

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

ANIELE TOMADON

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ARTRITE POR *Paracoccidioides brasiliensis***

CASCADEL-PR
FEVEREIRO/2016

ANIELE TOMADON

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ARTRITE POR *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Fatores que influenciam a morfofisiologia orgânica.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão

COORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Alexandre Loth

CASCADEL-PR
FEVEREIRO/2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANIELE TOMADON

**Avaliação da terapia fotodinâmica em modelo experimental de artrite por
*Paracoccidioides brasiliensis***

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Prof. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE (Orientadora)

Prof. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE

Prof. Dra. Luzmarina Hernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Sérgio e Marinesta.
Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus pais, Sérgio e Marinesta, e ao meu irmão Fábio pelo amor incondicional e profundo apoio. A vocês, minha família, sou eternamente grata por tudo que sou, pelo que consegui conquistar, e pela felicidade que tenho. Amo vocês!

Ao meu namorado Caio, por estar sempre ao meu lado e compreender minha ocasional ausência, pelo amor, paciência e motivação que me concedeu durante esta importante etapa. Obrigada por acreditar em mim, até mesmo quando eu não mesma não acreditava.

À minha orientadora, Professora Dra. Rose Meire Costa Brancalhão, não apenas no desenvolvimento da pesquisa, contribuindo muito para a ampliação dos meus conhecimentos, mas também pelo carinho e atenção durante esta etapa.

Ao Professor Dr. Eduardo Alexandre Loth, pela coorientação. Obrigada por todos os conselhos que me possibilitaram cursar este caminho e por me ensinar sempre mais no campo da pesquisa.

Às Professoras Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro e Dra. Luzmarina Hernandes por terem aceitado o convite para participar da banca de avaliação desta dissertação.

Aos professores do programa Mestrado em Biociências e Saúde da UNIOESTE, pela dedicação e comprometimento com a nossa turma. Obrigada pelas aulas maravilhosas.

Aos colegas do LABEF, pelo auxílio prestado sempre que necessário, generosamente. Também por dividirem as experiências com bom humor e cordialidade, animando meu percurso acadêmico.

Às colegas de mestrado e em especial as meninas do grupo Mesclandas, que se tornaram boas amigas. Desejo a vocês muito sucesso!

A minha prima Camilla, que mesmo morando longe está presente todos os dias nas boas lembranças, e as amigas Nathiely, Ariadne e Keli pela presença em minha vida, confiança e pelos ótimos momentos.

A todas as pessoas que colaboraram, de forma direta ou indireta, para a conclusão desta etapa de tamanha importância em minha vida.

RESUMO GERAL

A Paracoccidioidomicose (PCM), causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, é uma das micoses sistêmicas de maior prevalência na América Latina. A infecção pode ocorrer acidentalmente por inoculação direta ou, principalmente, através da inalação de propágulos de *P. brasiliensis*, que se instalam inicialmente nos pulmões e podem se disseminar para órgãos e tecidos do hospedeiro. Na forma aguda da doença a principal manifestação clínica é a síndrome linfoproliferativa febril, podendo ocorrer acometimento osteoarticular; o mesmo para a forma crônica, onde em 60% dos casos há alterações ósseas e articulares, geralmente tratadas por longos períodos com antifúngicos convencionais. A terapia medicamentosa é a mais utilizada para o controle da doença, entretanto, custos elevados, baixa adesão ao tratamento e efeitos colaterais adversos, levam a necessidade de se pesquisar terapias alternativas, como a fotodinâmica (TFD), que apresenta baixo custo e toxicidade, ação local e não induz resistência aos microorganismos. Estudos *in vitro* têm demonstrado resultados positivos da TFD contra diversos fungos, mas não existem relatos *in vivo* sobre sua ação no controle de *P. brasiliensis*. Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar a resposta da TFD em modelo experimental de artrite por *P. brasiliensis*. Para tanto, ratos *Wistar* machos (n=42), foram distribuídos em grupos submetidos à inoculação de *P. brasiliensis* e PBS (controle) na articulação do joelho direito. Após o desenvolvimento da artrite, os grupos foram tratados, do oitavo ao décimo primeiro dia com as terapias: grupos L40 e L120 tratados com laser nas dosagens de 40 e 120 J/cm², grupo AM tratado com o fotossensibilizador azul de metileno e grupos TFD40 e TFD120 tratados com TFD nas dosagens de 40 e 120 J/cm². Os tratamentos com laser e AM foram utilizados de forma individual como controle para a TFD. Nos grupos foram avaliados: o edema, através da medida do diâmetro látero-lateral da articulação; a intensidade da artrite, por exame histopatológico e a titulação do anticorpo anti-gp43, por ELISA. Os resultados mostraram que, a formação do edema foi menor nos grupos tratados com TFD 40 e 120 J/cm² (p=0,8359 e p=0,7167, respectivamente). A análise da intensidade da artrite, revelou que o grupo tratado com TFD 120 J/cm² apresentou as menores alterações morfológicas na articulação. A titulação de anticorpos anti-Gp43, demonstrou a maior produção de anticorpos específicos no grupo levedura, porém as diferenças não foram significativas na comparação entre os demais grupos. Assim, as evidências morfológicas de recuperação de aspectos teciduais normais, na articulação submetida a TFD 120 J/cm², revelaram o potencial uso desta terapia na redução da artrite causada por *P. brasiliensis*.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, articulações, fotoquimioterapia, artrite séptica.

