

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS*  
DE FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE,  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM  
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

**VANESSA CECATTO**

**ANÁLISE DA EVOLUÇÃO PATOLÓGICA DA  
PARACOCCIDIOIDOMICOSE PULMONAR EXPERIMENTAL APÓS  
INIBIÇÃO DO RECEPTOR P2X7**

FRANCISCO BELTRÃO – PR  
(MARÇO/2019)

**VANESSA CECATTO**

**ANÁLISE DA EVOLUÇÃO PATOLÓGICA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE  
PULMONAR EXPERIMENTAL APÓS INIBIÇÃO DO RECEPTOR P2X7**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Alexandre Loth

FRANCISCO BELTRÃO – PR  
(MARÇO/2019)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Cecatto, Vanessa

Análise da evolução patológica da paracoccidioidomicose pulmonar experimental após inibição do receptor P2x7 / Vanessa Cecatto; orientador(a), Eduardo Alexandre Loth, 2019.

79 f.

Dissertação (mestrado profissional), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, 2019.

1. Paracoccidioidomicose pulmonar. 2. Receptor P2x7. 3. Brilliant Blue G. 4. Patologia. I. Loth, Eduardo Alexandre . II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

**VANESSA CECATTO**

**ANÁLISE DA EVOLUÇÃO PATOLÓGICA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE  
PULMONAR EXPERIMENTAL APÓS INIBIÇÃO DO RECEPTOR P2X7**

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e pela Banca Examinadora.

**BANCA EXAMINADORA**

Orientador (a): Prof. Dr. Eduardo Alexandre Loth  
UNIOESTE

Membro da banca: Prof. Dr. João Paulo Amorin  
UNIOESTE

Membro da banca: Prof (a). Dr (a). Lilian Cristiane Baeza  
UNIOESTE

FRANCISCO BELTRÃO, PR  
Março/2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que nunca me deixou caminhar sozinha, e que foi o meu amparo em momentos em que eu, na minha ignorância, achava que não era seria capaz.

Agradeço imensamente à minha família. Agradeço à minha mãe Marlene, guerreira, conselheira. Agradeço ao meu pai Claudemir (*in memorium*) que me ensinou valores e lições, que levarei comigo para sempre e que me serviu de inspiração para lutar a cada dia pelos meus objetivos. Agradeço à minha irmã por todo apoio e torcida, por ouvir minhas lamentações e me ajudar sempre que preciso. Ao meu marido Pedro, meu amor, que se fez presente em cada momento dessa etapa, que pacientemente me esperou e entendeu a minha falta de tempo nesta caminhada. E, principalmente, soube trazer tranquilidade nos momentos de desespero.

Agradeço de coração a todos os professores e colaboradores desse programa maravilhoso, onde me senti acolhida, onde aprendi e cresci. Obrigada por me mostrarem o caminho e compartilhar comigo um pouco do conhecimento de vocês, com certeza vocês fizeram toda a diferença. Agradeço em especial ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Alexandre Loth, por quem eu tenho imensa admiração, por apontar os caminhos e pacientemente corrigir os meus passos. Obrigada por me mostrar, há muito tempo atrás, o que era o mundo da pesquisa, você teve influência essencial para o sucesso deste trabalho e de toda minha caminhada científica. Agradeço também a toda equipe dos laboratórios que, de alguma forma, auxiliaram na execução deste trabalho, sem essa ajuda isso não seria concretizado.

E por fim, aos meus amigos, colegas da primeira e melhor turma do mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde, obrigada por cada momento compartilhado. Vocês foram demais, formamos uma bela equipe, nos desesperamos juntos, superamos dificuldades, fizemos “motins”, e chegamos lá juntos, alcançamos o nosso objetivo.

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu pai, que apesar de não estar aqui para presenciar esse momento, teve muita influência nessa conquista. Ele, com a sua simplicidade, talvez jamais imaginasse que eu chegaria até aqui, mas com certeza estaria muito feliz por essa vitória.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Imagem do dimorfismo do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Em “A” a representação gráfica da forma de Micélio e em “B” a levedura com multibrotamentos. Em “C” a levedura por Coloração Grocott..... 17
- Figura 2 Distribuição da PCM na América Latina..... 19
- Figura 3 Fotomicrografia to tecido pulmonar de rato Wistar com a presença de um granuloma maduro de Pb, coloração de Hematoxilina Eosina. As setas indicam a presença do P. brasiliensis dentro de grauloma..... 21
- Figura 4 Características clínicas da forma aguda da PCM. (A): lesão frontal e clavicular; (B): comprometimento linfático supurado; (C): linfadenomegalia inguinal; (D): representação da hepatomegalia e ascite abdominal..... 23
- Figura 5 Características clínicas da forma crônica da Paracoccidioidomicose: (A): lesões papulosas e úlcero-crostosas na face; (B): radiografia de tórax com opacidades nodulares e micronodulares difusas. (C): Linfadenomegalia cervical e submandibular, fistulizadas; (D): Lesão vegetante com bordos irregulares em região perianal..... 24
- Figura 6 Imagem radiológica Imagem radiológica na Paracoccidioidomicose Pulmonar demonstrando o acometimento interstício-alveolar em forma de “asa de borboleta”..... 24
- Figura 7 Fotomicrografia dos cortes histológicos dos pulmões dos animais dos grupos utilizados: A – estrutura íntegra com alvéolos preservados, ausência de processo inflamatório em um animal do Grupo Controle

Absoluto (coloração por hematoxilina-eosina, HE, 4 x). B – Presença de granulomas epidermóides organizados na margem do pulmão, indicados pelas setas e parênquima pulmonar com discreto infiltrado inflamatório em um animal do grupo 50 mg/ml (HE, 4x). C – Presença de granuloma observado aderido isoladamente na borda externa do pulmão em um animal do grupo tratado com BBG 50 mg/ml, indicado pela seta (HE, 4x). D – indica pequeno granuloma epidermóide, visto em maior aumento, aderido isoladamente na borda externa do pulmão em um animal do grupo BBG 100 mg/ml. A setas indicam as células gigantes do tipo Langerhans (HE, 20x). E - Demonstra pequeno granuloma epidermóide dentro do parênquima pulmonar, observado em um animal do grupo BBG 150 mg/ml, destacado pela seta (HE, 4X). F – Demonstra a presença de diversos granulomas apontados pelas setas, no corte histológico do pulmão de um animal do CGN (HE, 4x)..... 61

Figura 8 Titulação de anticorpos anti-Gp43 pelo método ELISA: Não houve diferenças na produção de anticorpos anti-Gp43 de Pb entre os grupos experimentais. Ao comparar os grupos experimentais e o GCN foi se observa diferenças estatisticamente significativas, com valores efetivamente menores nos grupos que receberam o tratamento com BBG..... 62



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATP - Adenosina Trifosfato;
- BBG - Brilliant Blue G;
- CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais;
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação;
- ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay;
- GCA - Grupo controle Absoluto;
- GCN - Grupo Controle Negativo;
- GE100 - Grupo Experimental tratado com 100mg/kg de Brilliant Blue G;
- GE150 - Grupo Experimental tratado com 150mg/kg de Brilliant Blue G;
- GE50 - Grupo Experimental tratado com 50mg/kg de Brilliant Blue G;
- GP-43 - Glicoproteína 43;
- IL - Interleucina;
- INF $\gamma$  - Interferon Gama;
- LABEF - Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional;
- LACEPE - Laboratório de Análises Clínicas, Ensino, Pesquisa e Extensão;
- LME - Laboratório de Microbiologia Experimental;
- Pb - *Paracoccidioides brasiliensis*;
- P. brasiliensis* - *Paracoccidioides brasiliensis*;
- P2X - Receptor Purinérgico da família X;
- P2x7r - Receptor Purinérgico P2x7;
- Pb - *Paracoccidioides brasiliensis*;
- PBS - Solução tampão fosfato-salina;
- PBS L - PBS + leite desnatado 5%
- PBS T - PBS + Tween 20 0,1%;
- PCM - Paracoccidioidomicose;
- PMN - Leucócitos Polimorfonucleares;
- TNF $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral Alfa;
- UNIOESTE - Universidade Estadual do Oeste do Paraná;

## **Análise da evolução patológica da paracoccidioidomicose pulmonar experimental após inibição do receptor P2x7**

### **Resumo**

**Introdução:** A Paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica mais prevalente da América Latina causada pelo fungo do gênero *Paracoccidioides* spp. Os estados das regiões Sul e Sudeste do Brasil concentram a maior parte dos casos desta doença, destacando-se o Paraná com a maioria das mortes por PCM da região Sul. Essa micose sistêmica gera um grave problema de saúde pública pelo seu potencial incapacitante e afeta principalmente os pulmões. Por vezes, o tratamento desta doença torna-se longo e de difícil continuidade. Evidências apontadas pela literatura demonstram efeitos benéficos da inibição do receptor P2X7 em processos inflamatórios. Este trabalho objetivou avaliar os efeitos da inibição do receptor P2X7, através da utilização do corante *Brilliant Blue G* (BBG), no modelo experimental de paracoccidioidomicose pulmonar. **Metodologia:** Foram utilizados 30 ratos machos, distribuídos em cinco grupos: Grupo controle absoluto, Grupo controle negativo, Grupo experimental 50, Grupo experimental 100, grupo experimental 150. Os quatro últimos grupos sofreram indução do modelo experimental de PCM pulmonar, porém, apenas os animais dos grupos experimental 50, 100 e 150 receberam aplicação intraperitoneal de BBG a cada 48 horas, após o sétimo dia de infecção, nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg respectivamente, para a inibição da atividade do receptor P2X7. Para analisar os efeitos da terapia proposta foi avaliado histologicamente o tecido pulmonar dos ratos e dosado o anticorpo anti-gp43 através do método ELISA. **Resultados:** As biópsias pulmonares dos animais tratados com BBG apresentaram diminuição significativa do número e da área dos granulomas, em relação ao grupo não tratado. Além disso ao comparar os grupos foi possível observar valores efetivamente menores do anticorpo anti-gp43 nos grupos que receberam o tratamento com BBG. **Conclusões:** O tratamento com BBG foi capaz de reduzir o número e área de granulomas nos tecidos pulmonares e os níveis do anticorpo anti-Gp43 de Pb, atenuando a Paracoccidioidomicose pulmonar no modelo experimental utilizado.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidioidomicose pulmonar, Receptor P2x7, *Brilliant Blue G*.

## Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis progression after P2x7 receptor inhibition

### Abstract

**Introduction:** Paracoccidioidomycosis, caused by a fungus in the genus *Paracoccidioides*. The states of the South and Southeastern regions of Brazil concentrate most of the cases of this disease, highlighting Paraná with the majority of PCM deaths in the South. This systemic mycosis generates a serious public health problem due to its incapacitating potential and affects especially the lungs. Sometimes the treatment of this disease becomes long and difficult to continue. Previous studies demonstrated that inhibition of the P2X7 receptor has beneficial effects against the disease. This study was conducted to assess the effects of P2X7 receptor inhibition by brilliant blue G (BBG) dye in a pulmonary paracoccidioidomycosis experimental model. **Methods:** Thirty male rats were divided into five groups: absolute control group, negative control group, experimental group 50, experimental group 100, and experimental group 150. The last four groups underwent experimental induction of pulmonary paracoccidioidomycosis; however, only the brilliant blue G experimental groups 50, 100, and 150 were administered BBG intraperitoneally every 48 h at doses of 50, 100, and 150 mg/kg respectively, to inhibit P2X7 receptor activity. To assess the effects of this treatment, lung tissue was analyzed histologically and the levels of the anti-gp43 antibody were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** Lung biopsies of the animals treated with BBG exhibited a significant reduction in the number and area of granulomas. In addition, comparing the groups, it was possible to observe effectively lower anti-gp43 antibody values in the groups receiving BBG treatment. **Conclusions:** Treatment with BBG reduced the number and area of granulomas in the lung tissue and levels of anti-gp43 antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis*, thereby mitigating pulmonary paracoccidioidomycosis in the experimental model.

**Keywords:** *Paracoccidioides brasiliensis*, Pulmonary paracoccidioidomycosis, P2x7 receptor. Brilliant Blue G.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	14
1.1 fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	15
1.2 A Paracoccidioidomicose .....	18
1.2.1 Paracoccidioidomicose Pulmonar .....	22
1.3 O Receptor P2X7 e o <i>Brilliant Blue G</i> .....	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	29
2.1 Geral.....	29
2.2 Específicos .....	29
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	30
3.1 Local de Realização do Estudo .....	30
3.2 Procedimentos e Divisão dos Grupos Experimentais.....	30
3.3 Procedimentos histológicos .....	31
3.4 Teste de ELISA .....	32
3.3 Análise Estatística.....	33
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	34
<b>5. ANÁLISE DA EVOLUÇÃO PATOLÓGICA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE PULMONAR EXPERIMENTAL APÓS INIBIÇÃO DO RECEPTOR P2X7</b> .....	45
<b>5.1 INTRODUÇÃO</b> .....	45
<b>5.2 MÉTODOS</b> .....	47
<b>5.3 RESULTADOS</b> .....	50
<b>5.4 DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>5.5 CONCLUSÃO</b> .....	55
<b>5.6 REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>5.7 FIGURAS</b> .....	61
<b>6. ANEXOS</b> .....	63

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A Paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica mais prevalente da América Latina causada por fungos do gênero *Paracoccidioides spp*, dentre eles o *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). Cerca de 80% dos casos são relatados no Brasil, seguido por outros países como a Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina (RESTREPO et al., 2011; COLOMBO et al., 2011). Os estados das regiões Sul e Sudeste do país concentram a maior parte dos casos desta doença, destacando-se o Paraná com 53,2% das mortes por PCM da região Sul (LACAZ et al., 2002; RESTREPO et al., 2011).

Um levantamento apontou 2.169 casos relatados de PCM de 1966 a 2009, na região Sul, com média de 140,6 casos por ano (MARTINEZ, 2015). Outro dado, referente à região do Lago de Itaipu, oeste do Paraná, relatou 102 novos casos da doença em apenas 18 meses de acompanhamento do estudo (LOTH, et al., 2011).

Estima-se que o número de pessoas afetadas pela PCM seja ainda maior que o conhecido, fato que coloca essa micose no grupo de doenças negligenciadas, o que leva a crer que os seus danos são ainda maiores (MARTINEZ, 2010).

Devido ao potencial incapacitante da PCM, esta doença é designada como um grave problema de saúde pública, pois acomete predominante indivíduos na fase mais produtiva da vida (MARTINEZ, 2010). Alguns fatores ainda acentuam o problema da PCM, como a demora do diagnóstico, a evolução silenciosa da doença e a dificuldade de acesso aos serviços de saúde, além da semelhança com outras doenças granulomatosas (MARQUES, 2012; MARTINEZ, MOYA, 2009).

Os agentes patogênicos da PCM são sensíveis à maioria das drogas antifúngicas sistêmicas disponíveis atualmente para combater a PCM (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018; MARTINEZ, 2006). Porém a adesão dos pacientes é baixa devido ao prolongado tempo de tratamento (TRAVASSOS, TABORDA, COLOBO, 2008). Dessa forma os pacientes acometidos devem ser acompanhados até apresentarem evidências de cura. Não obstante, os pacientes com PCM estão sujeitos a reativação tardia do fungo (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

O receptor P2x7 (P2x7r) é um receptor purinérgicos da membrana celular, ativado por ATP, e expresso em muitas células e tecidos humanos (JIANG, 2009;

ABBACCHIO et al., 2012; GERAGHTY et al., 2016). Esse receptor está envolvido em diversos processos fisiopatológicos tais como a apoptose, necrose e a resposta inflamatória, além da morte de agentes infecciosos (VOLONTÉ et al., 2012).

