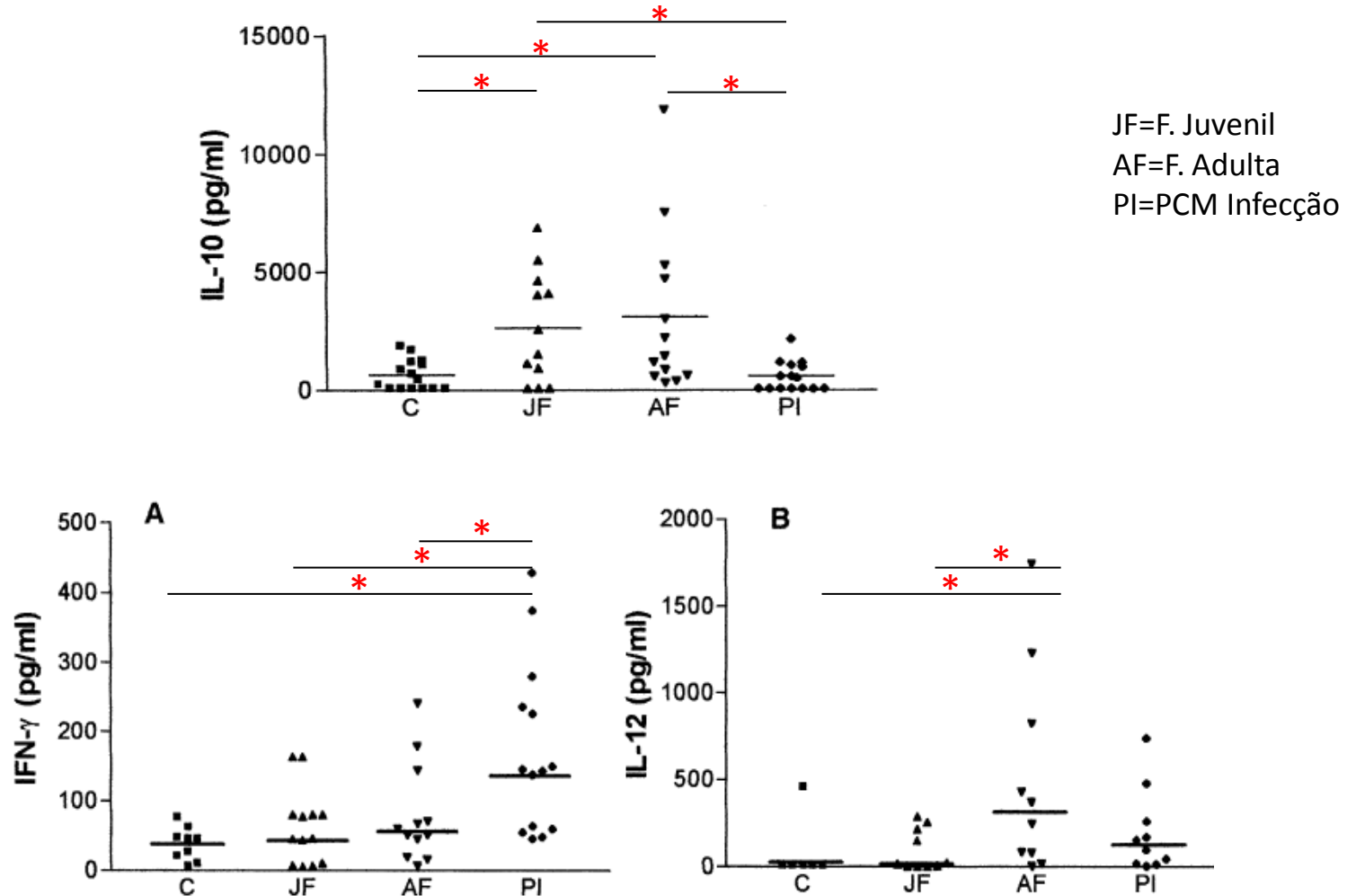
MO - FJ - 400 x - HE

Nº eosinófilos diminui com tratamento antifúngico.