GENERAL ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM), caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, is one of the most prevalent systemic mycosis in Latin America. Infection can occur accidentally through direct inoculation or mainly through inhalation of propagules of *P. brasiliensis*, which are installed initially in the lungs and can spread to organs and tissues of the host. In the acute form of the disease the major clinical manifestation is the febrile lymphoproliferative syndrome, occurring osteoarticular involvement; the same for the chronic form, in which 60% of cases, bone and joint changes usually treated for extended periods with conventional antifungal agents. Drug therapy is the most widely used to treatment the disease, however, high costs, poor adherence to treatment and adverse side effects, take the need to search for alternative therapies such as photodynamic (PDT), which has low cost and toxicity, local action and does not induce resistance to microorganisms. In vitro studies have shown positive results of PDT against various fungi, but there are no in vivo reports on its action in the control of *P. brasiliensis*. In this sense, the present study aimed to evaluate the PDT response in an experimental model of arthritis by *P. brasiliensis*. For this purpose, male *Wistar* rats (n = 42) were divided into groups submitted to inoculation with *P. brasiliensis* and PBS (control) in the right knee joint. After the development of arthritis, the mice were treated from the eighth to the eleventh day to the therapy: Groups L40 and L120 laser treated at dosages of 40 and 120 J/cm², AM group treated with the photosensitizer methylene blue and PDT40 and PDT120 groups treated with PDT at doses of 40 and 120 J/cm². The laser and AM therapies were used individually as a control for PDT. The groups were evaluated: edema, by measuring the lateral-lateral diameter of the joint; the intensity of arthritis, for histopathology and titration of anti-gp43 antibody by ELISA. The results showed that the edema formation was lower in the groups treated with PDT 40 and 120 J/cm² (p = 0.8359 and p = 0.7167, respectively). The analysis of the intensity of arthritis as assessed by histopathology showed that the group treated with PDT 120 J/cm² had the lowest morphological changes in the joint. Titration of anti-gp43 antibodies, showed the highest production of specific antibodies in the yeast group, but the differences were not significant when comparing the groups. Thus, the morphological evidence of normal tissue recovery aspects, the joint subjected to PDT 120 J/cm², revealed the potential use of this therapy in reducing arthritis caused by *P. brasiliensis*.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, joints, photochemotherapy, arthritis infectious.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2.OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3.REVISÃO GERAL DA LITERATURA.....	16
3.1 Paracoccidioides brasiliensis.....	16
3.2 Paracoccidioidomicose.....	18
3.3 Anatopatologia.....	23
3.4 Epidemiologia.....	26
3.5 Diagnóstico e tratamento.....	28
3.6 Terapia Fotodinâmica.....	29
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
5.ARTIGO CIENTÍFICO.....	39
ANEXO A	69
ANEXOB.....	65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Imagens do dimorfismo morfológico de *Paracoccidioide brasiliensis*17
- Figura 2 Desenho esquemático da transmissão de *Paracoccidioide brasiliensis* pela via respiratória, alcançando o pulmão do hospedeiro..20
- Figura 3 Fotografias dos aspectos clínicos da forma crônica da paracoccidioidomicose: A e B, lesões papulosas e úlcero-crostosas na face, resultantes da disseminação hematogênica. C, linfadenomegalia cervical e submandibular, fistulizadas. D, lesão vegetante com bordos irregulares em região perianal21
- Figura 4 Exames de imagens da paracoccidioidomicose. (A) e (B), radiologias convencionais do pulmão mostrando opacidades nodulares e micronodulares difusas. (C), tomografia de pulmão apresentando múltiplas cavitações. (D), aumento bilateral de adrenais22
- Figura 5 Imagens de aspectos clínicos da forma aguda da paracoccidioidomicose. A, lesão frontal e clavicular; B, comprometimento linfático supurado; C, linfadenomegalia inguinal à esquerda; e D, ascite e hepatomegalia22
- Figura 6 Fotomicrografia da região lateral da articulação do joelho de rato *Wistar*; coloração hematoxilina e eosina. O círculo delimita um granuloma organizado. Menisco (Me), cartilagem articular (Ca) e epífise óssea (Ep).....24
- Figura 7 Fotomicrografia de granuloma perineural, mostrando em detalhe *Paracoccidioides brasiliensis*; coloração de Grocott.....25
- Figura 8 Mapa mostrando a distribuição da PCM na América Latina e o grau de infestação.....26

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$: Oxigênio Singleto

AM: Azul de metileno

Anti-Pb: Anticorpo anti-*Paracoccidioides brasiliensis*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EROs/ ROS: Espécies reativas de oxigênio

ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*

Gp (43, 70, 30): Glicoproteína

J/cm²: Joules por centímetro quadrado

kDa: Kilodaltons

Laser: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

LED: Diodos emissores de luz

MHC-II: Complexo principal de histocompatibilidade classe II

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCM: Paracoccidioidomicose

RNA: ácido ribonucleico

TFD: Terapia fotodinâmica

UNIOESTE: Universidade Estadual do Oeste do Paraná

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Paracoccidioidomicose (PCM), causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina. No Brasil se apresenta como a oitava causa de morte por doenças infecciosas e parasitárias predominantemente crônicas, e ocorre com maior frequência nas regiões Sul e Sudeste do país. O Estado do Paraná apresentou a maior taxa de mortalidade por PCM em 2002, registrando 53,2% das mortes (COUTINHO et al., 2002; FORNAJEIRO et al., 2005; LACAZ et al, 2002).

A doença é um grave problema de saúde pública, não somente pelas dificuldades do tratamento utilizado, como também pelo fato de acometer principalmente homens na fase mais produtiva da vida, visto que 84,75% dos casos ocorrem entre 30 e 59 anos, atingindo principalmente trabalhadores rurais (COUTINHO et al, 2002; NEGRONI, 1993; RESTREPO, 1985; WANKE; LONDERO, 1994). Como provedores familiares, verifica-se assim que a patologia pode comprometer a renda familiar com consequências econômicas e sociais. Soma-se o fato de que o diagnóstico é tardio já que as pessoas afetadas demoram a procurar a rede de saúde devido ao desconhecimento da doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A infecção pelo patógeno pode ocorrer acidentalmente por inoculação direta ou, principalmente, através das vias aéreas superiores do hospedeiro, pela inalação de conídios ou propágulos do fungo, que se instalam, inicialmente, nos pulmões, de onde o fungo pode se disseminar por todo o corpo causando lesões em órgãos internos e mucocutâneos (FRANCO et al., 1987).

Clinicamente a PCM pode se manifestar de duas formas; na forma de infecção, o fungo instalado no hospedeiro permanece assintomático por longo período de tempo, e na forma doença, é sintomática. A PCM doença pode, de acordo com os sinais e sintomas, ser classificada ainda como: aguda ou juvenil,

normalmente severa, de evolução rápida que afeta predominantemente jovens, de ambos os sexos, e compromete células do sistema retículo-endotelial; e crônica ou adulta, de instalação lenta e gradual, observada com maior frequência em indivíduos do sexo masculino, entre 30 e 50 anos (FRANCO et al., 1989; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Na forma crônica o órgão mais acometido é o pulmão, já na juvenil a principal manifestação clínica é a síndrome linfoproliferativa febril. Nesta, o acometimento osteoarticular é frequente, estima-se que 20 a 40% dos pacientes apresentam alterações ósseas e 5 a 10%, alterações articulares (ROCHA; CAMPOS, 2007; SCHEINBERG et al., 1994).