Evidências sugerem que a inibição do P2x7r pode levar a atenuação do perfil inflamatório e ao melhor prognóstico de doenças como a tuberculose e a inflamação pulmonar (AMARAL et al., 2014; MONÇÃO-RIBEIRO et al., 2014). O *Brilliant Blue G* (BBG) é um corante alimentar utilizado em testes biológicos capaz de bloquear de forma seletiva o P2x7r. Devido as suas características ele é considerado um potente agente farmacológico (SOARES-BEZERRA et al., 2015).

Levando em consideração as altas taxas de abandono do tratamento e as dificuldades enfrentadas pelos pacientes com PCM é necessário a investigação de novas formas de tratamento para atuarem como auxiliares à terapêutica já proposta, melhorando o prognóstico dos pacientes com PCM.

### 1.1 fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

O *P. brasiliensis* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae, gênero *Paracoccidioides* e epíteto específico *brasiliensis* (TEIXEIRA et al., 2014).

Após análises moleculares e morfológicas de diferentes isolados, foi proposto que o gênero *Paracoccidioides* abrange cinco espécies filogenéticas: *Paracoccidioides brasiliensis*, que compreende um complexo de cinco grupos (S1a, S1b, PS2, PS3 e PS4) e *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*) que inclui o isolado Pb01-like. (CARRERO et al., 2008; MATUTE et al., 2006; MUÑOZ et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2009; TURISSINI et al., 2017). Recentemente também foi recomendado adotar a nomenclatura de *P. americana* para PS2, *P. restrepiensis* para PS3 e *P. venezuelensis* para PS4 e restringir o uso de *P. brasiliensis* para S1 (TURISSINI et al., 2017).

As linhagens filogenéticas de *P. brasiliensis*: S1a e S1b são encontradas principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, Argentina e Paraguai; PS2 - encontrada no Brasil e na Venezuela; e os grupos PS3 e PS4 tem sido recuperados na Colômbia e Venezuela (MUÑOZ et al., 2016; MATUTE et al., 2006; MACEDO et al., 2016). Todas as espécies são patogênicas, capazes de induzir a micose em

hospedeiros humanos ou em animais silvestres, porém a espécie PS2 é a que apresenta menor virulência dentre os isolados (BAGAGLI et al., 2006; SAN-BLAS; BURGER, 2011). Posteriormente também foi descrito uma nova espécie a *Paracoccidoides lutzii* (TEIXEIRA et al., 2014). Apesar das diferenças genéticas, a patogênese e as manifestações da doença de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* são muito parecidas (TEIXEIRA et al., 2009).

Diferenças genéticas foram encontradas em análises do *P. brasiliensis*, indicando achados haploides e diploides, apesar disso, o fungo tem no seu genoma de 23 a 31 mega-bases dispostas em quatro ou cinco cromossomos (FEITOSA et al., 2003).

Além de humanos, o fungo já foi isolado em animais domésticos e silvestres como tatus que são considerados reservatórios do fungo, uma vez que o Pb pode ser recuperado a partir dos seus órgãos internos ou mesmo no solo em que carrega em suas patas (THEODORO, 2005; CONTI-DIAZ, 2007).

*P. brasiliensis* caracteriza-se por ser termodimórfico, alterando a apresentação de acordo com a temperatura em que é exposto (LACAZ et al., 2002). O fungo adota formas de micélios em temperaturas de 24° a 25° C, encontrados no meio ambiente, os quais formam esporos ou conídios infectantes. A forma de levedura é assumida em temperaturas de 36° a 37° C, encontrada *in vitro* ou em animais de sangue quente, trata-se da forma patogênica, responsável pela doença propriamente dita (NEVES; BOGLIOLO, 1951; WANKE; LONDERO, 1994; THEODORO, 2005; SAN BLAS; NIÑO-VEGA, 2008).

Os Micélios são filamentos ramificados chamadas de hifas, as leveduras são formadas por uma célula-mãe central de maior tamanho, com células menores ao redor, chamadas de brotamentos, apresentação comumente denominada de “roda de leme” ou “Mickey Mouse” (QUEIROZ-TELLES, 1994; RESTREPO-MORENO, 2003; MARTINEZ; MOYA, 2009). A figura 01 mostra as apresentações do fungo nas formas de hifas e leveduras.



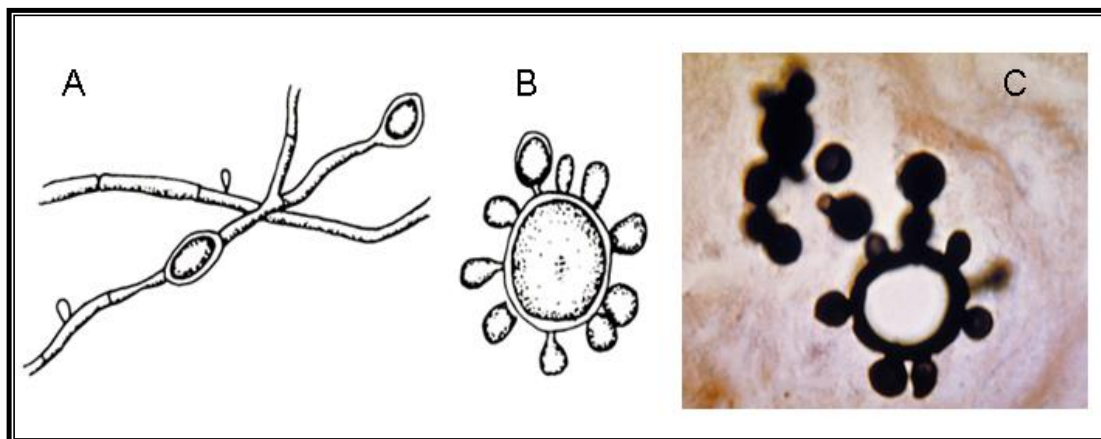


Figura 01. Imagem do dimorfismo do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Em "A" a representação gráfica da forma de Micélio e em "B" a levedura com multibrotamentos. Em "C" a levedura por Coloração Grocott. Fonte: disponível em: <<http://atlasmicologico.blogspot.com.br/p/sistemicas.html>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

Esse dimorfismo envolve alterações estruturais de carboidratos da parede celular e reorganização dos lipídeos da membrana fúngica (TOLEDO et al., 1999). Esse processo morfogenético é reversível e configura grande vantagem patogênica para Pb, implicando na capacidade de adaptação às mudanças ambientais e permitindo a sobrevivência do fungo nos tecidos hospedeiros (RESTREPO et al., 2011; SAN BLAS; BURGER, 2011). Essa capacidade de alteração de forma está fortemente ligada à sua patogenicidade, já que, cepas isoladas de Pb que são incapazes de adotar as formas de leveduras não produzem a doença (ROONEY; KLEIN, 2002; BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

O fungo é um patógeno eucarionte e semelhante a outros fungos patogênicos, possui como principal componente da sua parede celular a quitina. Outro componente importante é o polissacarídeo alfa-1,3-glicano que se mostra como fator importante da alteração de fases e da patogenicidade do fungo, uma vez que ele está presente apenas na parede celular da levedura, sendo que na fase de micélio, é observado apenas o polissacarídeo beta-1,3-glicano (SAN-BLAS; SAN-BLAS, 1994; SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002). O fato das células humanas não apresentarem quitina, nem esse polissacarídeo citado, somado a característica essencial que eles apresentam à vida do fungo, fazem desses compostos alvos no desenvolvimento de novas drogas antifúngicas (SAN BLAS; NIÑO-VEGA, 2008).

O beta-1,3-glicano mostrou ser uma molécula imunoestimuladora, sendo reconhecido por muitas células imunológicas de mamíferos. A redução drástica deste carboidrato na parede celular da levedura do *Paracoccidioides* e a super-expressão de alfa-1,3-glicano como camada externa pode indicar um mecanismo de resistência do fungo, evitando o reconhecimento por parte do hospedeiro (ARANTES et al., 2015).

A capacidade de invasão e patogenicidade do fungo parecem estar ligadas as alfa-1,3 glucana, proteases e gp43, sendo que esta constitui o principal antígeno secretado pelo Pb e o mais específico no diagnóstico da doença (SILVA; SARAIVA, 2008).

## 1.2 A Paracoccidioidomicose

A PCM tem alta morbidade e prevalência na América Latina, a maior casuística é encontrada no Brasil, que detém mais de 80% dos casos, seguido da Argentina, Venezuela e Colômbia. No território Brasileiro a maior taxa endêmica se concentra nas regiões Sul e Sudeste do país (MONTENEGRO; FRANCO, 1994; BANGAGLI et al., 2006). A Figura 02 mostra a distribuição endêmica da PCM na América Latina.

No estado do Paraná as maiores taxas são relatadas na região do Lago do Itaipu, chegando ao registro de 10 óbitos a cada um milhão de habitantes por ano (PRADO et al., 2009; LOTH et al., 2011). Como trata-se de uma doença sem necessidade de notificação obrigatória, o número de pessoas infectadas pode ser ainda maior que o conhecido, enquadrando-a como uma doença negligenciada (MARTINEZ, 2010).

A infecção pelo *Paracoccidioides* acontece primariamente pelas vias aéreas, através da inalação de propágulos do fungo, que se instalam nos alvéolos pulmonares. A partir de então a evolução da PCM depende de fatores intrínsecos do hospedeiro e características do fungo, podendo o fungo ser eliminado pelo sistema imunológico do hospedeiro, causar infecção local, ou ainda se disseminar pela via linfo hematogênica (MARQUES, 2009; FRANCO et al., 1987; SAN-BLAS, 1993; CALICH et al., 1985).

Acredita-se que aproximadamente 10 milhões de indivíduos estejam infectados pelo fungo, mas apenas 2% dessas pessoas irão apresentar a doença (RESTREPO; TOBÓN, 2005; MARQUES, 2009). A partir da interação patógeno-hospedeiro no parênquima pulmonar, o fungo se transforma em levedura, que consiste em sua apresentação patogênica (FRANCO et al., 1987; MARQUES, 2009).

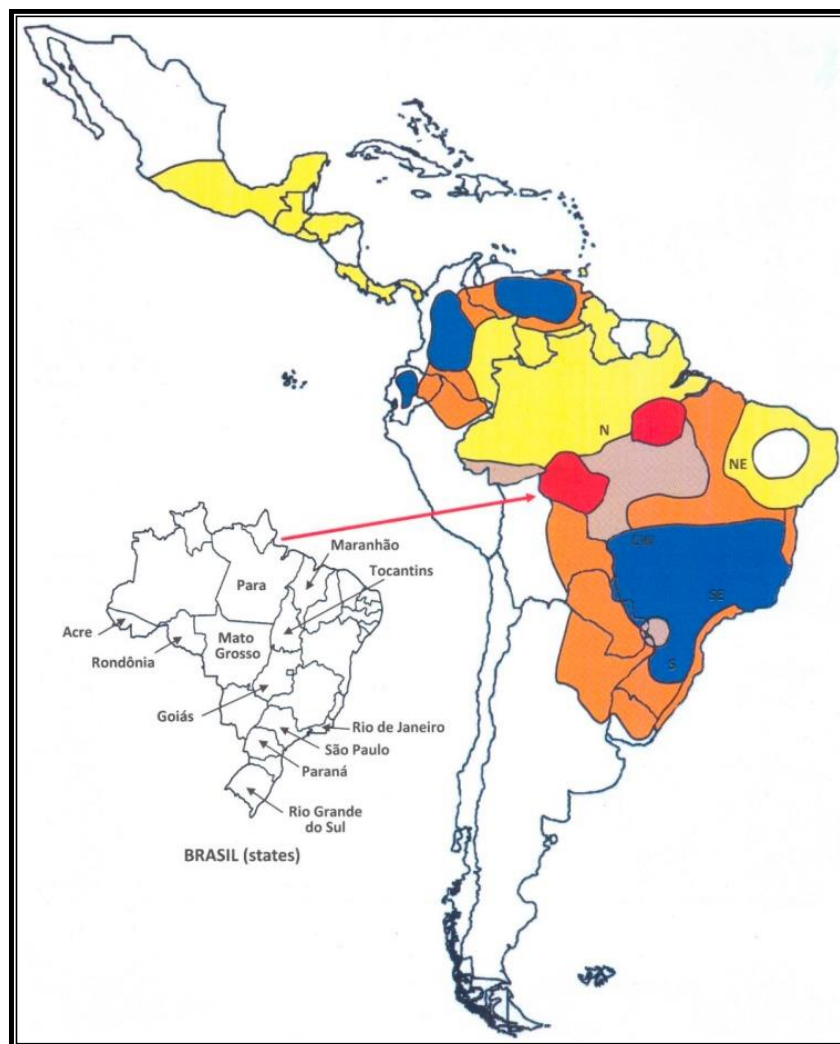


Figura 02. Distribuição da PCM na América Latina: ◆ áreas primeiramente reconhecidas de alta endemicidade; ◆ alta endemicidade nas últimas décadas do século XX; ◆ área com alguma evidência de endemicidade crescente; ◆ áreas de endemicidade moderada; ◆ baixa endemicidade; ◆ raros casos de PCM relatados. Fonte: adaptado de Martinez, 2017.

Existem outras formas possíveis de contágio como traumas na pele ou mucosas, porém, são consideradas de caráter excepcional (FERREIRA; QUEIROZ-TELLES, 2010). A transmissão entre os hospedeiros, não foi relatada, uma vez que a infecção acontece apenas quando o fungo se encontra na fase de micélio (FRANCO et al., 1987; RESTREPO, 1985).

A infecção pelo fungo é adquirida majoritariamente nas duas primeiras décadas de vida. Porém as manifestações clínicas da doença ocorrem mais frequentemente em adultos entre 30 e 50 anos devido a reativação de um foco endógeno latente do fungo (WANKE; LONDERO, 1994). Estima-se que, apenas 10% dos casos da doença aconteçam nessa primeira fase de infecção e a grande maioria restante ocorra décadas depois do primeiro contato com o fungo (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

O principal fator de risco para a infecção está relacionado ao manejo do solo contaminado principalmente nas primeiras décadas de vida, em atividades como agricultura, jardinagem, terraplenagem e afins. Entretanto, quando ocorre as manifestações da doença e a procura por assistência médica, a maioria destes pacientes já saiu da área endêmica, residindo em centros urbanos (RESTREPO, 1985; COUTINHO et al., 2002; LINDENBERG et al., 2008).

A exposição ao fungo *Paracoccidioides* acontece de forma semelhante entre homens e mulheres, porém, a PCM atinge predominante o sexo masculino, chegando a uma razão de 10 a 15 homens para uma mulher. Apesar disso, essa discrepância não acontece durante a infância, onde a distribuição da doença é uniforme entre os sexos. Esta micose traz altos custos sociais, econômicos e produtivos, uma vez que a doença se manifesta em indivíduos na faixa etária mais produtiva (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018; NEGRONI, 1993; WANKE; LONDERO, 1994; MOTA, 1996).