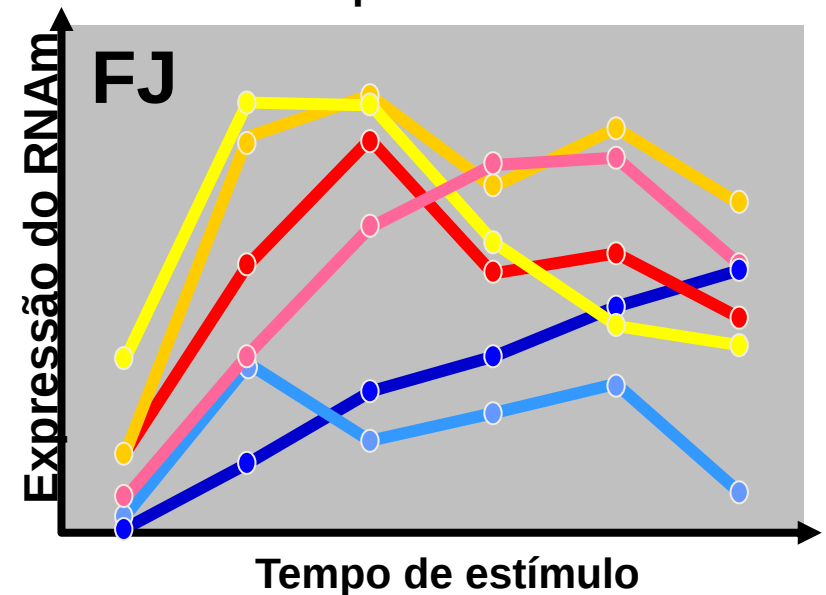
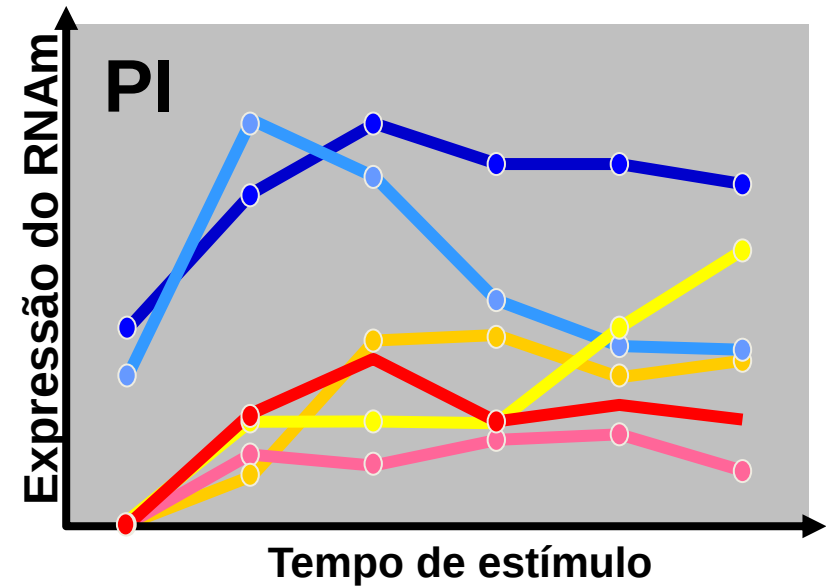
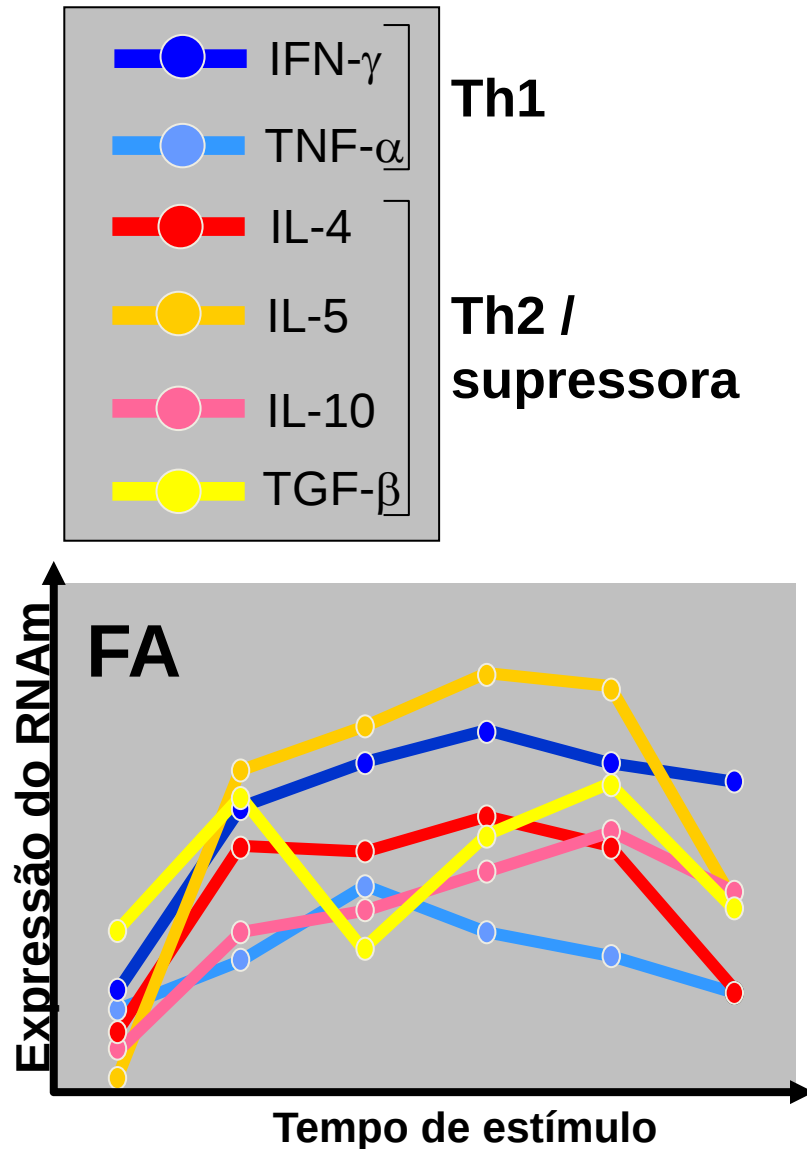
Pacientes com PCM: níveis aumentados de IL-5 e ECF

Eosinófilos: atividade fungicida direta sobre Pb e de produção H₂O₂

A PCM-Infecção Apresenta Baixos Níveis de IL-10 Associados com Elevada Produção de IFN- γ