O acometimento osteoarticular, presente em até 60% dos casos de PCM crônica, foi reportado inicialmente em 1911. Não se conhecem os fatores que predispõem a este tipo de comprometimento, mas acredita-se que traumas localizados facilitem o estabelecimento do fungo neste sistema, durante a fase de fungemia (SILVESTRE et al., 1997). A alteração articular se apresenta como sinovite aguda, muitas vezes associada a febre, emagrecimento e prostração, e pode evoluir para a perda da função articular (SCHEINBERG et al., 1994; SILVESTRE et al., 1997).

Várias terapias têm sido utilizadas no controle de micoses fúngicas, como a medicamentosa e a terapia fotodinâmica (TFD). Entre as classes de medicamentos disponíveis para combater *P. brasiliensis*, os derivados azólicos estão inseridos como tratamento preferencial; porém apresentam efeitos colaterais severos, por agirem de forma sistêmica, além do custo alto, baixa adesão ao tratamento e das recidivas da doença (MARTINEZ, 2006).

No caso da TFD, seu uso apresenta algumas vantagens, pois a ação é centrada no microorganismo, tem poder cicatrizante e não causa efeitos danosos significativos em células humanas saudáveis. A TFD consiste no uso de um composto fotossensibilizador, que ativado pela luz leva a formação de espécies reativas de oxigênio e provoca a morte de microorganismos por dano oxidativo (SOUKOS et al., 1996).

Vários estudos, principalmente *in vitro*, utilizam o corante azul de metileno como agente fotossensibilizador para a TFD, apresentando efeitos positivos no tratamento de bactérias e fungos, como *Candida albicans*. No caso de *P. brasiliensis*, estudos *in vitro* utilizando a TFD têm se mostrado benéficos, levando a

morte do fungo (ALVES et al., 2013; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; NOWOTNY, 2011; PRATES et al., 2008); entretanto, não há relatos de estudos *in vivo* sobre a ação desta terapia em *P. brasiliensis*. Ainda, com relação à patologia osteoarticular, os estudos se apresentam na sua maioria como relatos de caso, onde o diagnóstico é tardio e a terapia medicamentosa é a utilizada no tratamento (ROCHA; CAMPOS, 2007; SILVESTRE et al., 1997).

Neste sentido, considerando o alto custo socioeconômico da PCM, e as sequelas secundárias à infecção, que podem incapacitar o indivíduo para o trabalho (MOTA, 1996), verificou-se a necessidade de se ampliar as opções terapêuticas no tratamento da PCM. Com esta finalidade, utilizando-se do modelo experimental rato, por se assemelhar ao humano na fisiologia e anatomia articular, o presente estudo analisou a potencial utilização da TFD no tratamento da artrite experimental, causada por *P. brasiliensis*, na articulação do joelho de ratos *Wistar*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos da TFD sobre a artrite induzida por *P. brasiliensis* em ratos *Wistar*.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a intensidade da artrite causada por *P. brasiliensis* na articulação do joelho através de análises morfológicas ;
- Avaliar a eficiência do tratamento da TFD, com o uso:
 - da titulação de anticorpos anti-Pb, por ELISA;
 - das análises morfológicas teciduais e de edema;
- Comparar a eficiência da TFD nas doses 40 e 120 J/cm².

3. REVISÃO GERAL DA LITERATURA

3.1 *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo *P. brasiliensis*, agente etiológico da PCM, foi descrito inicialmente, em 1908, por Adolfo Lutz (1855-1940) no periódico *Brazil-Médico*. A revista trouxe a primeira parte dos resultados, iniciados em 1905, no artigo “Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no *Brazil*. Contribuição ao conhecimento das *hyphoblastomicoses* americanas”. Nesta publicação, Lutz obteve o cultivo do parasito, a partir de lesões de indivíduos infectados, e analisou a estrutura e modo de reprodução. Ao verificar semelhanças morfológicas com micoses anteriormente descritas na Argentina e nos Estados Unidos, incluiu-a em um grupo denominado de hifoblastomicoses americanas (LACAZ et al., 2002; LUTZ, 1908).

Afonso Splendore, um médico, bacteriologista e sanitarista, estudou casos desta micose fúngica de 1908 à 1915 e, devido a inexistência de terapia específica no período, a doença era fatal. Em 1912, Splendore classificou o agente etiológico da PCM no gênero *Zymonema*. A doença passou a ser denominada, então, de “blastomicose brasileira” e logo após, “blastomicose sul-americana”, devido aos casos semelhantes relatados na América do Sul (LACAZ, 1994; LACAZ et al., 2002).

Em 1930, o médico Floriano Paulo de Almeida, incluiu o patógeno no gênero *Paracoccidioides*, dentro do Reino Fungi. A classificação foi baseada em estudo comparativo com o granuloma coccidioco nos Estados Unidos e no Brasil, estabelecendo as diferenças notáveis entre o agente etiológico da PCM e *Coccidioides*, confirmando assim os achados descritos por Lutz (ALMEIDA, 1930). A partir de 1930, os estudos sobre PCM se intensificaram, levando ao desenvolvimento terapêutico-farmacológico e, com o surgimento da microscopia eletrônica, houve uma melhor compreensão da biologia celular do fungo (LACAZ et al., 1994).

A oficialização do termo PCM foi instituída em 1971, durante o primeiro simpósio da PCM, na cidade de Medellín, Colômbia (VALLE; COSTA, 2001).

Com base em estudos de filogenia molecular, *P. brasiliensis* é descrito como pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Plectomyceto, ordem Onygenales, família Onygenaceae, gênero *Paracoccidioide* e epíteto específico *brasiliensis* (SAN-BLAS, 1993).

Dentre aproximadamente 100.000 espécies fúngicas existentes, apenas um pequeno grupo leva ao desenvolvimento de micoses sistêmicas humanas, sendo a maioria causada por fungos dimórficos, tornando esta alteração morfológica um aspecto importante no mecanismo de virulência e de patogenicidade (SAN-BLAS et al., 1987).