A presença de receptores de estrogênio na parede fúngica, capazes de bloquear a transição de fase micélio-levedura, limitando a patogenicidade do fungo, tornam as mulheres menos suscetíveis a doença (SHANKAR, et al., 2011). Além disso, a maior proporção de homens envolvidos em atividades agrícolas configura fator adicional para a predominância da doença no gênero masculino (MARTINEZ, 2017).

Observa-se também alto índice de associação com uso de álcool e tabaco. O tabagismo acarreta alterações nos mecanismos de defesa do sistema respiratório como disfunção da mecânica ciliar, diminuição da resposta imune e defeitos na resposta dos macrófagos, o que amplia as chances de uma infecção, inclusive a PCM (BELLISSIMO-RODRIGUES; MACHADO; MARTINEZ, 2011; RABAHI, 2012). O álcool, por sua vez, diminui potencialmente a produção de

surfactante e reduz a atividade mucociliar, afetando a mucosa respiratória (PARISE-FORTES et al., 2011).

Dessa forma, idade, gênero, ocupação, fatores hormonais e hábitos de vida são fatores predisponentes para o desenvolvimento da doença, portanto homens adultos que trabalham na agricultura são mais suscetíveis à infecção e representam a grande maioria dos casos de PCM crônica (RESTREPO et al., 1984; SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

Após o fungo entrar em contato com o parênquima pulmonar do hospedeiro, inicia-se uma reação inflamatória com diapedese de leucócitos polimorfonucleares. Os neutrófilos são degranulados, para fagocitar o fungo, porém as tentativas sem sucesso que acabam por formar um abscesso delimitado. Em sequência os macrófagos fagocitam o fungo e restos celulares, formando nódulos frouxos e células gigantes multinucleadas, chamadas de “células epitelioides” (BRITO; FRANCO, 1994; CAMARGO; FRANCO, 2000). Essas células epitelioides, somadas a células gigantes multinucleadas do tipo *Langhans*, fibroblastos e linfócitos formam o granuloma, um achado anatomopatológico típico da PCM. O fungo é, geralmente, detectado no centro desse granuloma (BRITO; FRANCO, 1994; FRANCO et al., 1994; CANO et al., 2012; RESTREPO et al., 2011). A Figura 03 mostra um granuloma organizado em fotomicrografia.

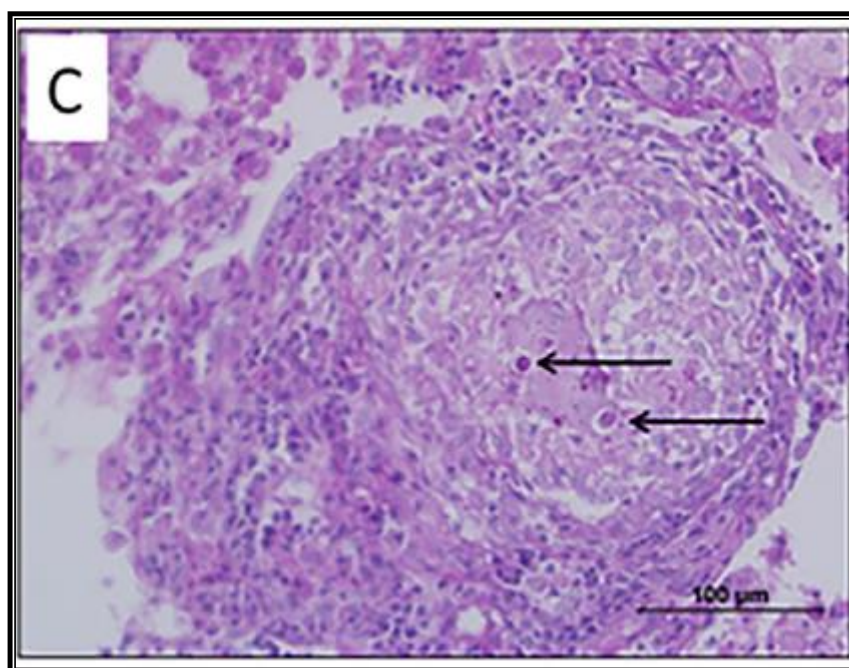


Figura 03. Fotomicrografia to tecido pulmonar de rato *Wistar* com a presença de um granuloma maduro de *Pb*, coloração de Hematoxilina Eosina. As setas indicam a presença do *P. brasiliensis* dentro de granuloma. Fonte: adaptado de Loth et al., 2015.

Na PCM, assim como em outras micoses sistêmicas, os mecanismos de defesa que atuam sobre o fungo são complexos, envolvendo a imunidade inata, adquirida e a interação de ambas (BURGER, 2010). Existem formações granulomatosas diferenciadas que definem o padrão imunológico a ser expresso. Granulomas bem formados, característicos da forma crônica da doença estão associados ao padrão imunológico Th1, e com secreção de citocinas respectivas como IL-12, INF $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Porém na presença de granulomas malformados há a expressão de IL-4, IL-5 e IL-10 e grande produção de imunoglobulinas, compatíveis, com o padrão imune Th-2 (MARQUES, 2009; BERNARD, 2008).

Clinicamente a doença pode ser dividida em aguda e crônica. A forma aguda, ou ainda chamada de juvenil, atinge crianças e jovens, constitui a forma mais grave da PCM, sem predominância de gênero, com evolução rápida e prognóstico ruim (SHANKAR et al., 2011; SHIKANAI-YASUDA et al., 2018). A manifestação clínica mais evidente na PCM juvenil é a Síndrome linfoproliferativa febril, que apresenta acometimento osteoarticular e órgãos como fígado, baço, linfonodos e medula óssea (FRANCO et al., 1987; SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

A forma crônica ou adulta possui prevalência nos homens com o comprometimento lento, primariamente pulmonar, dissemina-se para outros órgãos e sistemas como pele e mucosas, sistema nervoso central, sistema gastrointestinal e sistema osteoarticular (LONDERO; MELO, 1988; BERNARD et al., 1997). As figuras 04 e 05 demonstram características da PCM juvenil e adulta, respectivamente.

### 1.2.1 Paracoccidioidomicose Pulmonar

O pulmão pode ser o único órgão afetado em 1/4 dos casos, além disso, estudos por imagens de alta resolução mostram anormalidades pulmonares na grande maioria dos casos. A fibrose pulmonar constitui a maior consequência deixada pela inflamação granulomatosa da PCM, resultando em insuficiência pulmonar crônica (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018; SHANKAR et al., 2011).

Apesar disso, as alterações respiratórias demoram a aparecer e podem muitas vezes ser confundidas com perturbações causadas pelo tabagismo, hábito frequentemente presente entre esses pacientes (RESTREPO et al., 2011). Os sinais e sintomas tornam-se evidentes somente após muitos meses ou anos da infecção, fato que pode retardar o diagnóstico, que por muitas vezes, acontece quando o paciente procura o serviço de saúde para o tratamento de lesões mucocutâneas, muito comuns na PCM em estágios mais avançados. Porém, tosse crônica e produtiva, hemoptise e dor torácica são as manifestações mais relatadas (RESTREPO et al., 2011; CANO et al., 2012).



Figura 04. Características clínicas da forma aguda da PCM. (A): lesão frontal e clavicular; (B): comprometimento linfático supurado; (C): linfadenomegalia inguinal; (D): representação da hepatomegalia e ascite abdominal. Fonte: adaptado de Shikanai-Yasuda et al., 2006.

A presença de dispneia traduz o acometimento evolutivo da função pulmonar, evidenciando déficit da troca gasosa. O exame de imagem do tórax mostra infiltrados interstício-alveolar quase em toda a extensão pulmonar, exceto em ápices, formando a imagem de “asas de borboletas” (Figura 06). Os infiltrados evoluem para um padrão fibronodular e cicatricial, mesmo diante do tratamento



(MARCHIORI et al., 2011; RESTREPO et al., 2011). A fibrose pulmonar pode estar associada ao enfisema e a formação de cavidades pulmonares (CANO et al., 2012).

Estudos de autópsias mostram que a fibrose pulmonar resulta de intensa e progressiva infecção e resposta inflamatória ao redor do granuloma (LACAZ et al., 2002). A fibrose acontece devido ao estímulo persistente do antígeno, induzindo a inflamação, preferencialmente em regiões Peri-hilares e nas proximidades do feixe bronco-vascular (CANO et al., 2012).

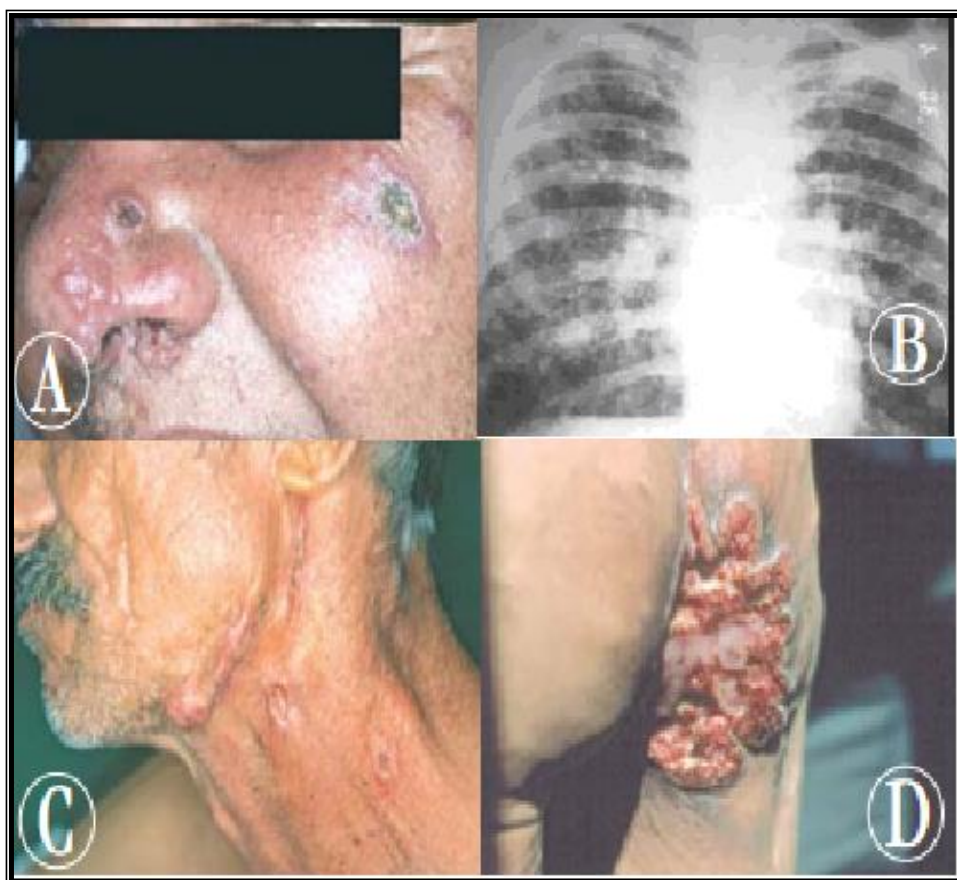


Figura 05. Características clínicas da forma crônica da Paracoccidioidomicose: (A): lesões papulosas e úlcero-crostosas na face; (B): radiografia de tórax com opacidades nodulares e micronodulares difusas. (C): Linfadenomegalia cervical e submandibular, fistulizadas; (D): Lesão vegetante com bordos irregulares em região perianal. Fonte: adaptado de Shikanai-Yasuda et al., 2006.





Figura 06: Imagem radiológica na Paracoccidioidomicose Pulmonar demonstrando o acometimento interstício-alveolar em forma de “asa de borboleta”. Fonte: adaptado de Shikanai-Yasuda et al., 2006.

### 1.2.2 Tratamento da Paracoccidioidomicose

O agente patogênico da PCM é sensível à maioria dos antifúngicos sistêmicos utilizados, incluindo os derivados de sulfamídicos, que são capazes de inibir o crescimento do fungo. Não há evidências da resistência fúngica, o que permite o uso de um vasto arsenal de drogas antifúngicas já conhecidas, dentre elas os derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol) derivados sulfamídicos e a anfotericina B (SHIKANAI-YASUDA et al., 2002; NARANJO et al., 1990; QUEIROZ-TELLES et al., 2007). Apesar do vasto arsenal de drogas passíveis de utilização, são mais empregados, na prática clínica da PCM, o itraconazol, a associação sulfametoxazol + trimetoprim e, em casos mais graves, a anfotericina B (SHIKANAY-YASUDA et al., 2018).

A PCM requer um tratamento prolongado, por vezes chegando a 18 meses de tratamento, o que reduz significativamente a adesão dos pacientes. Apesar do tratamento com antifúngicos estabelecidos, pelos menos, 20% dos pacientes evoluem com recidivas, complicações e sequelas anatômicas e funcionais (MARTINEZ, 2010; RIVITTI; AOKI, 1999).

A cura da PCM envolve critérios clínicos, micológicos, imunológicos e radiológicos. Apesar da expressão “cura”, talvez essa condição não possa ser alcançada definitivamente, devido a impossibilidade de eliminação total do fungo

do organismo. Assim, o objetivo do tratamento é reduzir a carga fúngica, possibilitando reequilíbrio entre parasita e hospedeiro (SHIKANAY-YASUDA et al., 2018).

Mesmo com o tratamento à base de antifúngicos disponíveis e estabelecidos na literatura, a doença ainda é capaz de causar mortes (MARTINEZ, 2010). Nos relatos mais recentes, as taxas são de 7,6 e 6,1% em diferentes regiões do país (PANIAGO et al., 2003; VIEIRA et al., 2014), sendo que, do montante de mortes causadas por micoses sistêmicas, 51% é atribuído à PCM (PRADO et al., 2009).

Devido ao potencial incapacitante desta moléstia, a PCM continua gerando custos mesmo após o tratamento da doença (NEGRONI, 1993; WANKE; LONDERO, 1994). Somado a isso está o longo tempo de acompanhamento dos doentes e a necessidade de assistência de várias especialidades, o que torna a PCM um importante problema social com altos custos (MARTINEZ 2010).

Por se tratar de uma doença capaz de deixar sequelas e complicações, o tratamento da PCM não pode se limitar à drogas antifúngicas, mas também deve oferecer o emprego de medicações capazes de melhorar as condições gerais do indivíduo, suas comorbidades e o acompanhamento do paciente a longo prazo (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

### **1.3 O Receptor P2X7 e o *Brilliant Blue G***

A adenosina trifosfato (ATP) atua fortemente no metabolismo celular como fornecedor de energia ao sistema, além disso, o ATP também exerce importante função como mensageiro extracelular de processos biológicos, incluindo a inflamação (YOUNG, 2010; JARVIS, KHAKH, 2009). Os efeitos como mensageiros se devem pela ativação de receptores purinérgicos (P1 e P2). Tais receptores são encontrados em todas as células humanas (ABBRACCHIO et al., 2009; BURNSTOCK, 2007).

Os receptores P2 possuem duas subfamílias: P2X e P2Y, estas famílias ainda podem ser divididas em subunidades, dentre elas está o P2x7, que ao ser exposto de forma prolongada ao ATP gera uma despolarização sustentada da membrana e abertura de canais transmembranares (ABBRACCHIO et al., 2009; JARVIS; KHAKH, 2009; NORTH; BARNARD, 1997). O receptor P2x7

(P2x7r) encontra-se expresso em muitas células e tecidos humanos, como no coração, fígado, músculo esquelético, pâncreas, monócitos, macrófagos, linfócitos T e células apresentadoras de antígenos (JIANG, 2009; GAVALA; PFEIFFER; BERTICS, 2009; BULANOVA et al., 2009; GERAGHTY et al., 2016).