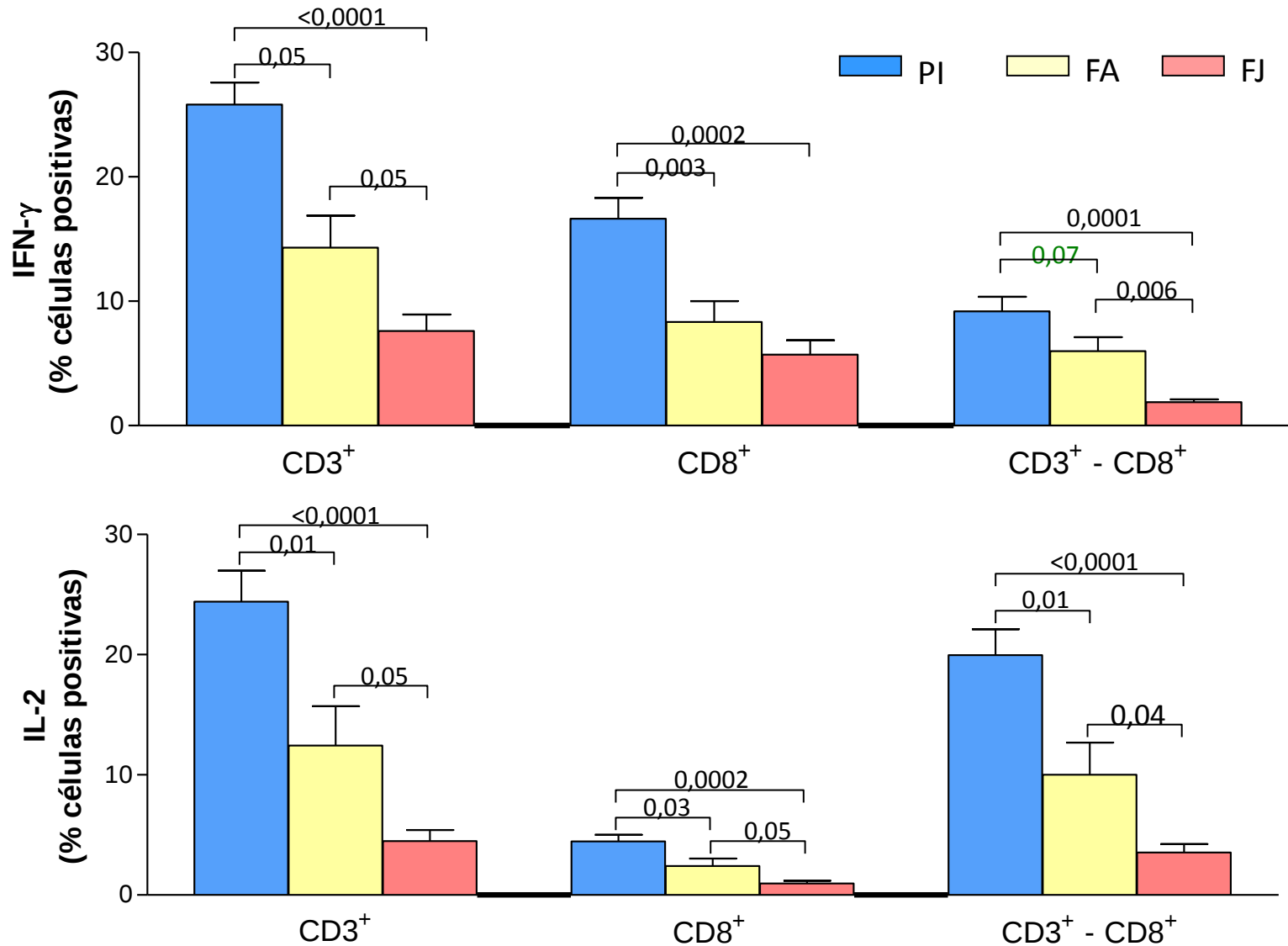


Cinética da expressão do RNAm para citocinas: PCM Infecção=Th1; F. Adulta=Mista; F. Juvenil=Th2/Th3