P. brasiliensis possui dimorfismo morfológico termo-dependente e em temperaturas inferiores a 25°C, *in vitro* ou em ambiente sob condições de saprofitismo, cresce na forma de micélios; composto por filamentos de células cilíndricas ramificadas, denominadas hifas (Figura 1). A forma leveduriforme, verdadeiramente patogênica, se desenvolve nos tecidos infectados ou quando cultivada *in vitro* a 36°C, mede de 5 a 25 µM de diâmetro e apresenta multibrotamentos, originados da célula-mãe, aspecto conhecido como “roda de leme” (BRUMMER et al., 1993; RESTREPO-MORENO, 2003).

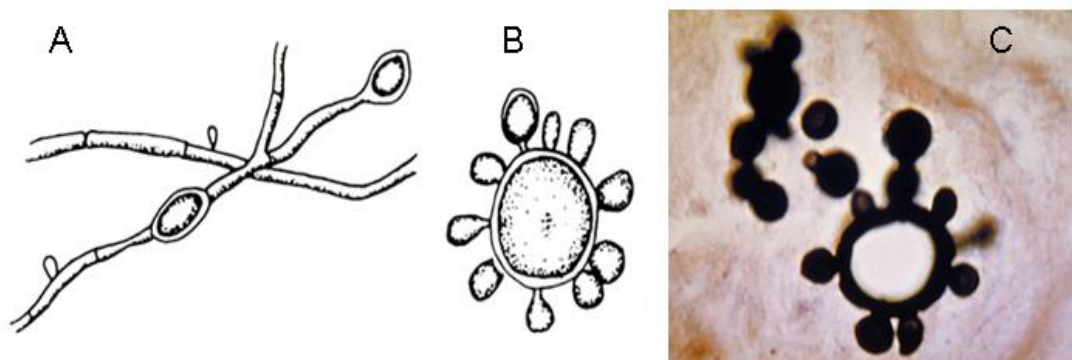


Figura 1. Imagens do dimorfismo morfológico de *Paracoccidioides brasiliensis*. Micélio (A) e levedura com multibrotamentos (B e C). Coloração Grocott, em C. Disponível em: <<http://atlasmicologico.blogspot.com.br/p/sistemicas.html>>. Acesso em: 01 out. 2014.

A temperatura é um dos estímulos mais notórios no dimorfismo de *P. brasiliensis*, porém fatores hormonais, como a presença de 17-β-estradiol, e

nutricionais podem interferir neste processo de alteração da forma não virulenta para patogênica (VILLAR et al., 1998).

P. brasiliensis tem seu habitat possivelmente localizado no solo e já foi isolado em solos em diversos países como Argentina, Brasil e Venezuela. Entretanto seu nicho ecológico ainda não foi corretamente determinado, o que impede um melhor conhecimento da forma e do momento exato que os indivíduos são infectados pelo patógeno (ALBORNOZ et al., 1971; BALABANOV et al., 1964; NEGRONI et al., 1966; SHOME; BATISTA et al., 1963).

A infecção de animais silvestres com intenso hábito fossorial e escavatório, como os tatus, reforça a teoria que o fungo tem o solo como habitat. No entanto, estes organismos devem ser considerados hospedeiros acidentais e não reservas naturais do fungo (CONTI-DIAZ, 2007).

O habitat natural do fungo aparece em estudos com prevalência em áreas rurais, com temperaturas entre 10-28°C, em regiões com invernos curtos e verões chuvosos, com índice pluviométrico elevado (1300-2500 mm/ano), vegetação abundante ou lavouras extensas, solo rico em proteínas, nos vales e nas proximidades de grandes rios (BARBOSA et al., 1983; RESTREPO et al., 2001).

3.2 Paracoccidioidomicose

As infecções fúngicas vêm despertando atenção da comunidade científica, devido aos crescentes índices de mortalidade e morbidade e pela ineficiência na adesão ao tratamento. Além disso, esse tipo de infecção causada por fungos patogênicos ou com patogenicidade intrínseca baixa, aumenta em pacientes imunodeprimidos (RIVITTI; AOKI, 1999); e a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem demonstrando a importância do estudo das micoses tropicais e seus impactos pelo mundo (LUPI et al., 2005; PRADO et al., 2009);

No Brasil, as mortes causadas por micoses sistêmicas como PCM, criptococose, histoplasmose, candidíase, aspergilose, coccidioidomicose e zigomicose, atingiram um número de 3.583, entre 1996-2006, sendo a PCM responsável por 51,2% dos casos. Porém, acredita-se que dados sobre doenças fúngicas sejam sub-notificados, uma vez que, no caso da PCM não é doença de notificação compulsória (PRADO et al., 2009).

A PCM se encaixa no grupo das doenças infecciosas consideradas “negligenciadas”, principalmente por receber pouca atenção, tanto das instituições

envolvidas em termos de políticas públicas de saúde, como da indústria farmacêutica (MARTINEZ et al., 2010).

Inicialmente, acreditava-se que a PCM era uma micose mucocutânea, pois essas lesões eram frequentemente o único sintoma clínico, o que levou a teoria da patogênica traumática, onde o patógeno é introduzido por traumas com fragmentos de vegetais, utilizados para limpeza dentária no meio rural. Contudo, estudos com animais em laboratório não comprovaram a teoria, sendo as lesões na mucosa oral geralmente precedidas ou acompanhadas de lesões pulmonares (CONTI-DIAZ, 2008; LACAZ et al., 2002; LONDERO; FISCHMAN, 1967).

A forma mais aceitável de infecção por *P. brasiliensis* é pela via respiratória, através da inalação de propágulos do fungo, que alcançam o parênquima pulmonar e se transformam em leveduras no tecido do hospedeiro (Figura 2). A transmissão não ocorre de pessoa a pessoa (FRANCO et al., 1987; MEDOFF et al., 1987; RESTREPO, 1985).

A primeira interação parasita-hospedeiro ocorre nos alvéolos pulmonares e a partir dos pulmões, o fungo pode se disseminar por via linfo-hematogênica para outros órgãos e sistemas, como fígado, baço, articulações, osso e sistema nervoso central (CAMARGO; FRANCO, 2000; SAN-BLAS, 1993).

Uma vez no organismo o fungo passa a se multiplicar por brotamento múltiplo e pode ser eliminado por células do sistema auto imune, ou então persistir e multiplicar produzindo lesão tecidual. A evolução e as consequências da infecção vão depender de fatores relacionados ao fungo, como virulência, composição antigênica e a resistência do hospedeiro (CALICH et al., 1985).