O receptor P2x7 (P2x7r) é capaz de mediar processos de apoptose, necrose, morte de patógenos e regulação da inflamação. Acredita-se que ele tenha um papel importante na leucemia, glomerulonefrite, em doenças parasitárias e neurodegenerativas. (VOLONTÉ et al., 2012). Segundo alguns autores, P2x7r faz parte do arsenal do hospedeiro contra microrganismos invasores, apesar disso, há evidências de que alguns patógenos são capazes de subverter as vias do P2x7r para sua própria vantagem (MILLER et al., 2011).

A inibição do P2x7r pode levar ao abrandamento de uma doença e redução da morbidade. A inativação deste receptor reduz o recrutamento de células da imunidade, reduzindo o processo inflamatório exagerado e por sua vez a necrose tecidual (AMARAL et al., 2014).

Já foi demonstrado na literatura que o bloqueio farmacológico ou a deleção genética do P2x7r em camundongos foi capaz de aumentar a sobrevivência pós-transplante e reduzir rejeições (ZHONG et al., 2016). Entre outros fatores, isso acontece, pois, a inibição do P2x7r diminui a atividade linfoproliferativa. Este efeito se refletiu principalmente na redução das células envolvidas na aloimunidade, como o linfócito TCD4+ e, na diferenciação de células Th1 e Th17 (VERGANI et al., 2013). Outros experimentos mostraram que a inibição do P2x7r reduz os danos causados na pneumoconiose induzida por sílica, com menor intensidade de inflamação e fibrose pulmonar (MONÇÃO-RIBEIRO et al., 2014).

Por sua vez, o *Brilliant Blue G* (BBG) é um corante alimentar, de cor azul utilizado em testes biológicos, com ligação não específica a proteínas (KAGIMOTO et al., 2011). Trata-se de um corante trifenílmetano, fórmula  $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$  e com peso molecular de 854g/mol (NOTOMI et al., 2011). Apresenta estrutura semelhante aos agonistas do P2x7r, essa propriedade faz com que esse corante se torne ideal para o bloqueio seletivo do P2x7r (CANKURTARAN-SAYAR; SAYAR; UGUR, 2009). A baixa toxicidade e a alta seletividade do BBG o tornam o candidato ideal para o bloqueio seletivo e reversível desse receptor, por essas características ele é reconhecido como um potente agente farmacológico (SOARES-BEZERRA et al., 2015; SOOYEON; BRUCE, 2011).

O uso do BBG tem crescido consideravelmente nos últimos anos. Estudos mostraram ser capaz de proteger a perda neuronal em modelos da doença de Alzheimer, atenuação da apoptose neuronal e déficits motores em modelos da doença de Huntington (RYU; MCLARNON, 2008; DÍAZ-HERNANDEZ et al., 2009). Além desses efeitos, também foram observados a redução da resposta inflamatória e a melhora da recuperação em lesões medulares, em ratos (MARCILLO et al., 2012; PENG et al., 2009).

Em função das evidências apontadas pela literatura, demonstrando os efeitos benéficos da inibição do P2x7r em tecidos envolvidos em processos patogênicos, se faz necessária a investigação dos efeitos dessa terapêutica na PCM pulmonar. Também é importante salientar a dificuldade existente em se estabelecer um tratamento eficaz e com poucos danos colaterais para a PCM, levando em consideração as altas taxas de abandono do tratamento e as dificuldades enfrentadas pelos pacientes devido aos seus efeitos colaterais. Outro ponto a se destacar é a baixa toxicidade encontrada do BBG, o que pode torná-lo um bom candidato, para figurar como auxiliar no tratamento da PCM.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar os efeitos da inibição do receptor P2X7, através da utilização do BBG, sobre o modelo experimental de paracoccidiodomicose pulmonar.

### **2.2 Específicos**

- 2.2.1 Avaliar as alterações anatomopatológicas no tecido pulmonar dos grupos tratados com um inibidor do receptor P2x7 submetidos ao modelo experimental de paracoccidiodomicose pulmonar;
- 2.2.2 Avaliar morfometricamente os tecidos pulmonares dos grupos tratados com um inibidor do receptor P2x7 submetidos ao modelo experimental de paracoccidiodomicose pulmonar;
- 2.2.3 Analisar a titulação de anticorpos anti-gp43 no soro dos animais tratados com um inibidor do receptor P2x7 submetidos ao modelo experimental de paracoccidiodomicose pulmonar;

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Local de Realização do Estudo**

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Experimental (LME), Laboratório de Análises Clínicas, Ensino, Pesquisa e Extensão (LACEPE) e Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF), todos na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em Cascavel/PR. Para a realização da pesquisa foi seguido às determinações do Guide for Care and use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, National Academic Science, Washington, D. C. (1996) e os Princípios Éticos na Experimentação Animal da Legislação e Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA). Antes do início dos procedimentos do estudo, este foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE (Anexo I).

#### **3.2 Procedimentos e Divisão dos Grupos Experimentais**

Os animais utilizados no estudo, ratos, machos, (n=30) da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), com oito semanas de vida, mantidos com dieta padrão em pellets e água *ad libitum*, em caixas padrão em número de quatro, com ciclo de claro e escuro de 12 horas e temperatura controlada a 23°C. Esses animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais.

O Grupo controle absoluto (GCA), cujos animais não foram infectados e não receberam nenhum tratamento específico. O Grupo Controle Negativo (GCN) foi submetido ao desenvolvimento do modelo experimental de Paracoccidiodomicose Pulmonar, porém, não recebeu qualquer tratamento específico para a doença e serviu de controle, para os grupos tratados com bloqueador do P2x7r.

Os Grupos experimentais, GE50, GE100 e GE150, foram submetidos ao desenvolvimento do modelo experimental de PCM pulmonar e tratados com doses de 50, 100 e 150 mg/kg de BBG, respectivamente, por via intraperitoneal, diluído em salina estéril, a cada 48 horas, a partir do sétimo dia da data da infecção.

O Modelo experimental de Paracoccidioidomicose pulmonar utilizado nos grupos GCN, GE50, GE100 e GE150 foi desenvolvido com a inoculação, em dose única de suspensão celular de *P. brasiliensis*, cepa Pb18, na concentração de  $1 \times 10^5$  leveduras veiculada em 0,1 ml de PBS (solução salina tampão fosfatado), com viabilidade celular acima de 90%. A suspensão do fungo foi introduzida diretamente na traqueia dos animais, por intubação orotraqueal, utilizando um cateter venoso periférico do tipo abocath. Posteriormente, o animal foi ventilado manualmente, com auxílio de uma pera de esfimomanômetro, conectado ao cateter abocath, para garantir a disseminação da suspensão celular, para todas as áreas pulmonares. O procedimento era realizado sob anestesia com cetamina e xilazina por via intraperitoneal (80mg/kg e 15mg/kg por peso do animal, respectivamente).

O teste de viabilidade foi realizado retirando-se uma alíquota de cada suspensão celular na qual, posteriormente adicionado Azul de Tripán, na proporção 1:1 para contagem em microscópio. Foram consideradas aceitáveis as amostras que demonstravam viabilidade celular superior a 90%.

O experimento foi conduzido por 23 dias, desde a inoculação do fungo até o sacrifício dos animais. Nos sete primeiros dias após o desenvolvimento do modelo experimental de PCM pulmonar, os animais de todos os grupos foram mantidos sem qualquer tratamento. Após o sétimo dia, os animais experimentais GE50, GE100 e GE150 passaram a receber as doses respectivas de BBG, a cada 48 horas, por 15 dias. Vinte e quatro horas após o término da administração da última dose de BBG, todos os animais foram sacrificados por decapitação sob anestesia com cetamina e xilazina, nas mesmas doses descritas anteriormente.

### **3.3 Procedimentos histológicos**

Após o sacrifício dos animais foi imediatamente realizada a extração do tecido pulmonar dos animais, para fixação e processamento histológico. O tecido pulmonar foi fixado em formalina 10% por 48 - 72 horas. Posteriormente, as peças foram desidratadas em séries crescentes de álcoois até o absoluto e diafanizadas em solução de xilol por duas horas. Após obter peças translúcidas, as amostras foram incluídas em parafina. Em seguida, foram feitas secções de 7  $\mu$ m de espessura montadas em lâminas histológicas e coradas com o método de

hematoxilina-eosina para evidenciar a formação de granulomas (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979; MONTES; JUNQUEIRA, 1991) e com a coloração de prata pelo método de Grocott, para evidenciação do *P. brasiliensis* (GROCOTT, 1995). As biopsias pulmonares foram analisadas qualitativamente e por morfometria, a fim de quantificar o número e tamanho de granulomas. Foram utilizados os mesmos lobos pulmonares dos animais para as análises que alimentaram o estudo.

### 3.4 Teste de ELISA

Juntamente com a extrações do tecido pulmonar, foi realizado coleta de sangue dos animais, para posterior análise por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

O sangue foi acondicionado em tubos plásticos específicos, para análise via teste de ELISA que foi realizado como descrito por Ramos et al., (2005) e serviu para analisar a titulação de anticorpos anti-Gp43 de *P. brasiliensis*.

Depois de centrifugada a 7 mil rpm por cinco minutos, as amostras de soro obtidas do sangue dos animais foram distribuídas em microtubos de acordo com cada grupo; alíquotas de 500 µl de cada animal. Na sequência, utilizando placas de 96 poços de fundo chato, que foram previamente sensibilizadas com solução de 100 µl, cada orifício com a proteína (gp43) extraída da parede de Pb na diluição de 2 ng/ml, as quais foram incubadas durante 12 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes em PBS T (PBS + Tween 20, a 0,1%); adicionou-se então 100 µl por cavidade de PBS L (PBS + leite desnatado a 5%) por 2 horas a 37°C. As placas foram então lavadas com PBS T; em cada poço, foi adicionado 100 µl de soro dos grupos, nas diluições 1:1, 1:50, 1:450 e 1:1.350 em PBS L, por 2 horas a 37°C. Os controles positivos e negativos foram também adicionados às placas.

Após esse período, as placas foram lavadas três vezes e foi adicionado o anticorpo secundário (imunoglobulina G IgG), com peroxidase, produzido pela SIGMA-ALDRICH, 50 µl por cavidade, na diluição de 1:1000 em PBS L, seguido por incubação de uma hora a 37°C.

Para revelação, as placas foram lavadas cinco vezes com a adição de 100



$\mu$ l por poço de 0,4 mg/ml de orthophenilenediamine (Sigma) e 5% de peróxido de hidrogênio em tampão citrato de sódio 1 molar e a pH 4,5. Após ser mantida em ambiente escuro por cinco minutos, a reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 0.5 molar por dez minutos para leitura por absorvância em leitor de microplacas a 492 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.3 Análise Estatística

Foi realizada análise descritiva simples, com apresentação de distribuição de frequência, para as variáveis resultantes da análise quantitativa das biópsias pulmonares, que classificou a intensidade a doença considerando os seguintes sinais: ausente (sem sinais anatomopatológicos), leve (sinais anatomopatológicos discretos), moderada (sinais anatomopatológicos difusos) ou grave (sinais anatomopatológicos intensos e até necrose focal).

Para comparação das variáveis resultantes dos achados do exame de ELISA e morfometria, foi utilizado estatística analítica com o emprego do teste ANOVA, com nível de significância de 5% e valor de  $\alpha$  fixado em  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas pelos programas *GraphPad Prism*®, versão 3.0 para plataforma *Windows XP* da *Microsoft Office*® e *Oficce Excell*® na mesma plataforma.

#### 4. REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 1, p. 19–29, 2009.

AMARAL, E. P. et al. Pulmonary Infection with Hypervirulent Mycobacteria Reveals a Crucial Role for the P2X7 Receptor in Aggressive Forms of Tuberculosis. **Plos Pathogens**, v.10, n.7, p.1-4, 2014.

ARANTES, T. D. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*, A SECRET LOVE AFFAIR. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 57, n. 19, p. 25-30, 2015.

BAGAGLI, E. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several Biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v.6, n.5, p.344-51, 2006.

BELLISIMO-RODRIGUES, F.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 85, n. 3, p. 546-550, 2011.

BENARD, G. An overview of the immuno - pathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, p. 209-221, 2008.

BERNARD, G. et al. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J Infect Dis**, v. 175, n. 5, p. 1263-7, 1997.

BORGES-WALMSLEY, M. I. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 80-87, 2002.

BRITO, T.; FRANCO, M. F. Granulomatous inflammation. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v. 36, n. 2, p. 185-182, 1994.

BULANOVA, E. et al. ATP induces P2X7 receptor-independent cytokine and chemokine expression through P2X1 and P2X3 receptors in murine mast cells. **J Leukoc Biol**, v. 85, n. 4, p.692–702, 2009.

BURGER, E. Imunologia das micoses. In: ZAITZ, C. et al. (Org.). **Compêndio de micologia médica**. 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 108-22, 2010.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, p. 1471–1483, 2007.

CALICH, V. L. et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Exp Pathol**, v. 66, n. 5, p. 585-594, 1985.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current Knowledge on Pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana De Micologia**, v. 17, n. 2, p. 41-48, 2000.

CANKURTARAN-SAYAR, S; SAYAR, K; UGUR, M. P2X7 receptor activates multiple selective dye-permeation pathways in RAW 264.7 and human embryonic kidney 293 cells. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 6, p. 1323–1332, 2009.

CANO, L. E. et al. Pulmonary Paracoccidioidomycosis: Clinical, Immunological and Histopathological Aspects. In: Irusen, E. M. (edit.). Lung diseases - selected state of the art reviews. [S.l]: InTech, Cap. 16, p. 359-391, 2012.

CARRERO, L. I., et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v.45, n.5, p.605-12, 2008.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycology**, Oxford, v. 49, n. 8, p. 785-798, 2011.

CONTI-DIAZ, I. A. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 49, n. 2, p. 131-134, 2007.

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

DIAZ-HERNÁNDEZ, M. et al. Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. **Faseb J.** v.23, n.6, p.1893-1906, 2009.

FEITOSA, L. S. et al. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol**, v. 39, n. 1, p. 60-69, 2003.

FERREIRA, S. M.; QUEIROZ-TELLES, F. **Paracoccidioidomicose** (Blastomicose SulAmericana). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de infectologia. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2010, cap. 83.2, p. 1525-1529.

FRANCO, M. F. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 20, n. 2, p. 129-32, 1987.

FRANCO, M. et al. **Paracoccidioidomycosis**, Boca Raton: CRC Press, p. 409, 1994.

GAVALA, M. L.; PFEIFFER, Z. A.; BERTICS, P. J. The nucleotide receptor P2RX7 mediates ATP-induced CREB activation in human and murine monocytic cells. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 4, p.1159–1171, 2008.

GERAGHTY, N. J. et al. P2X7 receptor in skin biology and diseases. **World J Dermatol**, v. 5, n. 2. p. 72-83, 2016.

GROCOTT, R. G. A *stain for fungi* in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. **Am J Clin Pathol**, v.25, n.8, p.975-979, 1995.