Produção de Citocinas por Citometria de Fluxo

Blotta e Mamoni, Cytokine, 2006, 36:207-16

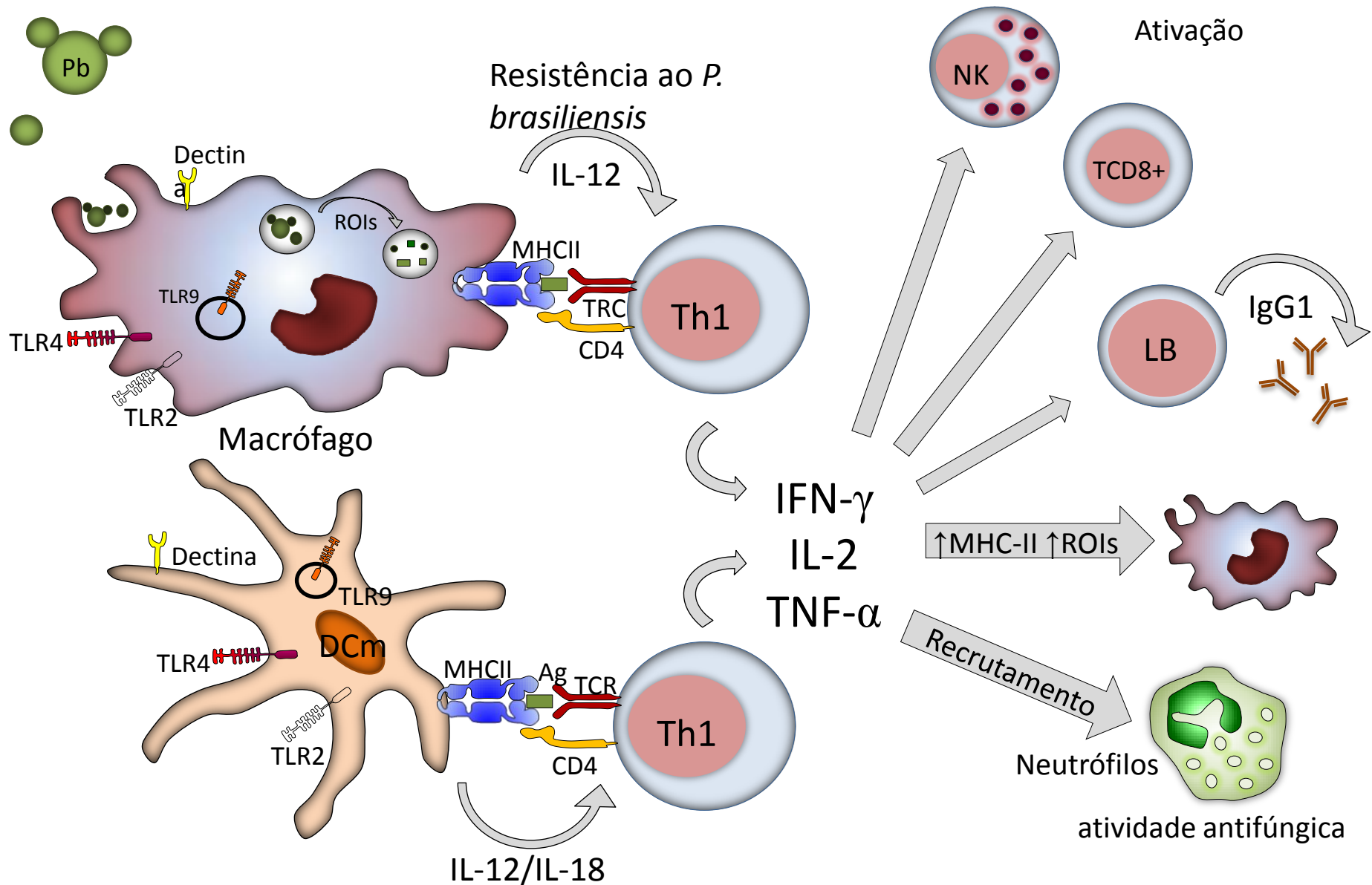


Resposta imune na PCM humana

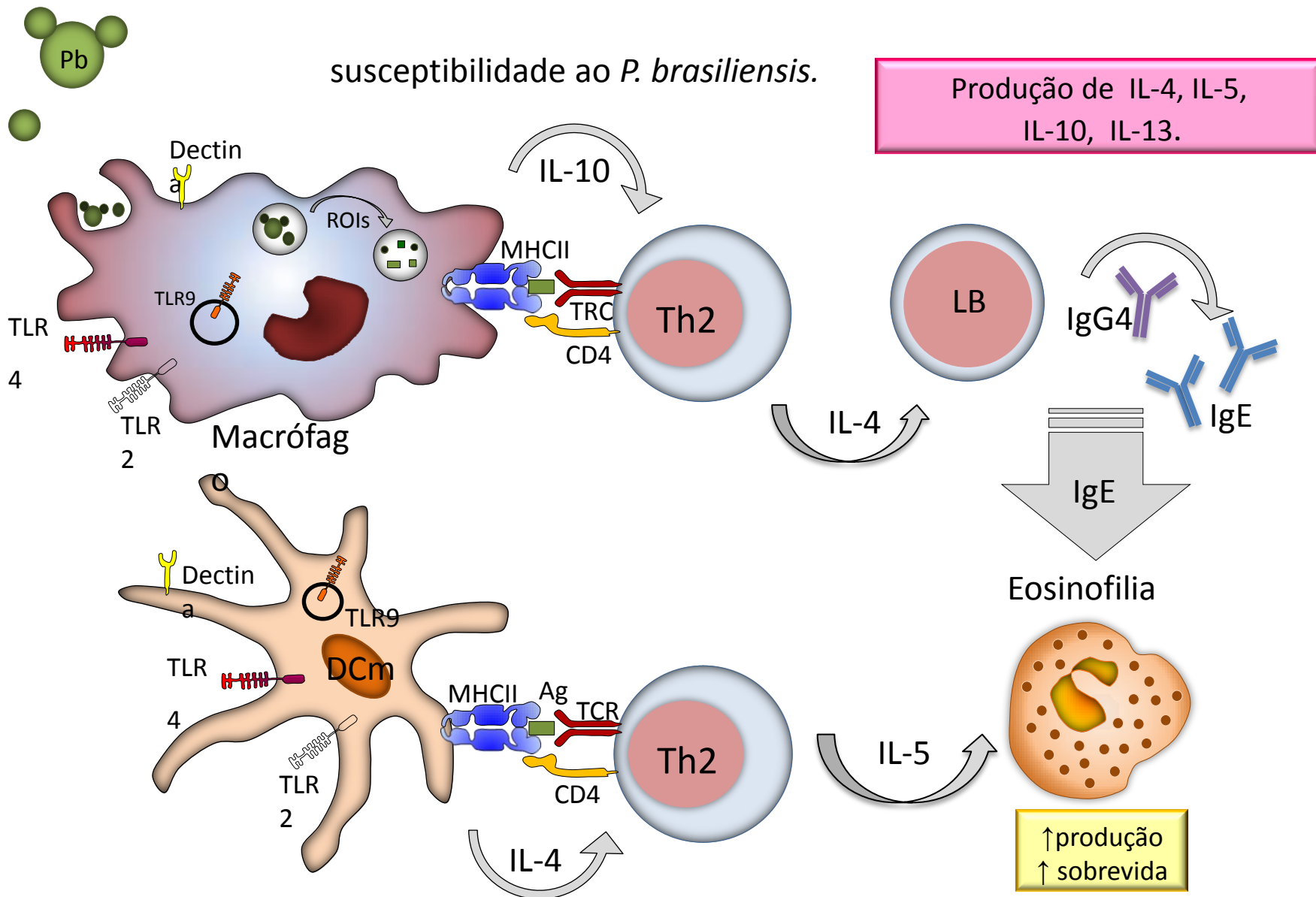
	Forma Juvenil	Forma Adulta	Infecção
Linfoproliferação	baixa	variável	alta
HTT	negativo	variável	positivo
Anticorpos	↑IgG4, IgE	± IgG1	ausentes
Citocinas	IL-4, IL-5, IL-10, TGF-β	IFN-γ, IL-10, IL-8, TNF-α,	IFN-γ, IL-2 TNF-α
Nº Eosinófilos	aumentado	normal	normal

Th2  **Th1**

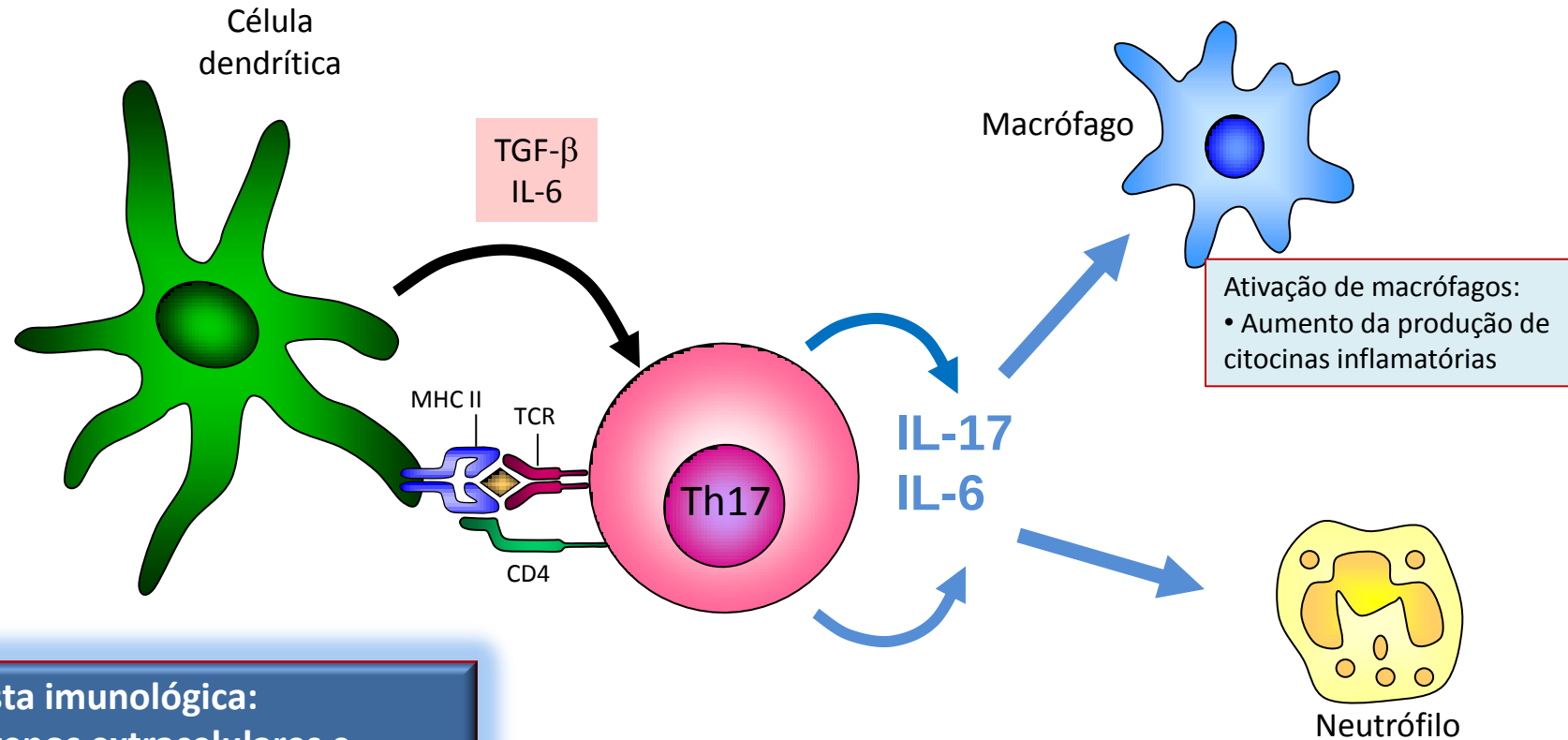
Resposta Th1- PCM-infecção



Resposta Th2 forma aguda ou juvenil



Linfócitos Th17



Resposta imunológica:

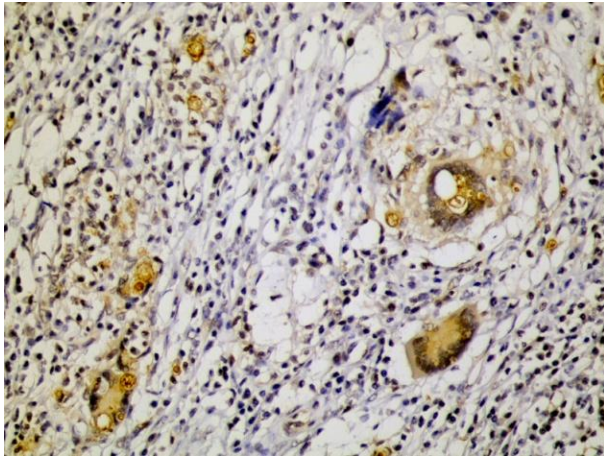
- Patógenos extracelulares e intracelulares (Fungos)

Resposta patológica:

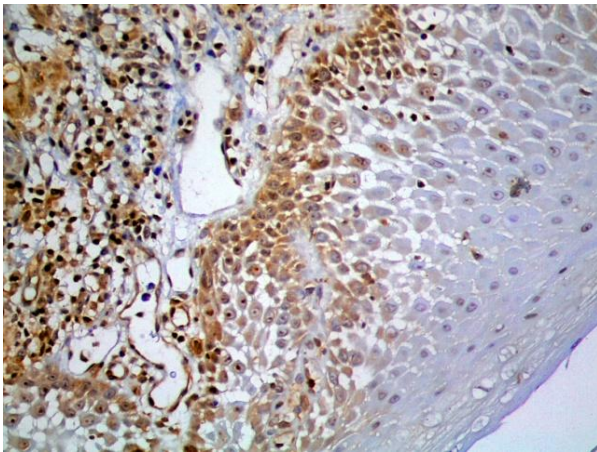
- Resposta inflamatória exacerbada
- Indução de autoimunidade

- Aumento da produção na M.O.
- Aumento migração
- Aumento da sobrevivência
- Ativação

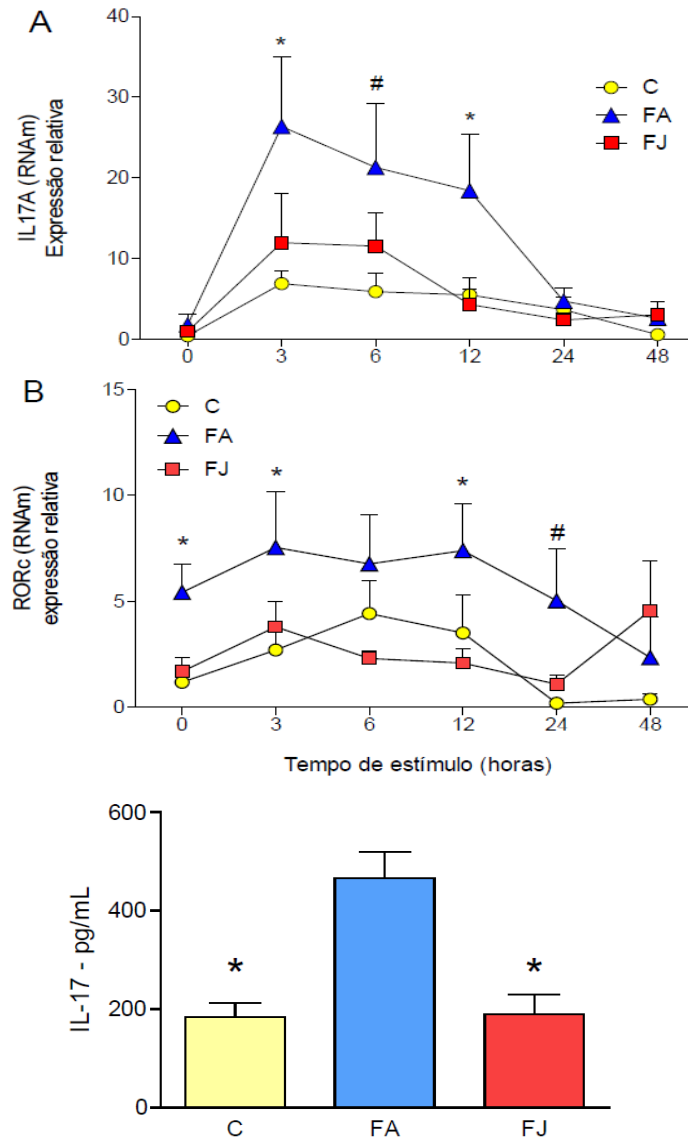
IL-17 na paracoccidioidomicose: Maior expressão na Forma Adulta



Linfonodos

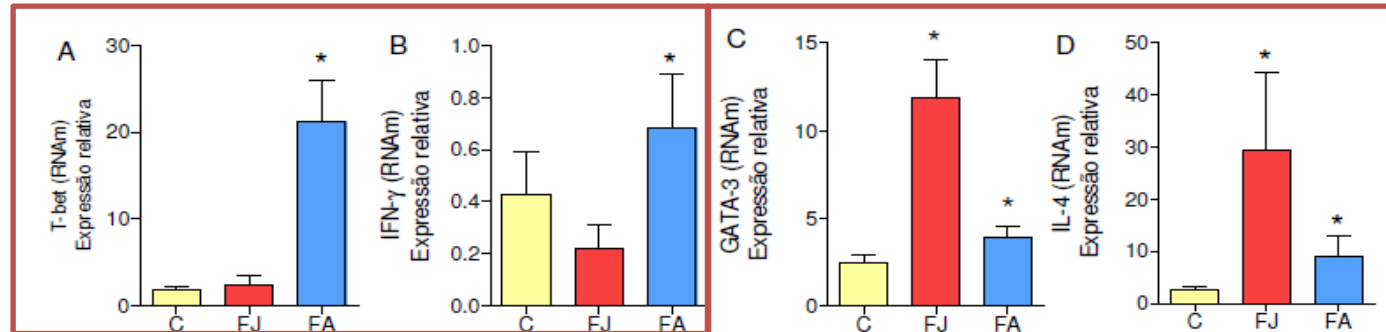


Mucosa oral

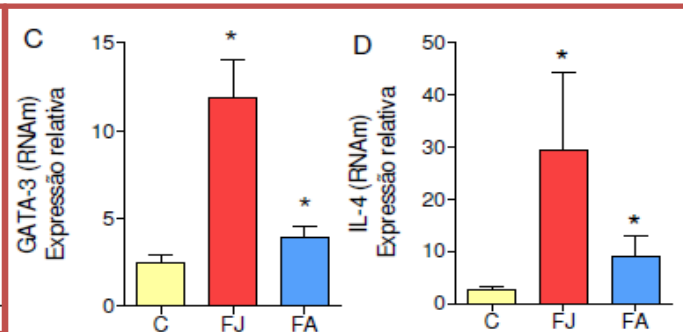


Expressão gênica de citocinas e fatores de transcrição associados às respostas Th1, Th2, Th9, Th17 e Th22 em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com PCM e controles