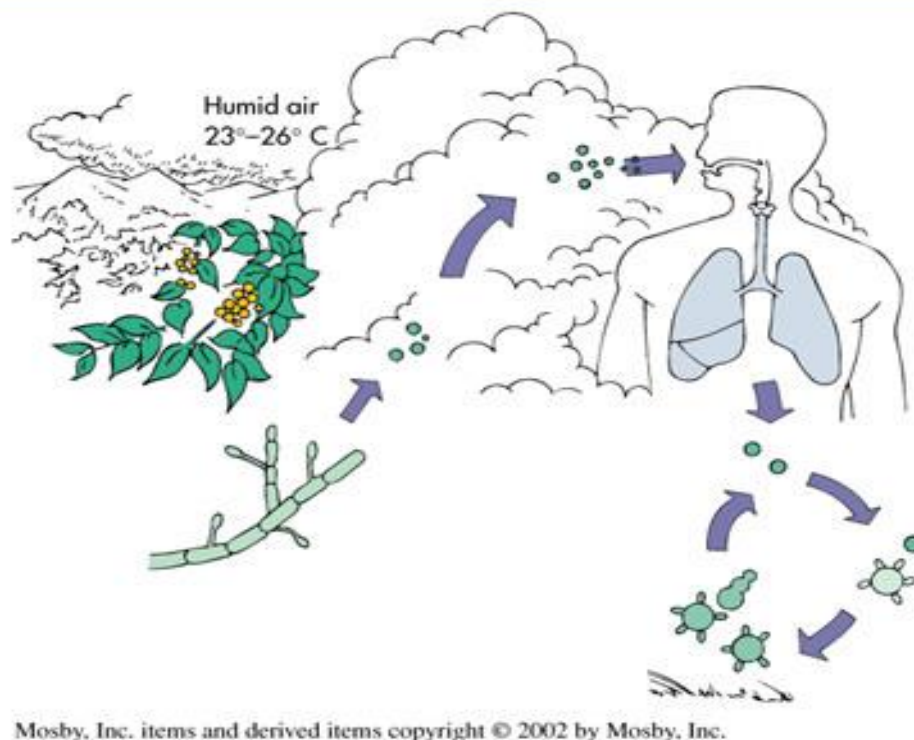


Figura 2. Desenho esquemático da transmissão de *Paracoccidioides brasiliensis* pela via respiratória, alcançando o pulmão do hospedeiro. Disponível em: <<http://quizlet.com/9296198/fungal-rt-infections-flash-cards/>>. Acesso em: 01 out. 2014.

A PCM apresenta-se sobre duas formas clínicas principais: a infecção e a doença. A infecção é forma assintomática e ocorre geralmente em indivíduos saudáveis, que residem ou residiram nas áreas endêmicas, ou que tenham lesões residuais inativas de *P. brasiliensis*. Estes indivíduos possuem reatividade ao teste intradérmico com paracoccidiodina (RESTREPO-MORENO, 1993).

Já a PCM doença é sintomática e, dependendo da manifestação, é classificada em aguda e crônica. Esta representa cerca de 90% dos casos, possui longo período de incubação (meses a anos), mais frequente em homens com idade superior a 30 anos. Apresenta alto índice de envolvimento pulmonar e se desenvolve a partir do complexo primário, que diz respeito à instalação do fungo no pulmão, ou da reativação de um foco assintomático, foco quiescente (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

O fungo, dependendo de fatores relacionados a virulência, pode se alojar em um único órgão (unifocal), ou se disseminar para outros órgãos e tecidos (multifocal), causando lesões secundárias em membranas, mucosas, pele,

linfonodos e glândulas adrenais (BRUMMER, et al., 1993; FRANCO et al., 1987; LONDERO; RAMOS, 1990; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006) (Figuras 3 e 4).



Figura 3. Fotografias dos aspectos clínicos da forma crônica da paracoccidioidomicose: A e B, lesões papulosas e úlcero-crostosas na face, resultantes da disseminação hematogênica. C, linfadenomegalia cervical e submandibular, fistulizadas. D, lesão vegetante com bordos irregulares em região perianal (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

No caso da PCM doença na forma aguda, também conhecida como subaguda ou juvenil, representa cerca de 3 a 5% dos casos, possui curtos períodos de incubação (semanas a meses), afeta principalmente crianças e jovens de ambos os sexos, e é a forma mais grave e com pior prognóstico. Seu desenvolvimento afeta o sistema retículo endotelial e a manifestação clínica mais importante é a síndrome linfoproliferativa febril que se caracteriza por um desenvolvimento rápido, com acometimento osteoarticular e de órgãos como, fígado, baço, gânglios linfáticos e medula óssea (FRANCO et al., 1987; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; SINDRIN; MOREIRA, 1999) (Figura 5).

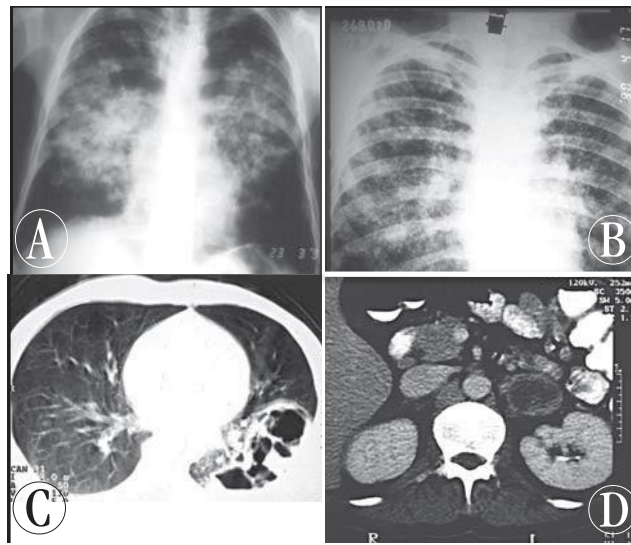


Figura 4. Exames de imagens da paracoccidioidomycose. (A) e (B), radiologias convencionais do pulmão mostrando opacidades nodulares e micronodulares difusas. (C), tomografia de pulmão apresentando múltiplas cavitações. (D), aumento bilateral de adrenais (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