JARVIS M. F.; KHAKH, B. S. ATP-gated ion channels. **Neuropharmacol**, v. 56, n. 1, p.208–215, 2009.

JIANG, L. H. Inhibition of P2X7 receptors by divalent cations: old action and new insight. **Eur Biophys J**, v. 38, n. 3, p. 339–346, 2009.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S.; **Técnicas básicas de citologia e histologia**. 1.ed. São Paulo: Livraria e Editora Santos Ltda, p. 123, 1983.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**. v.11, n.4, p.447-455,1979.

KAGIMOTO, H. T. S. et al., Brilliant Blue G for ILM Staining and Peeling. **Retina Today**, 2011.

LACAZ, C. S. et al. **Paracoccidioidomicose**. In *Micologia Médica*, 9. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LINDENBERG A. S. C. et al. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 75-8, 2008.

LONDERO A.T.; MELO I.S.; Paracoccidioidomicose (Blastomicose Sul Americana, Doença de Lutz-Splendore-Almeida). **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 55, p. 96-111, 1988.

LOTH, E. A. et al. Experimental paracoccidioidomycosis in pregnant rats. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.57, n.6, p.515-518, 2015.

LOTH, E. A. et al. Ocorrência de 102 casos de paracoccidioidomicose em 18 meses na região do Lago de Itaipu, Oeste do Paraná [Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Paraná]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 5, p. 636-637, 2011.

MACEDO, P. M. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* PS2: first autochthonous paracoccidioidomycosis case report in Rio de Janeiro, Brazil, and literature review. **Mycopathologia**, v.181, n.9-10, p.701-708, 2016.

MARCILLO A. et al. A reassessment of P2X7 receptor inhibition as a neuroprotective strategy in rat models of contusion injury. **Exp Neurol**. v.233, n.2. p.687-692, 2012.

MARCHIORI, E. et al. Paracoccidioidomycosis: high-resolution computed tomography-pathologic correlation. **European Journal of Radiology** ,v. 77, n. 1, p.80-4, 2011.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose é esporotricose associada a imunossupressão. **Med Cut Iber Lat Am**, v. 37, n. 4, p.159-170, 2009.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis. **Clin Dermatol**, v.30, n.6, p. 610-615, 2012.

MARTINEZ, C. A. R. et al., Paracoccidioidomicose do colon: relato de caso. **Arq med ABC**, v.31, n.2, p.78-82, 2006.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v.43, n.4, 2010.

MARTINEZ, R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v.57, n.19, p.11-20. 2015.

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **J Fungi**. v.3, n.1, p.1, 2017.

MARTINEZ, R.; MOYA, M. J. Primary complex of paracoccidioidomycosis and hypereosinophilia. **J Bras Pneumol**, Brasília, v. 35, n. 12, p.1259-1262, 2009.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**. v.23, n.1, p.65-73, 2006.

MILLER, C. M. The Role of the P2X7 Receptor in Infectious Diseases. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 11, 2011.

MONÇÃO-RIBEIRO, L. C. et al. P2X7 Receptor Modulates Inflammatory and Functional Pulmonary Changes Induced by Silica, **PLoS ONE**, v. 9, n. 10 p. 1- 17, 2014.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. eds. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, p. 131- 50. 1994.

MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C.U. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.86, supl.3, p.1-11, 1991.

MOTA, C. C. S. Contribuição ao estudo da epidemiologia da blastomicose sul americana no Paraná. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná**, v. 9-10, p. 53-92, 1996.

MUÑOZ, J. F. et al. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. **MSphere**, v.1, n.5, e00213-16, 2016.

NARANJO, M. S. et al. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. **J Med Vet Mycol**, v.28, n.1, p.67-76, 1990.

NEGRONI, R. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lutz's Mycosis). **Int J Dermatol**, v. 32, n. 12, p. 847-85, 1993.

NEVES, J. S.; BOGLIOLO, L. Pesquisas sobre os agentes etiológicos da blastomicose americana. I. Morfologia e sistemática do agente da doença de Lutz. **Mycopathol Mycol Appl**, v. 5, p. 133-42, 1951.

NORTH, R. A.; BARNARD, E. A. Nucleotide receptors. **Curr Opin Neurobiol**, v. 7, n. 3, p. 346–357, 1997.

NOTOMI, S. et al. Critical involvement of extracellular ATP action on P2RX7 purinergic receptors in photoreceptor cell death. **Am J Pathol**. v. 179, n. 6. 2798-2809, 2011.

PARISE-FORTES, M. R. et al. Imunologia da paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, n.3, p. 516-525, 2011.

PANIAGO, A. M. M. et al. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev Bras Soc Med Trop**, v.36, n.4, p.455-459, 2003.

PENG, W. et al. Systemic Administration of an antagonista of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.106, p.12489-12493, 2009.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p.513-521, 2009.



QUEIROZ-TELLES, F. et al. An open-label comparative pilot study of oral voriconazole and itraconazole for long-term treatment of paracoccidioidomycosis. **Clin Infect Dis**, v.45, n.11, p.1462-1469, 2007.

QUEIROZ-TELLES, F. *Paracoccidioides brasiliensis* ultra-structural findings. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. eds. **Paracoccidioidomycosis**, 2.ed. Boca Raton: CRC Press, p. 22-47, 1994.

RABAHI, M. F. Tuberculose e Tabagismo. **Pulmão**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 46- 49, 2012.

RAMOS, S.P. et al. Antigenuria and antigenaemia in experimental murine paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 43, n. 7, p.631–636, 2005.

RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance off males to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 346-53, 1984.

RESTREPO A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, n. 5, p. 323-334, 1985.

RESTREPO, A. et al. Paracoccidioidomycose. In: KAUFFMAN, C.A. et al. (edit.). **Essentials of Clinicals Mycology**. 2. ed. Springer: New York, 2011. p. 367-85.

RESTREPO-MORENO, A. Paracoccidioidomycosis. In: DISMUKES, W. E.; PAPPAS, P. G.; SOBEL, J. **Clinical Mycology**. New York, Oxford University Press: 328–345, 2003.

RESTREPO A, TOBÓN A. M. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dollin R, eds. **Principles and practice of infectious diseases**. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; p. 3062-8, 2005.

RIVITTI, E. A., AOKI, V. Deep fungal infections in tropical countries. **Clin. Dermatol**, v.17, p.171–190, 1999.

ROONEY, P. J.; KLEIN, B. S. Linking fungal morphogenesis with virulence. **Cell Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 127-137, 2002.

RYU, J.K.; McLARNON, J. G. Block of purinergic P2X(7) receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. **Neuroreport**. v.19, n.17, p.1715-1719, 2008.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol**, v. 31, n. 2, p. 99-113, 1993.

SAN-BLAS, G.; BURGER, E. Experimental medical mycological research in Latin America - a 2000-2009 overview. **Rev Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 28, n. 1, p. 1-25, 2011.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, The Hauge, v. 165, n. 4-5, p. 183-195, 2008.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, v. 40, p. 225-240, 2002.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS F. Bioquímica de *Paracoccidioides brasiliensis* dimorfismo. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. editores. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press; p. 49. 1994.

SHANKAR, J. et al. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 296-313, 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M.A., et al. Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v.40, n.4, p.411-417, 2002.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Consenso em paracoccidioidomicose. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. II Consenso Brasileiro em paracoccidioidomicose. **Epidemiol Serv Saúde**, v.27, n. esp. e0500001, 2018.

SILVA, M. R.; SARAIVA, L. E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatology Clinic**, v. 26, n. 2, p. 257-269, 2008.

SOARES-BEZERRA, R. J. et al. An Improved Method for P2X7R Antagonist Screening. **PLoS ONE** v.10, 2015.

SOOYEON, J. O.; BRUCE, P. B. Inhibition of Neuronal Voltage-Gated Sodium Channels by Brilliant Blue G. **Mol Pharmacol.**, v.80, n.2, p.247-257, 2011.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 273-83, 2009.

TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. novidades: implicações biológicas e clínicas. **Med Mycol**, v.52, p.19-28, 2014.

TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathog**. v.10, n.10, 2014 :e1004397.

THEODORO, R. C. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med Mycol**, v.43, 2005.

TOLEDO, M. S. et al. Characterization of sphingolipids from mycopathogens: factors correlating with expression of 2-hydroxy fatty acyl(E)-[3]-unsaturation cerebrosides of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Aspergillus fumigatus*. **Biochem**, v. 37, p. 7294-7306, 1999.

TRAVASSOS, L. R; TABORDA, C. P; COLOMBO, A. L. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.6, n.2, 2008.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genet Biol**, v.106, p.9-25, 2017.

VERGANI, A. et al. Long-Term Heart Transplant Survival by Targeting the Ionotropic Purinergic Receptor P2X7. **Circulation**, v. 127, p.463–475, 2013.

VIEIRA G. D. et al. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.47, n.1, p.63-68, 2014.

VOLONTÉ, C. et al. P2X7 receptors: channels, pores and more. **Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, n. 6, p. 705-721, 2012.

WANKE, B; LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A. (Eds.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, CRC Press, p. 109–20, 1994.

YOUNG, M. T. P2X receptors: dawn of the post-structure era. **Trends Biochem Sci**, v.35, n. 2, p. 83–90, 2010.

ZHONG, X. et al. The impact of P2X7 receptor antagonist, brilliant blue G on graft-versus-host disease in mice after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Cell. Immunol.** v. 310, p. 71-77, 2016.

## 5. ANÁLISE DA EVOLUÇÃO PATOLÓGICA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE PULMONAR EXPERIMENTAL APÓS INIBIÇÃO DO RECEPTOR P2X7

### 5.1 INTRODUÇÃO

A Paracoccidiodomicose (PCM) é a micose sistêmica mais prevalente da América Latina causada pelo fungo do gênero *Paracoccidioides spp*, dentre eles o *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). Cerca de 80% dos casos são relatados no Brasil, seguido por outros países como a Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina<sup>1,2</sup>. A PCM representa a oitava causa de morte entre as doenças infecciosas e parasitárias crônicas no país. Os estados das regiões Sul e Sudeste do país concentram a maior parte dos casos desta doença, destacando-se o Paraná com 53,2% das mortes por PCM da região Sul<sup>1,3</sup>.

Um levantamento apontou 2.169 casos relatados de PCM de 1966 a 2009 na região Sul, com média de 140,6 casos por ano<sup>4</sup>. Outro dado, referente à região do Lago de Itaipu, oeste do Paraná, relatou 102 novos casos da doença em apenas 18 meses de acompanhamento do estudo<sup>5</sup>.

Estima-se que o número de pessoas afetadas pela PCM seja ainda maior que o conhecido, fato que coloca essa micose no grupo de doenças negligenciadas, o que leva a crer que os seus danos são ainda maiores<sup>6</sup>. O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico termo dependente, capaz de assumir forma de micélio no ambiente, com temperaturas de 24° a 25°C, ou de levedura, *in vitro* ou em animais de sangue quente com 36° a 37° C<sup>7-9</sup>.

A PCM gera um grave problema de saúde pública pelo seu potencial incapacitante e o acometimento predominante de indivíduos do gênero masculino

na fase mais produtiva da vida<sup>6,10</sup>. Cerca de 90% dos casos da doença ocorrem em indivíduos com 30 a 50 anos, gerando alto custo social e econômico<sup>7,11,12</sup>. Alguns fatores acentuam o problema da PCM na saúde pública, como a demora do diagnóstico, a evolução silenciosa da doença e a dificuldade de acesso aos serviços de saúde, além da semelhança com outras doenças granulomatosas<sup>13-14</sup>.

A principal forma de infecção acontece de maneira acidental pela inalação de propágulos do fungo, que se instalam no tecido pulmonar a partir do qual pode se disseminar para qualquer órgão, por via linfática ou hematogênica<sup>1</sup>. O órgão mais acometido é o pulmão, chegando a afetar 90% dos pacientes, como consequência dessa inflamação granulomatosa, o paciente pode apresentar fibrose e insuficiência pulmonar crônica<sup>15,16</sup>.

Os agentes patogênicos da PCM são sensíveis à maioria das drogas antifúngicas sistêmicas<sup>15</sup>, incluindo sulfonamidas, anfotericina B e os derivados azólicos, disponíveis atualmente para combater a PCM<sup>17</sup>. No entanto, o tratamento desta doença é longo e torna-se de difícil adesão dos pacientes<sup>18</sup>. Dessa forma os pacientes acometidos devem ser acompanhados até apresentarem evidências de cura. Não obstante, os pacientes com PCM estão sujeitos a reativação tardia do fungo<sup>15</sup>.

O receptor P2x7 (P2x7r) é um receptor purinérgicos da membrana celular, ativado por ATP, e expresso em muitas células e tecidos humanos, como no coração, fígado, músculo esquelético, pâncreas, monócitos, macrófagos, linfócitos T e células apresentadoras de antígenos<sup>19-23</sup>. Esse receptor está envolvido em diversos processos fisiopatológicos tais como a apoptose, necrose e a resposta inflamatória, além da morte de agentes infecciosos<sup>24</sup>.

Estudos mostraram que a inibição do P2x7r pode levar a atenuação de doenças como a tuberculose e diminuição das taxas de morbidade. A inativação deste receptor reduz o recrutamento de células da imunidade, reduzindo o processo inflamatório exagerado e por sua vez a necrose tecidual<sup>25,26</sup>. O *Brilliant Blue G* (BBG) é um corante alimentar utilizado em testes biológicos capaz de bloquear de forma seletiva o P2x7r. Devido as suas características ele é considerado um potente agente farmacológico<sup>27,28</sup>.

Levando em consideração as altas taxas de abandono do tratamento, as dificuldades enfrentadas pelos pacientes com PCM e as evidências apontadas pela literatura, demonstrando os efeitos benéficos da inibição do P2x7r em processos patogênicos, além da baixa toxicidade do BBG, se faz necessária a investigação dos efeitos dessa terapêutica na PCM pulmonar. Dessa forma o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da inibição do P2x7r, através da utilização do BBG, sobre o modelo experimental de paracoccidiodomicose pulmonar.

## 5.2 MÉTODOS

O estudo foi conduzido nos Laboratório de pesquisa da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em Cascavel/PR, seguindo as determinações dos *Guide for Care and use of Laboratory Animals*, Institute of Laboratory Animal Resources, National Academic Science, Washington, D. C. (1996) e os *Princípios Éticos na Experimentação Animal da Legislação e Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA)*. Antes do início dos procedimentos do estudo, este foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE (Anexo I).

Os animais utilizados no estudo, ratos, machos, (n=30) da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), com oito semanas de vida, foram mantidos com dieta padrão em pellets e água *ad libidum*, em caixas padrão em número de quatro, com ciclo de claro e escuro de 12 horas e temperatura controlada a 23°C. Esses animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais.

O Grupo controle absoluto (GCA), cujos animais não foram infectados e não receberam nenhum tratamento específico. O Grupo Controle Negativo (GCN) foi submetido ao desenvolvimento do modelo experimental de Paracoccidioidomicose Pulmonar, porém não recebeu qualquer tratamento específico para a doença e serviu de controle para os grupos tratados com bloqueador do receptor P2X7. Os Grupos experimentais, GE50, GE100 e GE150, foram submetidos ao desenvolvimento do modelo experimental de PCM pulmonar e tratados com doses de 50, 100 e 150 mg/kg de BBG, respectivamente, por via intraperitoneal, diluído em salina estéril, a cada 48 horas, a partir do sétimo dia da data de infecção.