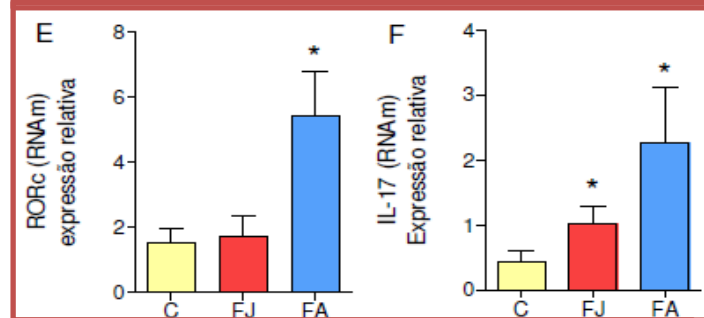
Th1



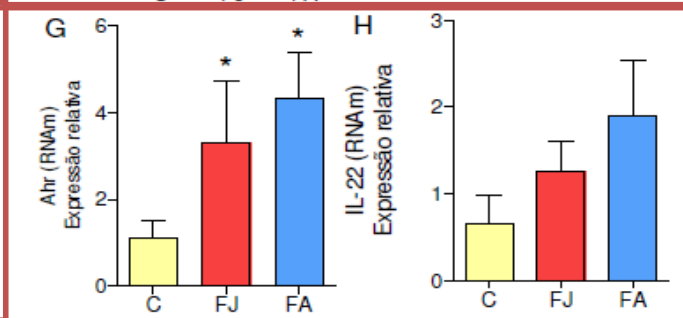
Th2



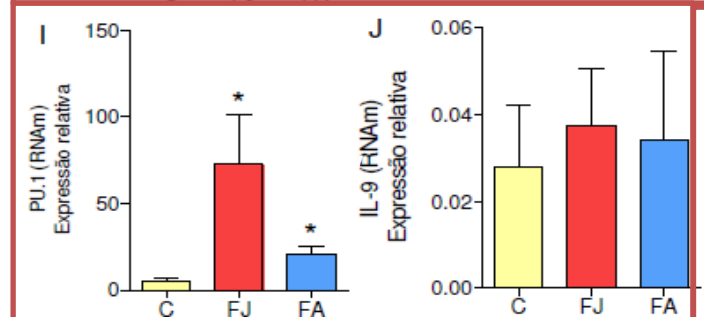
Th17



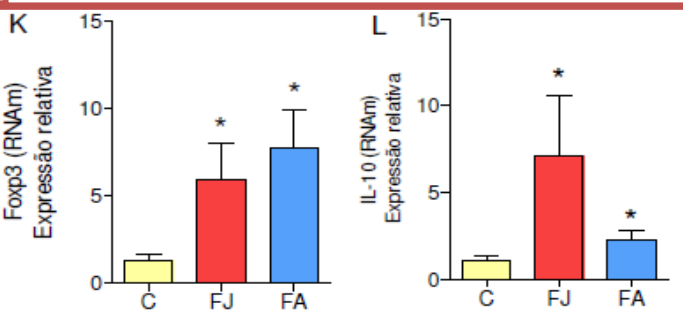
Th22



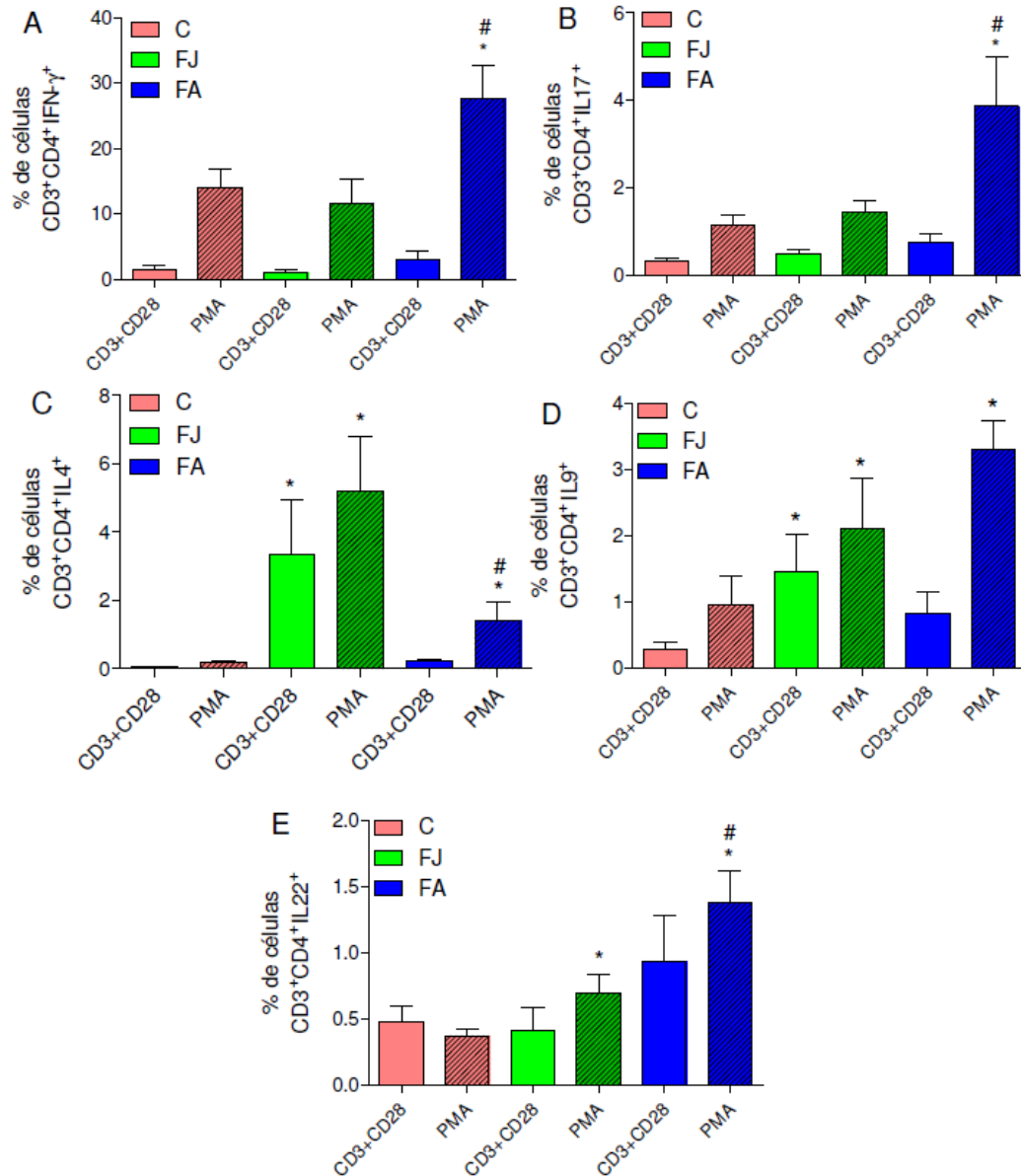
Th9



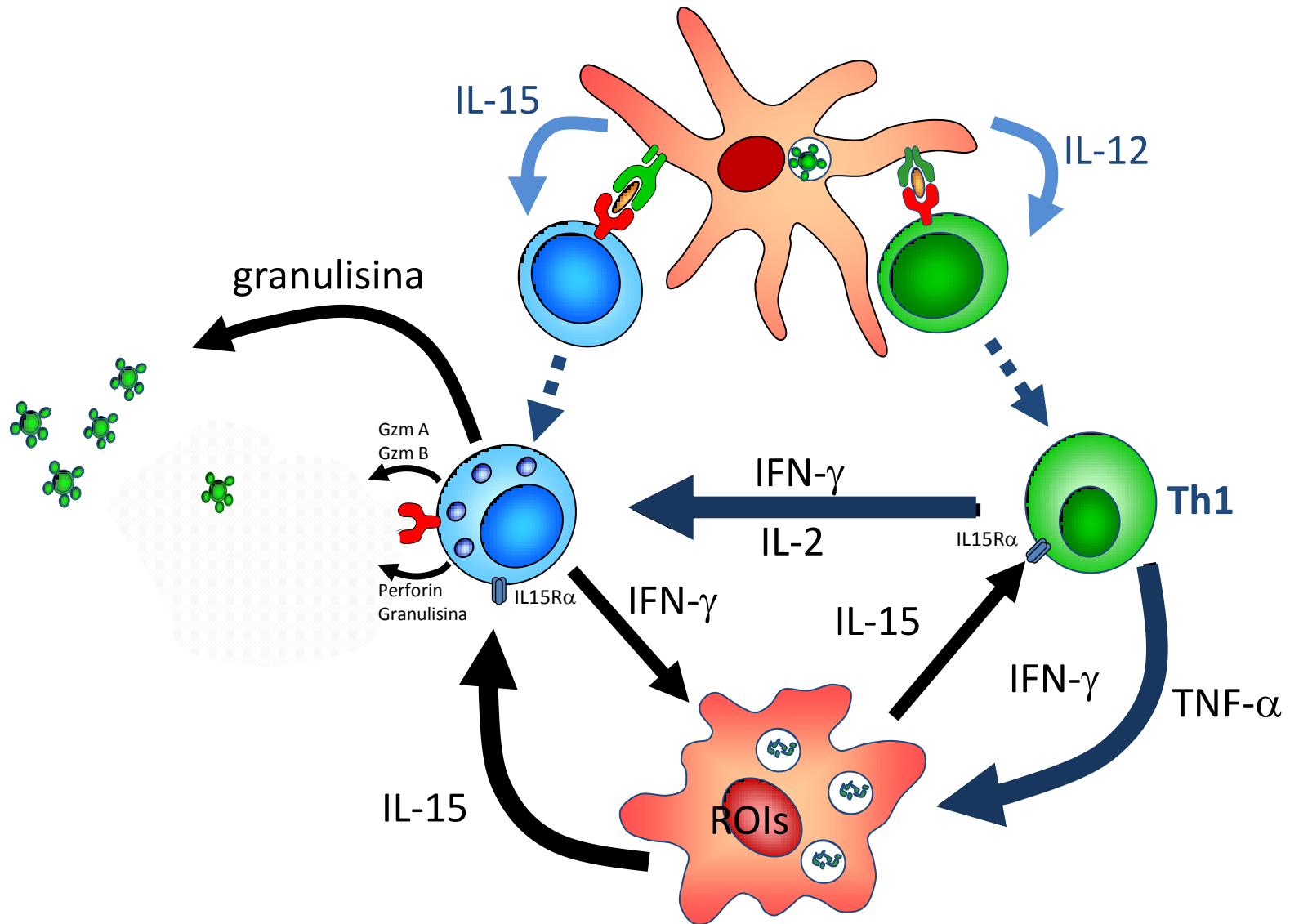
Treg



Produção de citocinas por células T CD4⁺ do sangue periférico de pacientes com PCM e controles