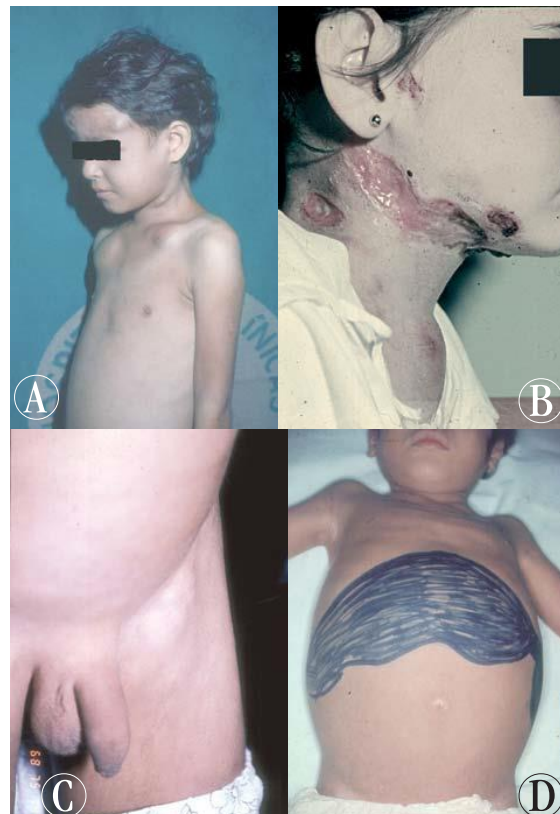


Figura 5. Imagens de aspectos clínicos da forma aguda da paracoccidioidomycose. A, lesão frontal e clavicular; B, comprometimento linfático supurado; C, linfadenomegalia inguinal à esquerda; e D, ascite e hepatomegalia (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

O acometimento osteoarticular foi reportado inicialmente por Pereira e Vianna, em 1911, e pode ser observado em até 20% dos casos na forma aguda. Porém, Severo et al. (1996) e David et al. (1997) relataram que o comprometimento osteoarticular pode ocorrer em cerca de 60% dos casos da forma crônica e é secundário ao acometimento sistêmico, principalmente pulmonar e cutâneo.

O comprometimento articular na PCM pode ocorrer por via hematogênica, mais comumente observada em regiões com melhor irrigação sanguínea, como a metáfise e a epífise de ossos longos, ou por contiguidade através de lesões ósseas epifisárias adjacentes, que é o mais frequentemente observado. Não se conhecem os fatores que predispõem a este tipo de comprometimento, mas acredita-se que traumas localizados facilitem o estabelecimento do fungo neste sistema, durante a fase de fungemia (SILVESTRE et al., 1997).

O acometimento articular acontece como uma inflamação aguda visível ao exame clínico, que pode estar associado com hipertermia, perda de peso e prostração, podendo evoluir com derrame articular e perda da função (ROCHA; CAMPOS, 2007; SCHEINBERG et al., 1994; SILVESTRE et al., 1997).

3.3 Anatopatologia

P. brasiliensis tem a parede celular constituída de lipídios e proteínas. Na fase miceliar há uma proporção maior de cisteína/cistina em relação à leveduriforme (MARQUES et al., 2003). Outros constituintes estão presentes, como os polissacarídeos α -(1,3)-glucana e β -(1,3)-glucana e os antígenos extracelulares gp43, gp70 e gp30, apresentam também estrutura antigênica complexa, com epítomos que se relacionam a patogenicidade (HOGAN et al., 1996).

O principal componente antigênico é a glicoproteína de peso molecular 43kDa, denominada gp43, que na célula fúngica é armazenado em grandes vacúolos citoplasmáticos e a secreção ocorre em regiões específicas da parede celular (STRAUS et al., 1996; VICENTINI et al., 1994). Esta glicoproteína age se ligando a laminina onde inibe a expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II) e a função macrófaga, e apresenta efeitos proteolíticos sobre proteínas estruturais como colágeno, elastina e caseína (FERREIRA et al., 2010).

O contato de *P. brasiliensis* com o hospedeiro desencadeia histopatologicamente um padrão comum às micoses sistêmicas profundas. Inicia-se

uma reação inflamatória congestivo-exudativa com fluxo de leucócitos polimorfonucleares. Os neutrófilos são degranulados, em tentativas frustradas de fagocitar o fungo ou por atividades citotóxicas, formando um microabscesso delimitado. Progressivamente, estas células são substituídas por macrófagos que absorvem microorganismos e restos celulares. Nessa etapa, histiócitos ativados acumulam-se em nódulos frouxos e células gigantes multinucleadas, adquirindo uma morfologia peculiar, caracterizada por “células epitelioides” (BRITO; FRANCO, 1994; CAMARGO; FRANCO, 2000).

O granuloma é constituído por: arranjo nodular de células epitelioides, células gigantes multinucleadas do tipo Langhans, linfócitos, fibroblastos e o agente causador (fungo). Quando o fungo esta presente nesta estrutura ele é detectado em apenas uma pequena proporção de células fagocíticas, geralmente no centro do granuloma (BRITO; FRANCO, 1994; FRANCO et al., 1994) (Figura 6 e 7).