O Modelo experimental de Paracoccidioidomicose pulmonar utilizado nos grupos GCN, GE50, GE100 e GE150 foi desenvolvido com a inoculação, em dose única de suspensão celular de *Paracoccidioides brasiliensis*, cepa Pb18, na concentração de  $1 \times 10^5$  leveduras veiculada em 0,1ml de PBS, com viabilidade celular acima de 90%. A suspensão do fungo foi introduzida diretamente na traqueia dos animais por intubação orotraqueal, utilizando um cateter venoso periférico do tipo abocath. Posteriormente o animal foi ventilado manualmente com auxílio de uma pera de esfigmomanômetro conectado ao cateter abocath para garantir a disseminação da suspensão celular para todas as áreas pulmonares. O procedimento era realizado sob anestesia com cetamina e xilazina por via



intraperitoneal (80mg/kg e 15mg/kg por peso do animal, respectivamente).

O teste de viabilidade foi realizado retirando-se uma alíquota de cada suspensão celular na qual, posteriormente adicionado Azul de Tripán, na proporção 1:1 para contagem em microscópio. Foram consideradas aceitáveis as amostras que demonstravam viabilidade celular superior a 90%.

O experimento foi conduzido por 23 dias, desde a inoculação do fungo até o sacrifício dos animais. Nos sete primeiros dias após o desenvolvimento do modelo experimental de PCM pulmonar, os animais de todos os grupos foram mantidos sem qualquer tratamento. Após o sétimo dia, os animais experimentais GE50, GE100 e GE150 passaram a receber as doses respectivas de BBG por 15 dias. Vinte e quatro horas após o término da administração da última dose de BBG, todos os animais foram sacrificados por decapitação sob anestesia com cetamina e xilazina, nas mesmas doses descritas anteriormente.

Após o sacrifício foi imediatamente realizada a extração do tecido pulmonar dos ratos, para fixação e processamento histológico para coloração em Hematoxilina Eosina<sup>29</sup> e com coloração de prata pelo método de Grocott<sup>30</sup>, para evidenciação do *P. brasiliensis*.

O sangue dos animais foi coletado e acondicionado em tubos plásticos específicos, para análise via teste de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) realizado conforme descrito por Ramos *et al.*<sup>31</sup> Foram utilizadas placas de 96 poços sensibilizadas com do antígeno purificado gp-43 purificada e anticorpo secundário (anti-IgG peroxidase, Sigma-Aldrich ®). Os ensaios ainda foram realizados em triplicata e lidos por absorbância em leitor de microplacas a 492 nm.

Para avaliar de forma quantitativamente a intensidade da PCM nos pulmões dos animais foi adotado a classificação dos sinais histopatológicos em ausente

(sem sinais histopatológicos), leve (sinais histopatológicos discretos), moderada (sinais histopatológicos difusos) ou grave (sinais histopatológicos intensos e até necrose focal).

A análise estatística foi realizada por análise descritiva simples, com apresentação de distribuição de frequência, para as variáveis resultantes da avaliação quantitativa das biópsias pulmonares. Para comparação das variáveis resultantes dos achados do teste de Elisa e morfometria foi utilizado estatística analítica com o emprego do teste ANOVA, com nível de significância de 5% e valor de  $\alpha$  fixado em  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas pelos programas *GraphPad Prism*®, versão 3.0 para plataforma *Windows XP* da *Microsoft Office*® e *Office Excel*® na mesma plataforma.

### 5.3 RESULTADOS

Na análise qualitativa das biópsias pulmonares, o GCA não apresentou sinais patológicos (Figura 7A), porém foi encontrado presença de intensa inflamação granulomatosa tuberculóide no tecido pulmonar em 100% dos animais do GCN, com presença de infiltrado inflamatório difuso, numerosos granulomas epidermoides, com diversos graus de maturidade (Figura 7B). Esses granulomas continham células gigantes do tipo *Langerhans* com Pb no seu interior, na forma de leveduras com múltiplos brotamentos. Na periferia dos granulomas, também foi possível observar leveduras com brotamentos. As biópsias pulmonares desse grupo evidenciaram formação de pneumonia com infiltrado celular intenso e difuso por todo o tecido pulmonar.

Os grupos experimentais tratados com BBG apresentaram discreta formação de inflamação granulomatosa epidermoide com localização pontual, sobretudo nas bordas externas das peças pulmonares (Figura 7C e 7F), com apresentação de granulomas típicos da PCM pulmonar, com raros granulomas infiltrados no parênquima pulmonar (Figura 7E). Os fungos na forma de leveduras com múltiplos brotamentos contendo células gigantes estavam restritos no interior desses granulomas (Figura 7D). Não foram observados fungos fora da região dos granulomas que eram predominantemente organizados.

Os dados apontaram que 100% dos animais do GCN apresentaram doença pulmonar grave, já em todos os grupos experimentais tratados com BBG, foram observados sinais anatomopatológicos atenuados com doença pulmonar leve (Figura 7).

A quantidade de granulomas encontrada apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,0001$ ). Foi observada uma média de 16,5 ( $\pm 3,45$ ) granulomas por área no GCN, enquanto nos grupos experimentais a média de granulomas foi de 2,1 ( $\pm 0,5$ ), no mesmo tamanho de área analisada.

Tanto na análise qualitativa histológica quanto na análise quantitativa não foi possível observar diferença entre os grupos GE50, GE100 e GE150. Porém houve diferenças significativas ao comparar os resultados encontrados nos grupos experimentais com aqueles do GCN.

A análise morfométrica apontou que a média da área dos granulomas nos pulmões dos animais do GCN foi de 10,741 ( $\pm 2,456$ )  $\mu\text{m}^2$ . Nos grupos experimentais, a média da área encontrada foi de 6,259 ( $\pm 0,975$ )  $\mu\text{m}^2$ . O teste de ANOVA também indicou que houve diferença estatisticamente significativa ao

comparar o tamanho dos granulomas em relação ao CGN e os grupos experimentais ( $p=0,001$ ).

A análise de titulação de anticorpos anti-gp43 de *Pb*, através do teste de ELISA, não apresentou diferenças na produção de anticorpos específicos entre os grupos experimentais. Porém, ao comparar os grupos experimentais e o GCN foi possível observar diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,0001$ ), observando valores efetivamente menores nos grupos que receberam o tratamento com BBG (figura 8).

#### **5.4 DISCUSSÃO**

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da inibição do P2x7r, através da utilização do BBG, sobre o modelo experimental de PCM pulmonar. A finalidade principal foi investigar a possibilidade desta terapêutica atuar como ferramenta coadjuvante àquelas já existentes. Atualmente o tratamento para PCM é à base de antifúngicos, que demandam tratamento de longa duração para produzir a cura<sup>15</sup>.

No presente estudo, os grupos de animais tratados com BBG apresentaram atenuação da PCM pulmonar, demonstrado pela menor titulação de anticorpo anti-gp43 de *Pb*, através do teste de ELISA. A análise de morfometria também revelou diferenças estatisticamente significantes entre as médias do número e área de granulomas entre os grupos estudados.

Este estudo é pioneiro em utilizar o antagonismo do BBG ao P2x7r, na PCM pulmonar. Além disso, mesmo com as evidências da eficácia do BBG descritas na literatura científica, ainda são poucos os estudos existentes que utilizaram seu antagonismo nas desordens pulmonares, fatos que inviabilizaram

uma discussão mais aprofundada sobre o tema. No entanto, Monção-Ribeiro et al.,<sup>26</sup> utilizaram um modelo murinho de silicose pulmonar, tratado com 45 mg/kg de BBG, 2 vezes semanais durante 2 semanas e demonstrando redução da fibrose pulmonar e do perfil inflamatório. Estes resultados são similares aos obtidos na presente pesquisa, onde os grupos tratados com BBG também demonstraram atenuação significativa da doença, verificado pelos sinais anatomopatológicos clássicos da PCM menor titulação de anticorpos anti-gp43 de Pb e número de área de granulomas reduzidos, nos grupos tratados.

Wang et al.,<sup>32</sup> conduziram um estudo onde ratos com lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo, foram tratados com BBG de forma intraperitoneal com doses de 45,5 mg/kg a cada 48 horas e também com outro inibidor, o A438079 a cada 24 horas. Estes autores perceberam que ambos os inibidores do P2x7r foram capazes de reduzir o infiltrado de macrófagos e a lesão pulmonar de forma significativa nos animais tratados. Cabe ressaltar que o estudo citado utilizou modelo de tratamento usado com BBG semelhante ao usado na presente pesquisa, tanto na dose quanto no intervalo entre elas, de modo que os resultados demonstrados como redução dos sinais inflamatórios, são similares aos obtidos neste estudo.

Outras pesquisas realizadas por Kolliputi, Shaik e Waxman<sup>33</sup> apontaram que a inibição do P2x7r, em lesão pulmonar experimental induzida foi capaz de reduzir a ativação do inflamassoma, e atenuar a síntese de citocinas pró-inflamatórias e a formação de poros na membrana celular de macrófagos alveolares, fornecendo uma estratégia para a proteção do tecido pulmonar contra lesão celular. Lucatelli et al.,<sup>34</sup> também relatam os benefícios da inibição do P2x7r em animais com inflamação pulmonar induzida pela exposição a fumaça de cigarro. Estes autores

perceberam que a inibição do P2x7r nesse modelo de lesão experimental foi capaz de desacelerar e até prevenir a lesão pulmonar aguda, eles também observaram os mesmos efeitos perante a exposição crônica à fumaça de cigarro.

Levando em consideração o alto padrão inflamatório da infecção causada por *P. brasiliensis*<sup>35</sup> os autores do presente estudo aventam que a atenuação da PCM e a menor destruição tecidual encontrada nos grupos tratados com BBG pode ter ocorrido devido à redução da atividade inflamatória causada pela inibição do P2x7r, conforme observado nas biópsias pulmonares dos animais do estudo e dados dos estudos utilizados para discussão deste trabalho.

Outros estudos também investigaram os efeitos da inibição deste receptor, porém, utilizando animais geneticamente deficientes do P2x7r. Amaral et al.,<sup>25</sup> pesquisaram a influência da inibição do P2x7r, utilizando camundongos *knockout*, em cepas hipervirulentas de tuberculose, doença que acomete o tecido pulmonar de forma muito similar à PCM. Os autores perceberam que os animais *knockout* apresentaram carga bacilar 10 vezes mais baixa, menor disseminação da doença para outros órgãos como fígado e baço e menor destruição da área pulmonar, quando comparados aos seus controles.

Riteau et al.,<sup>36</sup> utilizaram modelo murinho de inflamação e fibrose pulmonar induzida em animais geneticamente deficientes para o P2x7r. Estes autores perceberam sinais reduzidos de fibrose e remodelamento pulmonar nos animais *knockout* após 14 dias da indução do modelo. Apesar de métodos diferentes para a inibição do P2x7r esses estudos corroboram com os resultados encontrados na presente pesquisa onde houve atenuação da doença, com menor quantidade de fungos visíveis dentro dos granulomas e menores níveis do anticorpo anti-Gp43 de *Pb*, demonstrados aqui. De modo que a terapia proposta neste estudo, de inibição

do P2x7r com BBG em diferentes doses foi capaz de minimizar os efeitos da PCM pulmonar nos animais dos grupos experimentais. Dessa forma esses achados servirão como base para futuros estudos que buscam novas alternativas terapêuticas para a PCM.

## **5.5 CONCLUSÃO**

Após o exposto é possível concluir que a inibição do receptor P2x7, através do antagonista BBG, foi capaz de reduzir a inflamação, área e número de granulomas, além da titulação de anticorpo anti-Gp43 de Pb, em todas as doses administradas. De modo, que os resultados são encorajadores para novos estudos.

**Conflito de interesses**

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

**Agradecimentos**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES);  
e Centro de Reabilitação física da Universidade Estadual do Oeste do Paraná -  
UNIOESTE.

**Suporte Financeiro**

Este estudo foi financiado parcialmente pela Coordenação de Aperfeiçoamento de  
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



## 5.6 REFERÊNCIAS

1. Restrepo A, Gonzalez A, Agudelo CA. Paracoccidioidomicose. In: Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE. Essentials of Clinical Mycology. 2nd ed. New York: Springer; 2011. p. 367-385.
2. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol.* 2011; 49(8):785-798, 2011.
3. Lacaz CS. Paracoccidioidomicose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Vacari-Heins EM, Mello NT, eds. Tratado de micologia médica. 9th ed. São Paulo: Sarvier; 2002. p. 639-729.
4. Martinez R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2015; 57(19):11-20.
5. Loth EA, Castro SV, Silva JR, Gandra RF. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, western Paraná. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(5): 636-637.
6. Martinez R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010; 43(4):480.
7. Wanke B, Londero AT. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press;1994. p.109-120.
8. Theodoro RC. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol.* 2005; 43(sn):725-729.