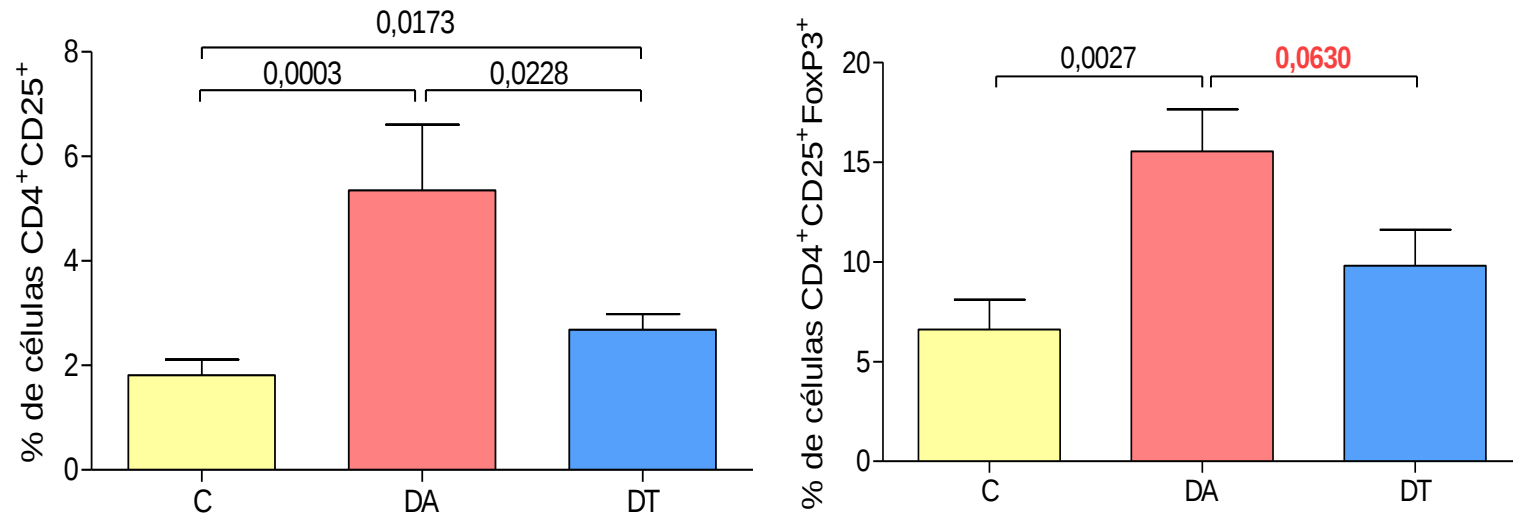


Papel dos Linfs T CD8+ na PCM



Papel das Células Treg na PCM

DA=Doença Ativa
DT= Doença Tratada



Pacientes com PCM ativa

- Nº mais elevado de células T CD4⁺ CD25⁺ com fenótipo de célula Treg (FoxP3⁺, CTLA4⁺) e com atividade supressora
- Atividade supressora: contato e produção de citocinas inibitórias (**IL-10 e TGF- β**)