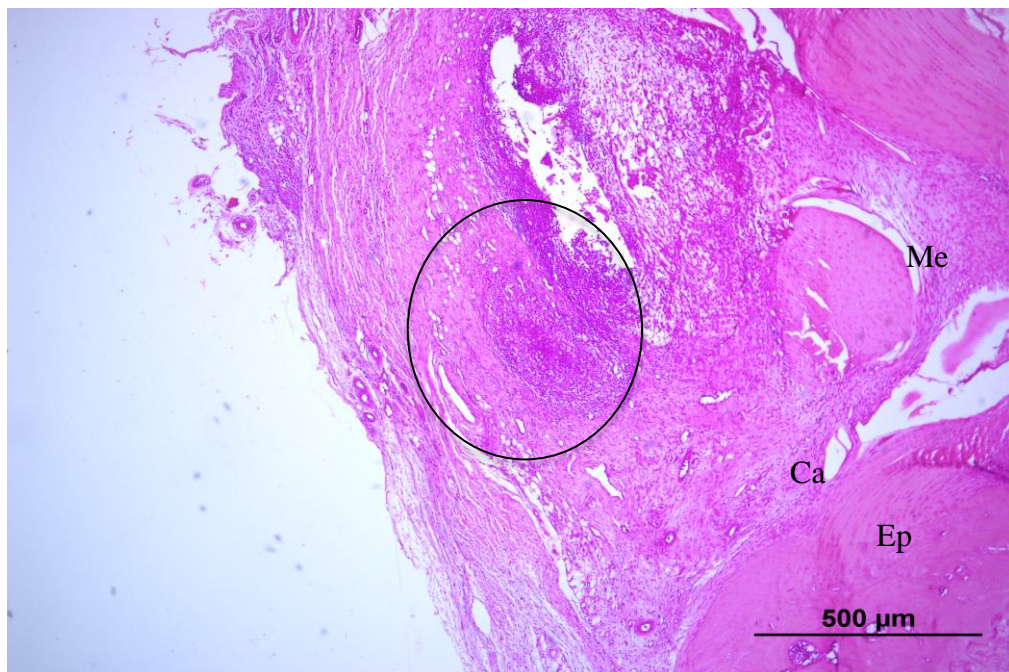


Figura 6. Fotomicrografia da região lateral da articulação do joelho de rato *Wistar*; coloração hematoxilina e eosina. O círculo delimita um granuloma organizado. Menisco (Me), cartilagem articular (Ca) e epífise óssea (Ep) (LOTH et al., 2014).

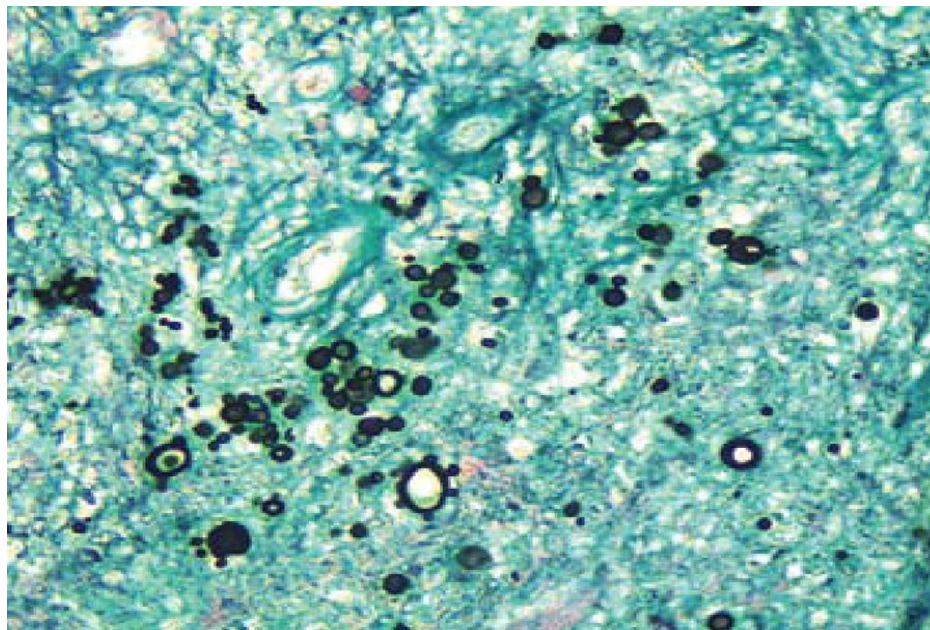


Figura 7. Fotomicrografia de granuloma perineural, mostrando o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (em preto); coloração de Grocott (MULLER; MIRANDA, 2013).

O granuloma evolui passando por três estágios, o monicitico-neutrofílico, um dia após o contato com o fungo; o pré-granulomatoso, de dois a três dias após o contato com *P. brasiliensis*; e o granulomatoso, a partir do sétimo dia. Após 21 dias, a demarcação estrutural dos granulomas está bem definida pela matriz, com três zonas aparentes: a central, sem colágeno; a paracentral, com células fibroblásticas; e a zona periférica, formando uma cápsula fibrótica (KERR et al., 1988).

A resposta adaptativa celular, formação do granuloma, que ocorre na PCM humana ou na experimental, representa usualmente uma tentativa especializada e eficiente na contenção da infecção, impedindo sua multiplicação e disseminação pelos tecidos. Em indivíduos com resposta imune celular preservada, observa-se a formação de granulomas bem definidos e naqueles que apresentam comprometimento imunológico, a inflamação é desorganizada, com granulomas frouxos e mal definidos, com presença de linfócitos e proteínas e áreas de necrose (MOTA et al., 1985).

3.4 Epidemiologia

A PCM é considerada uma micose restrita à América Latina, com distribuição geográfica limitada do México até a Argentina (GREER; RESTREPO, 1977). Mesmo nesta área endêmica sua distribuição é heterogênea, estima-se que existam aproximadamente 10 milhões de pessoas infectadas, sendo o Brasil responsável por cerca de 80% dos casos relatados, seguido da Venezuela, Colômbia e Argentina (FRANCO et al., 1994; RESTREPO et al., 2001, SHIKANAI-YASUDA et al., 2006) (Figura 8).