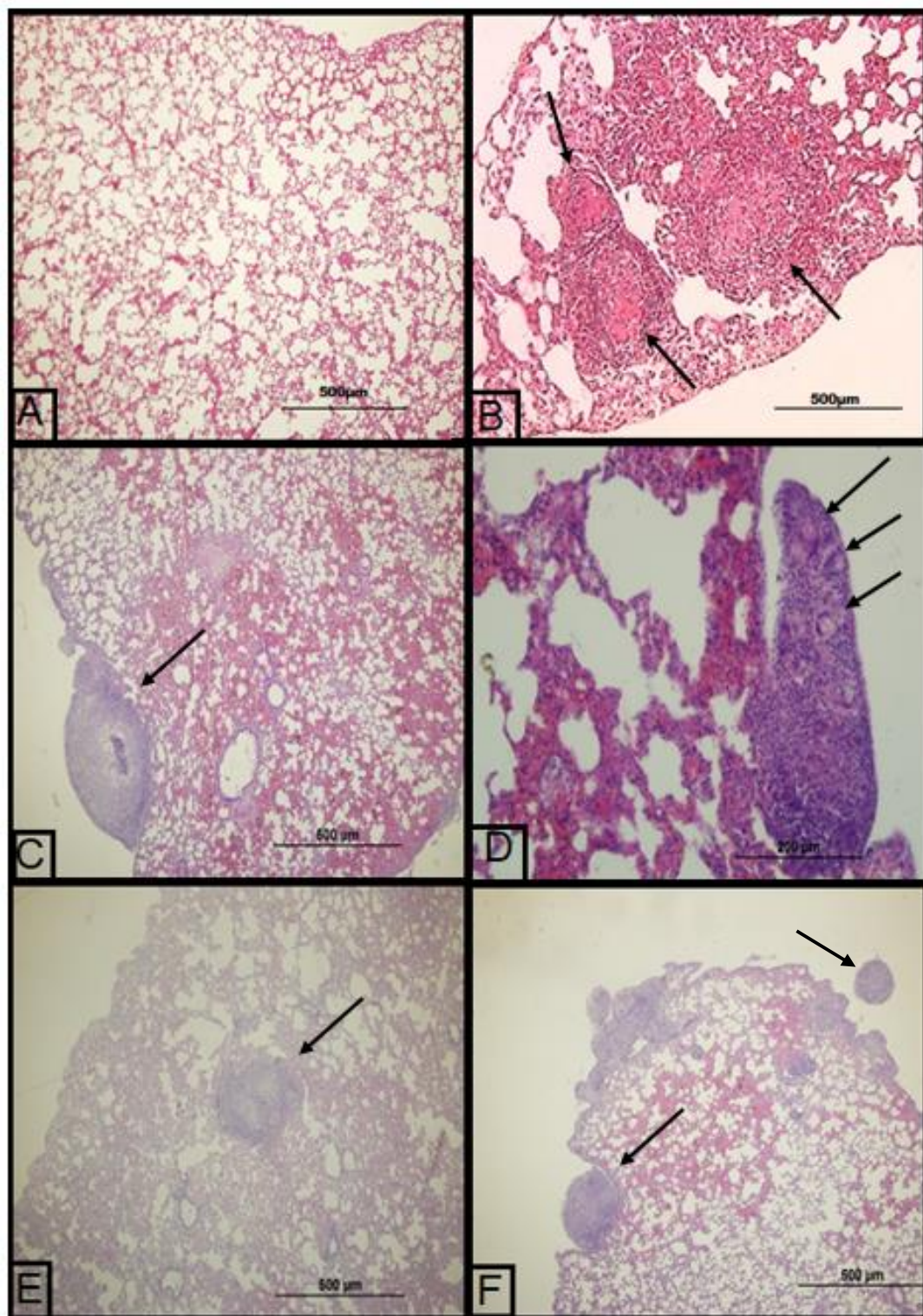
9. San-Blas G, Niño-Vega G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia*. 2008; 165(4-5):183-195.
10. Bellissimo-Rodrigues F, Machado AA, Martinez R. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85(3):546-550.
11. Negroni R. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lutz's mycosis). *Int J Dermatol*. 1993;32(12):847-59.
12. Mota CCS. Contribuição ao estudo da epidemiologia da blastomicose sul americana no Paraná. *Ann Fac Med Univ Fed Paraná*. 1996; 9(10):53-92.
13. Marques SA. Paracoccidioidomycosis. *Clin Dermatol*. 2012; 30(6):610-615.
14. Martinez R, Moya M. J. Primary complex of paraccicioidomycosis and hypereosinophilia. *J Bras Pneumol*. 2009; 35(12):1259-1262.
15. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono A, Paniago AMM, et al., II Consenso Brasileiro de Paracoccidioidomicose. *Epidemiol Serv Saude*. 2018; 27(núm. Esp.): e0500001.
16. Shankar J, Restrepo A, Clemons KV, Stevens DA. Hormones and the Resistance of Women to Paracoccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011; 24(2):296-313.
17. Martinez CAR, Priolli DG, Ramos CA, Waisberg J, Margarido NF. Paracoccidioidomicose do cólon: relato de caso. *Arq med ABC*. 2006; 31(2):78-82.
18. Travassos LR, Tabora CP, Colombo AL. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008;6(2):251262.

19. Jiang LH. Inhibition of P2X7 receptors by divalent cations: old action and new insight. *Eur Biophys J.* 2009;38(3):339–346.
20. Gavala ML, Pfeiffer ZA, Bertics PJ. The nucleotide receptor P2RX7 mediates ATP-induced CREB activation in human and murine monocytic cells. *J Leukoc Biol.* 2008;84(4):1159–1171.
21. Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Koch-Nolte F, Haag F, Bulfone-Paus S. ATP induces P2X7 receptor-independent cytokine and chemokine expression through P2X1 and P2X3 receptors in murine mast cells. *J Leukoc Biol.* 2009;85(4):692-702.
22. Geraghty NJ, Watson D, Adhikary SR, Sluyter R. P2X7 receptor in skin biology and diseases. *World J Dermatol.* 2016;5(2):72-83.
23. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 2009;32(1):19-24.
24. Volonté C, Apolloni S, Skaper SD, Burnstock G. P2X7 receptors: channels, pores and more. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2012;11(6):705-21.
25. Amaral EP, Ribeiro SCM, Lanes VR, Almeida FM, Andrade MRM, Bomfim CCB, et al. Pulmonary Infection with Hypervirulent Mycobacteria Reveals a Crucial Role for the P2X7 Receptor in Aggressive Forms of Tuberculosis. *Plos Pathogens.* 2014;10(7): e1004188.
26. Monção-Ribeiro LC, Faffe DS, Santana PT, Vieira FS, Graça CLAL, Marques-da-Silva C, et al. P2X7 Receptor Modulates Inflammatory and Functional Pulmonary Changes Induced by Silica. *Plos One.* 2014; 9(10): e110185.
27. Soares-Bezerra RJ, Ferreira NCS, Alberto AVP, Bonavita AG, Fidalgo-Neto AA, Calheiros AS, et al. An Improved Method for P2X7R Antagonist Screening. *Plos One.* 2015; 10(5):e0123089.

28. Sooyeon JO, Bruce PB. Inhibition of Neuronal Voltage-Gated Sodium Channels by Brilliant Blue G. *Mol Pharmacol*. 2011;80(2):247-257.
29. Junqueira LCU, Junqueira LMMS. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. São Paulo: Santos Editora, 1983, 123 p.
30. Grocott RG. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol*. 1955;25(8):975-9.
31. Ramos SP, Sano A, Ono MA, Camargo ZP, Estevão D, Miyaji M, et al. Antigenuria and antigenaemia in experimental murine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2005;43(7):631-6.
32. Wang S, Zhao J, Wang H, Liang Y, Yang N, Huang Y. Blockage of P2X7 attenuates acute lung injury in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome. *Int Immunopharmacol*. 2015;27(1):38-45.
33. Kolluputti N, Shaik RS, Waxman AB. The inflammasome mediates hyperoxia-induced alveolar cell permeability. *J Immunol*. 2010;184(10):5819-5826.
34. Lucattelli M, Cicko S, Müller T, Lommatzsch M, De Cunto G, Cardini S, et al. P2X7 receptor signaling in the pathogenesis of smoke-induced lung inflammation and emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(3):423-9.
35. Fortes MRP, Miot HA, Kurokawa CS, Marques MEA, Marques SA. Imunologia na Paracoccidioidomicose. *An Bras Dermatol*. 2011;86(3):516-525.
36. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, et al. Extracellular ATP Is a Danger Signal Activating P2X7 Receptor in Lung Inflammation and Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(6):774-83.

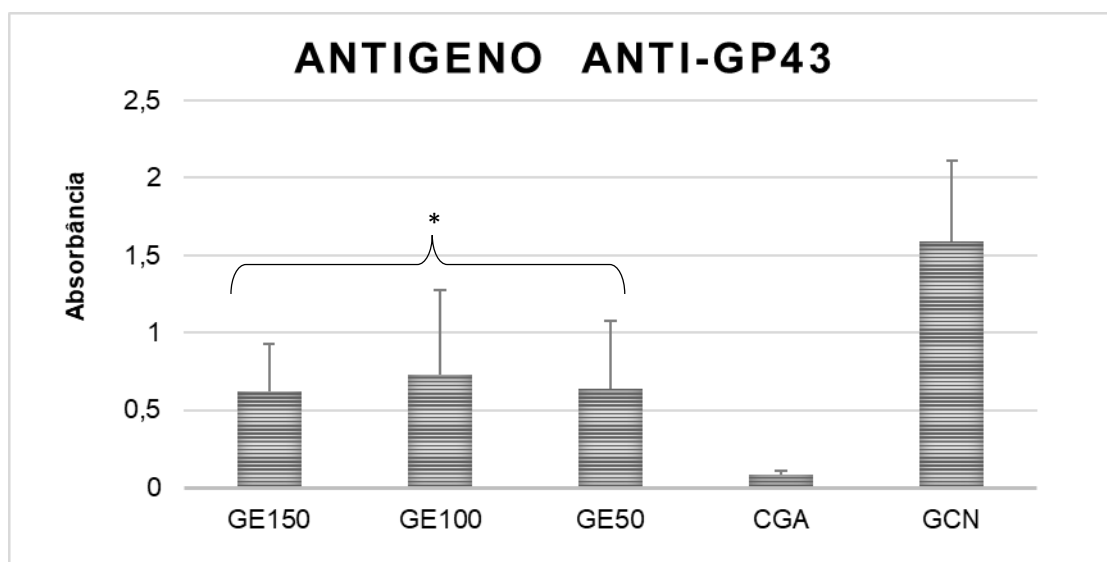
## 5.7 FIGURAS

Figura 7: Fotomicrografia dos cortes histológicos dos pulmões dos animais dos grupos utilizados



**Figura 7:** **A** – estrutura íntegra com alvéolos preservados, ausência de processo inflamatório em um animal do Grupo Controle Absoluto (coloração por hematoxilina-eosina, HE, aumento de 40x). **B** - Demonstra a presença de diversos granulomas apontados pelas setas, no corte histológico do pulmão de um animal do CGN (HE, aumento de 40x). **C** – Presença de granuloma observado aderido isoladamente na borda externa do pulmão em um animal do grupo tratado com BBG 50 mg/ml, indicado pela seta (HE, aumento de 40x). **D** – indica pequeno granuloma epidermoide, visto em maior aumento, aderido isoladamente na borda externa do pulmão em um animal do grupo BBG 100 mg/ml. A setas indicam as células gigantes do tipo Langerhans (HE, aumento de 200x). **E** - Demonstra pequeno granuloma epidermoide dentro do parênquima pulmonar, observado em um animal do grupo BBG 150 mg/ml, destacado pela seta (HE, aumento de 40X). **F** – Presença de granulomas epidermoides organizados na margem do pulmão, indicados pelas setas e parênquima pulmonar com discreto infiltrado inflamatório em um animal do grupo 50 mg/ml (HE, aumento de 40x).

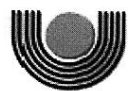
### Figura 8: Titulação de anticorpos anti-Gp43 pelo método ELISA



**Figura 8:** Não houve diferenças na produção de anticorpos anti-Gp43 de Pb entre os grupos experimentais. Ao comparar os grupos experimentais e o GCN se observa diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,001$ ), com valores efetivamente menores nos grupos que receberam o tratamento com BBG.

## 6. ANEXOS

### ANEXO I



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

### PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Análise da evolução patológica de um modelo de Paracoccidiodomicose pulmonar após inibição do receptor P2X7", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

#### ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 14/08/2015

**Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña**  
Coordenadora do CEUA  
Portaria nº 2729/2014 - GRE

## **ANEXO II - NORMAS DA REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL**

### **Scope**

The *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* or *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* is a multidisciplinary and open-access journal that publishes original research in all fields of tropical medicine (including epidemiology, clinical studies, pathology, and immunology) and infectious diseases. It is the official journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine. Review articles are invited, but the Journal also publishes major articles, short communications, case reports, editorials, letters, images in infectious diseases, technical reports, and special numbers (supplements). The Journal, published in English on a bimonthly basis, has a peer-review system. Its content is freely accessible to readers and no publication fees are charged to authors.

From 2016 on, the *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* or *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* received financial support (public funding) solely from the National Counsel of Technological and Scientific Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq). This financial support was essential to ensure the Journal's quality, including improved impact factor, increased number of citations, XML generation, and review/editing of the English style and grammar issues of all accepted manuscripts, all of which have been paid by the Journal itself.

Beginning in 2017, the Journal established that, when necessary, it will request authors to pay for the professional English review and editing service of a professional English editing company for the final version of their accepted articles.

### **Review policy**

Submission to the *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* or *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* implies that the manuscript has not previously been published (except in abstract format) and that it is not being considered for publication elsewhere.



Manuscripts submitted for publication in our journal are initially evaluated by the administrative staff to ensure compliance with Journal guidelines. Those manuscripts that meet the basic requirements will then be sent to at least two reviewers for evaluation through a peer review system. The Journal editors will use the reviewers' detailed reports to decide whether to accept a submitted paper. If there is a difference of opinion among the reviewers, the manuscript will be sent to a third reviewer to validate a final editorial decision, in accordance with the submission workflow of the Journal (available online at <http://www.scielo.br/revistas/rsbmt/iinstruc.htm#005>).

Manuscripts must be written in English and submitted only electronically using the following link: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

Poor English language use in manuscripts is the major cause of delay in publication. We strongly advise authors with English as a foreign language to have their manuscripts preferably translated and edited by a professional English translation and editing company or checked by a scientist with English as a first language; a copy of the certificate should be sent to the Journal.

The editorial office can be contacted at the following address:

*Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical or Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*

Av. Getúlio Guaritá s/n. P.O. Box 118, Uberaba, Minas Gerais, Brazil 38001-970  
Telephone: 55-34-3318-5287 | Fax: 55-34-3318-5279 | e-mail: [rsbmt@rsbmt.ufm.edu.br](mailto:rsbmt@rsbmt.ufm.edu.br) <http://www.scielo.br/rsbmt>

### **Manuscript types**

The Journal invites the following types of manuscripts for consideration: Major Articles, Review and Mini-Review Articles, Editorials, Short Communications, Case Reports, Technical Reports, Images in Infectious Diseases, Letters, and Special Numbers.

**Major Articles:** Major Article manuscripts must report original research not previously published or in consideration for publication elsewhere. Major articles have a 3,500-word limit (excluding the abstract, title, and references). Manuscripts must include a structured abstract of no more than 250 words, organized using the following headings: Introduction, Methods, Results, and Conclusions. The manuscript text should be organized as follows: title, running title, structured abstract, keywords (three to six keywords), manuscript text (introduction, methods, results, and discussion), acknowledgments, conflict of interest statement, financial support, references list, and figure titles/legends. A total of five illustrations (tables and figures) are allowed.

**Review Articles:** Review articles should present a critical review of recent trends and progress in the study of infectious diseases, rather than a mere literature review, which are usually written at the direct request of the editor. Review articles have a 3,500-word limit (excluding the abstract, title, and references) and should be accompanied by a non-structured abstract of up to 250 words. Five illustrations (tables and figures) are allowed. The Journal also publishes mini-reviews. These articles have a 3,000-word limit (excluding the abstract, title, and references) and must be accompanied by a non-structured abstract of up to 250 words; mini-reviews may contain up to three illustrations (tables and figures). The manuscript should be organized as follows: title, running title, abstract (non-structured), manuscript text, acknowledgments, conflict of interest statement, financial support, references list, and figure titles/legends.

**Editorials:** Editorial pieces are typically written on invitation, bearing in mind the scope of the journal and its preferred topics. Editorials have a 1,500-word limit, and do not require an abstract and keywords. They may use one illustration (table or figure), and should have a conflict of interest statement and a list of 10 references or fewer.

**Short Communications:** Short Communication manuscripts should be reports on exciting new results of research or investigation in areas within the scope of the Journal. Such articles have a 2,000-word limit; they should have a structured abstract of no more than 100 words (with the subheadings Introduction, Methods,

Results, and Conclusions) and may include up to 15 references. Up to three illustrations (tables and figures) are allowed. Three to six keywords are allowed. The body of the manuscript should not be divided into topics or subheadings. Acknowledgments, Conflict of Interest Statement, and Financial Support must be included.

**Case Reports:** Case Reports must be brief reports of up to 1,500 words, with a maximum of three illustrations (tables and figures), up to 12 references, up to three keywords, and a non-structured abstract of up to 100 words. The body of the manuscript should be divided according to the following headings: Introduction, Case Report, Discussion, References, and Figure titles/legends. Acknowledgments, Conflict of Interest Statement, Financial Support must be included.