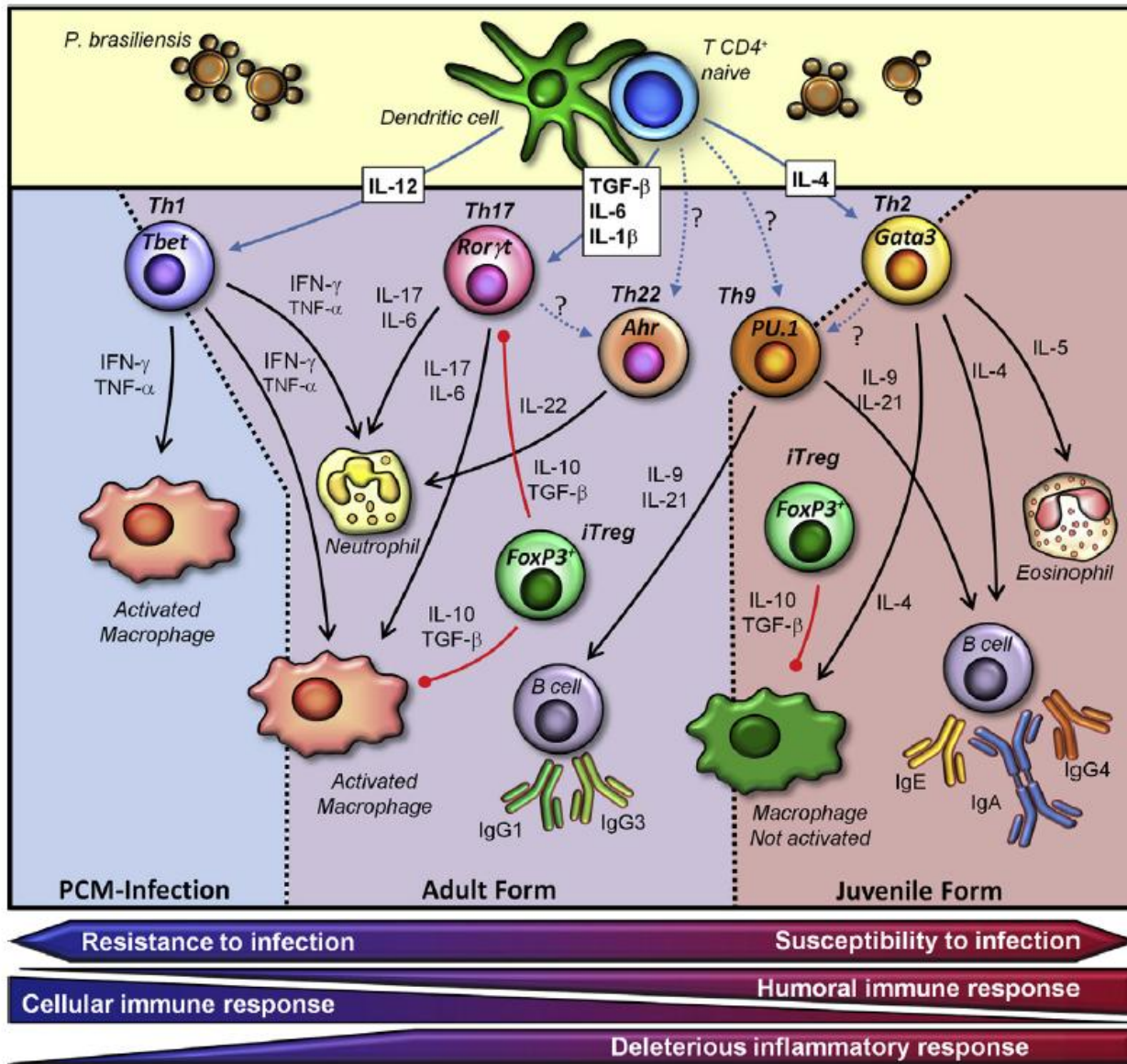
Duplo Papel da Cels Treg em Modelos Experimentais de PCM Pulmonar

- ✓ A infecção pelo *P. brasiliensis* induz a expansão e afluxo de cels Treg naturais (nTreg) e induzidas (iTreg) ao sítio da infecção
- ✓ Cels Treg atuam através de produção elevada de TGF- β , IL-10, ectonucleotidases e indução de produção de IDO
- ✓ **Efeito Protetor:** diminuem afluxo e ativação de cels de imunidade inata e adaptativa causando menor dano tecidual
- ✓ **Efeito deletério:** Restringem mecanismos efetores de imunidade inata e adaptativa permitindo o crescimento descontrolado do fungo e patologia mediada pelo patógeno
- ✓ A função das cels Treg depende da fase da doença e do patrimônio genético dos hospedeiros

Loures et al. J. Immunol., 2009; Loures et al. Infect. Immun., 2010, Loures et al. Infect Immun., 2011, Felonato et al., Infect. Immun., 2010; Felonato et al. PLoS Negl. Trop. Dis., 2013, Araújo, et al., PLoS Negl. Trop. Dis. 2014; Bazan, et al. PLoS Negl. Trop. Dis., 2015

Adaptive immunity in the different forms of Human PCM

These heterogeneous responses suggest that innate immune cells use many combinations of PRRs to sense *P. brasiliensis* infection, resulting in so diverse patterns of immunity and disease severity.



Agradecimentos:

Maria Heloísa Blotta e Ronei Luciano Mamoni

Equipe do Lab. De Imunologia Celular e Molecular da Fac. De Medicina da Unicamp
Pela contribuição e documentação das investigações em humanos

Vera Calich; Cláudia Feriotti; Eliseu F. Araújo; Silvia B Bazan e Tania A. Costa, Adriana Pina, Maíra Felonato, Simone Bernardino

Laboratório de Imunologia das Micoses ICB-USP
Pelos trabalhos de investigação em modelos experimentais