**Technical Reports:** Technical reports should be concise reports on the results and recommendations of a meeting of experts. Such reports may be also considered if they are formatted as an editorial.

**Images in Infectious Diseases:** An “Images in Infectious Diseases” submission must include up to three photographs of the best quality possible. Up to three authors and up to three references are allowed. The maximum length of such an article is 250 words (excluding title and references), with an emphasis on figure description. The themes should involve clinical lessons clarified by appropriate illustrations and figure descriptions.

**Letters:** Readers are encouraged to write about any topic related to infectious diseases and tropical medicine that fits the scope of the journal. Letters should be no longer than 1,200 words, without abstract and keywords, and with only one illustration (table or figure); Letters may discuss material previously printed in the journal and cite up to 12 references.

**Special Numbers:** Proposals for supplemental materials must be made in writing to the Editor and/or Guest Editor. They will be evaluated on the suitability of a topic, program organization, or production according to the scope of the journal.

## Manuscript preparation

Authors are advised to read these instructions carefully and follow them closely to ensure the timely and efficient review and publication of their manuscript. The Editors reserve the right to return manuscripts that do not adhere to these guidelines.

**Online submission system:** All manuscripts to be considered for publication in the **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** should be submitted in electronic form via the online submission system at <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo> or <http://www.scielo.br/rsbmt>. The author must choose one manuscript category from the “Manuscript types” menu: Major Articles, Editorials, Review Articles, Mini-Review, Short Communications, Case Reports, Technical Reports, Images in Infectious Diseases, Letters, Authors Reply or Other (when a submission does not fit in any other category). Authors and co-authors are entirely responsible for the contents of the manuscript.

**Cover Letter:** a) It must contain a statement to ensure that the proposed manuscript describes original research and is not published or under consideration by another scientific journal. The cover letter must also state that the data/results of the manuscript are not plagiarized. b) The letter must be signed by all authors and, when strictly impossible, the first and the last author may sign by proxy for the other co-authors. c) In the *Cover Letter*, the authors must include a declaration of their acknowledgment that the manuscript, after submission, may not have the order or the number of authors altered without providing any justification and/or information to **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. d) The authors must declare that they agree, if the manuscript is accepted for publication, to the transfer of all copyrights to **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.

**Authors' contribution:** The authors must include, in a separate document, a statement of authorship responsibility, specifying the contribution of each author to the study.

**Pre-Submission Language Editing:** All manuscripts submitted to the *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine must be in English. It is highly recommended that the authors use a professional [English editing](#) and/or [translation](#) service prior to submission. However, engaging in language editing does not guarantee that the manuscript will be accepted for publication.

### **Manuscript layout**

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should use Times New Roman size 12 font with double spacing throughout the text, figure title/legends, and references, with margins of at least 3 cm. Divide the manuscript into the following sections: Cover Letter (addressed to the Editor-in-Chief), Title Page, Manuscript Title, Running title, Abstract, Keywords, Manuscript Text, Conflict of Interest statement, Acknowledgments, Financial Support, References, and Figure Titles/Legends. Cover Letter, Title Page, Acknowledgments, and Financial Support must be provided in a separate document. Abbreviations should be used sparingly.

**Title Page:** The title page should include the authors' names in direct order and without abbreviations, along with institutional affiliations (e.g., each author's department, institution, city, state, and country). The complete address of the corresponding author must be specified, including telephone and fax numbers and e-mail address. The number of authors and co-authors per paper should be limited to the actual number of authors that contributed to the manuscript. Except for national and international multicenter studies, up to 20 authors and co-authors will be allowed. The remaining authors' names will be published in a footnote.

**Potential reviewers:** Authors are asked to provide names and contact information (e.g., e-mail and institutional affiliations) for three potential unbiased reviewers, from a different institution of the authors.

**Title:** The title should be as concise, clear, and informative as possible. It should not contain abbreviations and should not exceed 200 characters, including spaces.

**Running Title:** The running title may include up to 40 characters.

**Structured Abstract:** The structured abstract should summarize the results obtained and the major conclusions in such a way that a reader not already familiar with the particular topic of the paper can understand the implications of the article. The abstract should not exceed 250 words (100 words in the case of Short Communications) and must be structured with the following headings: *Introduction, Methods, Results, and Conclusions*. Abbreviations should be avoided.

**Keywords:** Three to six keywords should be listed in English immediately below the structured abstract.

**Introduction:** The article's introduction should be brief, setting out the purposes for which the study has been performed. Previous studies should be cited only when essential.

**Methods:** The methods used in the study should be reported in sufficient detail so that readers and reviewers can understand precisely what has been done; any description should be thorough enough to allow repetition or replication by others. Standard techniques only need to be referenced; detailed descriptions are not required.

**Ethics:** When reporting on experiments on human beings, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional, regional, or national) and in keeping with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 1975,

1983, 1989, 1996, and 2000. When reporting on experiments on animals, indicate whether a national research council's guide for animal experimentation or any law on the care and use of laboratory animals was complied with; the approval number must be sent to the Journal. In case of research on humans, authors must include in the methods section (ethical considerations subsection) a statement that the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

**Clinical trials:** In the case of clinical trials, the manuscript should be accompanied by the number and agency of register of the relevant clinical trial (REBEC platform). This requirement is in accordance with guidelines set by BIREME/OPAS/OMS, International Committee of Medical Journal Editors ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)), and Workshop ICTPR.

**Results:** The results section should be a concise and impersonal account of the new information revealed by the study or research in question. Avoid repeating in the text the data presented in the tables or illustrations.

**Discussion:** The discussion section should directly relate to the study being reported. Do not include a general review of the topic. Keep the discussion concise and relevant.

**Acknowledgments:** Any acknowledgments should be short, concise, and restricted to those that are necessary. In case of sponsoring institutions, do not use acronyms.

**Conflict of Interest:** All authors should disclose any type of conflict of interest during the development of the study.

**Financial Support:** List all the financial support received from agencies, institutions, and other organizations that funded the research in whole or in part.

**References:** Only references cited in the text should be referenced. They should be numbered consecutively in Arabic numerals and in Vancouver format as they appear in the text. List all authors when there are up to six. For seven or more

authors, list the first six, followed by “et al.” Type the reference list on a separate page at the end of the manuscript, using double spacing.

Numbered references to personal communications, unpublished data, or manuscripts either “in preparation” or “submitted for publication” should not be listed among the references. Papers accepted for publication should be referred to as “in press” and the letter of acceptance of the journal must be provided. Such material can be incorporated at the appropriate place in the text in accordance with the following examples: (AB Figueiredo: Personal Communication, 1980), (CD Dias, EF Oliveira: Unpublished Data). In-text citations should be indicated using the appropriate reference numbers as superscripts to the corresponding word, separated by comma or hyphen when there is a no-range sequence. Example: World<sup>1,2</sup>, Life<sup>30,42,44-50</sup>. The references at the end of the manuscript should follow the system used in the uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (for more information, please see: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). The titles of journals referenced should be abbreviated according to the style used in the *Index Medicus* (for more information, please see: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).

Responsibility for the bibliographic citations in the text and reference list lies entirely with the authors.

The following are sample references:

1. Articles from journals: Last names and initials of the six cited Authors (For seven or more authors, list the first six, followed by “et al.”), full title of the Article (in original language), abbreviated title of the journal (can be found at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), year of publication, volume number, the first and the last page numbers.

Example 1: Petitti DB, Crooks VC, Buckwalter JG, Chiu V. Blood pressure levels before dementia. *Arch Neurol*. 2005;62(1):112-6.

Example 2: Freitas EC, Oliveira MF, Vasconcelos ASOB, Filho JDS, Viana CEM, Gomes KCMS, et al. Analysis of the seroprevalence of and factors



associated with Chagas disease in an endemic area in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;50(1):

2. Book chapter: Cite last names and initials of all Authors of the chapter, Chapters' full title, Editors, Title of book, edition, Place of Publication: Publisher, Year of publication, chapter pages.

Example: Blaxter PS, Farnsworth TP. Social health and class inequalities. In: Carter C, Peel JR, editors. *Equalities and inequalities in health.* 2nd ed. London: Academic Press; 1976. p. 165-78.

3. Book: Last names and initials of the authors, Title of book, edition, Place of Publication: Publisher, Year of publication, Pagination.

Example: Carlson BM. *Human embryology and developmental biology.* 4th ed. St. Louis: Mosby; 2009. 541 p.

4. Websites: Author/organization's name. Title of the page [Internet]. Place of publication: Publisher's name; Date or year of publication [updated yr month day; cited yr month day]. Available from: URL

Example: Diabetes Australia. Diabetes globally [Internet]. Canberra ACT: Diabetes Australia; 2012 [updated 2012 June 15; cited 2012 Nov 5]. Available from: <http://www.diabetesaustralia.com.au/en/Understanding-Diabetes/DiabetesGlobally/>

5. Dissertation/PhD Theses: The *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* or *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* will not accept the citation of dissertations for a master of science, PhD theses, or similar material.

**Illustrations:** All illustrations should be submitted as separate files and named using only the figure number (e.g., Figure 1, Figure 2). All figures should be numbered using Arabic numerals and cited consecutively in the text.

**Title and Legends:** Titles and legends should be typed at the end of the manuscript with double spacing.

**Dimensions:** The dimensions of necessary illustrations and figures should not exceed 18 cm wide by 23 cm high. The correct specifications for each figure format are as follows:

- **Images/Photographs** must be submitted in high-resolution *TIFF* format. Verify that any photograph was taken at a minimum resolution of 600 dpi—preferably between 900 and 1200 dpi—and prepared using an image editing program (e.g., Adobe Photoshop, Corel Photo Paint).
- **Graphics** should be created using any statistical software and saved/exported using the original extensions (.xls, .xlsx, .wmf, .eps, or .pdf).
- **Maps** should be professionally vectorized (drawn) in high resolution using CorelDraw or Adobe Illustrator software.

**Tables:** Tables should be typed with single spacing, include a short descriptive title (positioned above the table), and submitted as separate files. Legends for each table should be placed below the table. All tables should be numbered using Arabic numerals and cited consecutively in the text. Tables should not have vertical lines, whereas horizontal lines should be kept to a minimum. Tables should be a maximum of 18 cm wide by 23 cm high, using Times New Roman, size 9 font.

**Submission Process:** All manuscripts should be submitted online at <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo> and must follow the instructions at the top of each screen. The peer review process is performed completely online.

**On Resubmissions and Revisions:** The journal differentiates between: a) manuscripts that have been rejected and b) manuscripts that will undergo further consideration after requested changes have been made.

**Resubmissions:** If you have received a letter of rejection and wish the Editors to reconsider their decision, you may resubmit your manuscript. In this case, your file will be considered a new submission and you will receive a new manuscript number.

**Revision:** If the peer reviewers recommend revising your manuscript, please send it for a second analysis and review, forwarding the revised manuscript with the same manuscript number as the original.

**After Acceptance:** Once a manuscript is accepted for publication, the publication process includes the following steps:

- a. A copyright assignment form, provided by the Journal's Secretary signed by the authors, must be returned to the journal.
- b. Proofs will be sent to the corresponding author to be carefully checked for typesetting accuracy. Changes or additions to the edited manuscript cannot be allowed at this stage of the editing process. The corrected proofs should be returned to the Journal as soon as possible after their receipt by the corresponding author.
- c. Accepted articles will appear in the printed issues of the Journal in the order that they were submitted, revised, and accepted.
- d. Any accepted articles that have not yet appeared in print will be made available online while they await publication in the printed version (ahead of print).

**Page Charges:** There will be no page charges for publication in the journal.

The *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* or *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* does not provide any kind of translation service.

## **Workflow**

### **SUBMISSION WORKFLOW OF THE *REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL***

All manuscripts to be considered for publication in the *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* or *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* should be submitted in electronic form via the online submission system (<http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>).

**Journal's review policy (workflow):**

1 – All manuscripts submitted for publication in the Journal are initially evaluated by the Journal's administrative staff to ensure that the text adheres to the Journal's rules.

2 – Manuscripts that meet the standards of the journal are evaluated by the Editor, Associate Editors, or Section Editors to determine whether they fit the scope and editorial policy of the Journal. The administrative staff then sends these manuscripts to the Editor-in-Chief.

3 – The Editor-in-Chief (or Associate/Section Editors) assigns a manuscript to reviewers.

4 - Each submitted paper is sent to at least two reviewers for a double-blind peer review culminating in an evaluation and comprehensive written report. The manuscript is also sent to reviewers specializing in quantitative methods for analysis. The Editors use these reports to decide whether to accept the paper. If there is a difference of opinion among the reviewers, the manuscript will be sent to a third reviewer to help reach a final decision by the Journal's editorial board.

5 – Reviewer comments (Free Form Review) are forwarded to the corresponding author (principal contact for editorial correspondence); the corresponding author must answer any queries made.

6 – The authors must respond to the queries and return a revised version of the manuscript. The revised version is sent back to reviewers, who provide a final, reasoned report on the manuscript.

7 – Reviewers' scores of the manuscript and the authors' responses are analyzed by the Editor, Associate Editors, or Section Editors.

8 – The Editor-in-Chief makes the final decision on accepting the manuscript for publication.

9 – The final editorial decision (acceptance or rejection) is sent to the authors.

10 – The editorial process begins after the manuscript's official acceptance. Accepted manuscripts are sent for English editing and a full review.

11 – The English review results and edited document are sent to the authors for analysis; the authors must state whether they accept the edited version.

12 – Next, the layout process begins. The Journal will communicate closely with the corresponding author regarding figures, tables, photographs, maps, illustrations, and the article's general format.

13 – Authors must disclose any conflicts of interest or financial support and must provide a signed copyright assignment form.

14 – Proofs are sent to the corresponding authors to be checked for typesetting accuracy.

15 – The final version of each manuscript is selected, in the order received and edited, for use in issues of the Journal; manuscripts that are ready for publication are sent to Ahead of Print in SciELO Platform.

16 – The printed version of the Journal is published on a bimonthly basis; the Journal is also available online in open access form at <http://www.scielo.br/rsbmt>.

**ANEXO III - COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO PARA A REVISTA**

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine - M...



Dalmo Correia &lt;onbehalf@manuscriptcentral.com&gt;

Qui, 21/02/2019 13:41

**Para:** vane\_cecatto@hotmail.com; rodrigogenske@terra.com.br**Cc:** vane\_cecatto@hotmail.com; rodrigogenske@terra.com.br; larissadierings@gmail.com.br; rinaldogandra@yahoo.com.br; ealoth@hotmail.com ↗

21-Feb-2019

Dear Miss Cecatto:

Your manuscript entitled "EXPERIMENTAL PULMONARY PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS PROGRESSION AFTER P2X7 RECEPTOR INHIBITION" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

Your manuscript ID is RSBMT-2019-0090.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo> and edit your user information as appropriate.

21/02/2019

ScholarOne Manuscripts



Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

[Home](#)[Author](#)[Review](#)

## Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

**Submitted to**

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

**Manuscript ID**

RSBMT-2019-0090

**Title**

EXPERIMENTAL PULMONARY PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS PROGRESSION AFTER P2X7 RECEPTOR INHIBITION

**Authors**

Cecatto, Vanessa

Dierings, Larissa

Gandra, Rinaldo

Loth, Eduardo

**Date Submitted**

21-Feb-2019

[Author Dashboard](#)