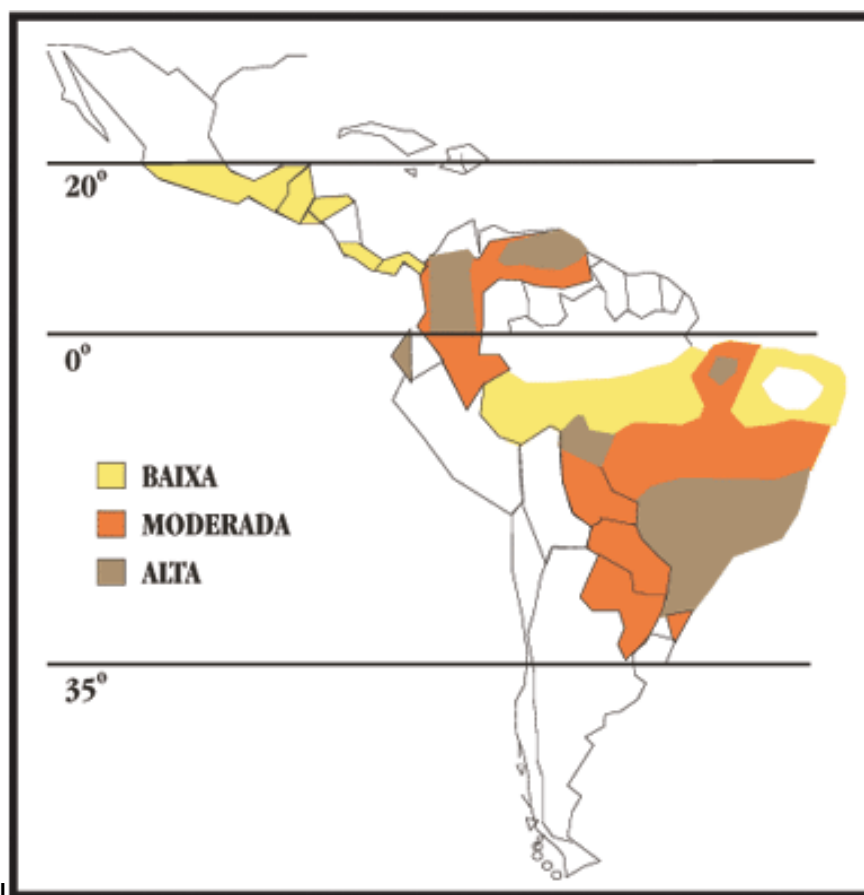


Figura 8. Mapa mostrando a distribuição da PCM na América Latina e o grau de infestação (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A maior incidência de casos no Brasil ocorre na região Sul, Sudeste e Centro-Oeste, entretanto, esta distribuição tem se modificado ao longo das últimas décadas, aumentando o número de pacientes diagnosticados com PCM nas regiões Centro-Oeste e Norte. Isto é devido, provavelmente, à descentralização do diagnóstico e a fatores provenientes da abertura de novas fronteiras agrícolas como desmatamento, ruralização e revolvimento do solo (COUTINHO et al., 2002; WANKE, 1999).

Em áreas endêmicas da doença a incidência estimada é de, aproximadamente, 1 a 3 casos clínicos para cada 100.000 habitantes por ano. Já a taxa de mortalidade situa-se em torno de 1,45:1.000.000 de habitantes, sendo considerada a oitava causa de mortalidade entre as doenças infectoparasitárias crônicas. A taxa de letalidade situa-se entre 2% a 23%, atingindo até 30% em paciente imunossuprimidos (COUTINHO et al., 2002; MARTINEZ, 1996; PANIAGO et al., 2003; SANTO, 2008).

A incidência da PCM é desigual entre os sexos, com predomínio de 80 a 90% dos casos no sexo masculino, chegando a relação de 15 homens para uma 1 mulher infectada em áreas endêmicas. Porém, esses dados não apresentam relação com o grau de exposição dos mesmos, uma vez que estudos indicam que ambos os sexos têm contato com o patógeno (RESTREPO et al., 1984). Essa discrepância pode ser justificada devido a existência de receptores para estrogênio na membrana plasmática de *P. brasiliensis*, e que altas concentrações de estrógeno funcionam como inibidores dose-dependentes, suprimindo a conversão para a forma leveduriforme do fungo (ARISTIZABAL et al., 1998; RESTREPO et al., 1984).

Admite-se que o solo seja o reservatório natural de *P. brasiliensis* tornando os trabalhadores rurais, devido ao contato direto, os mais atingidos pelo fungo. Estes trabalhadores, geralmente, estão inseridos em estratos sociais de baixo nível socioeconômico, o que muitas vezes leva a uma menor preocupação com os sintomas, diagnóstico tardio e pior prognóstico (MARTINEZ et al., 1992). Espunhardi et al. (2010) verificaram que 86% dos pacientes com PCM eram moradores da zona rural e 14% moravam na zona urbana. Estes, entretanto, já moraram ou tiveram contato com a zona rural. O fato do fungo ter a capacidade de permanecer por longos períodos de forma assintomática e a população migrar no território, dificultam uma compreensão melhor sobre seu habitat e diagnóstico precoce. *P. brasiliensis* pode afetar também habitantes de áreas suburbanas e até áreas urbanas em diferentes profissões (BITTENCOURT et al., 2005; RESTREPO, 1985).

A predisposição de indivíduos alcoólatras a micoses vem sendo observada em fungos como candidíase, criptococose e esporotricose. Alcoolismo, desnutrição e tabagismo podem estar ligados a patogenia da doença. Martinez et al. (1992), afirmaram que mais de 50% dos pacientes diagnosticados com PCM faziam uso de bebidas alcoólicas diariamente. Já o tabagismo aparece com uma frequência de 90% dos pacientes com a doença (MARTINEZ et al., 1992; PANIAGO et al., 2003).

A ocorrência de PCM em crianças varia de 2 ou 3 casos para cada 1.000 em adultos. Essa baixa ocorrência deve-se, provavelmente, ao fato de entrarem menos em contato com fungo em suas atividades diárias, e ao longo período de latência da PCM, de tal modo que a infecção adquirida na infância se manifestaria como doença anos mais tarde (LACAZ et al., 1982; MARTINEZ, 2005). Apesar de 10 a 50% dos habitantes de zonas endêmicas serem expostos ao agente da PCM, apenas uma pequena parte desenvolve alguma manifestação clínica da doença (FAVA; FAVANETTO, 1998).

A real prevalência e incidência da PCM não são possíveis de serem estabelecidas com dados totalmente corretos, devido ao fato desta micose ser sub-notificada. Os dados disponíveis são obtidos a partir de publicações da literatura e registros hospitalares e não representam o número total de pessoas infectadas (CAMPOS et al., 2008; PANIAGO et al., 2003).

3.5 Diagnóstico e tratamento

Existem diversas metodologias para o diagnóstico da PCM, mas o considerado “padrão-ouro” é a identificação de elementos fúngicos de *P. brasiliensis*, através de técnica direta com exame a fresco de espécimes clínicos, como escarro, análise de pus ou biópsia tecidual (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Dentre as técnicas sorológicas ou indiretas, a imunodifusão é a mais utilizada, devido principalmente a simplicidade do teste, a boa confiabilidade nos resultados e a ausência da necessidade de equipamentos de alto custo. Outras técnicas sorológicas têm sido utilizadas em centros de referência, como a de contra-imunoeletroforese, *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) e *immunoblotting* (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

No tratamento da PCM há um arsenal variado de fármacos clássicos considerados eficazes, mas com limitações de toxicidade, interação medicamentosa (anticoagulantes orais e fenobarbital) e custo (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Medicamentos a base de sulfamídicos ou drogas antifúngicas são utilizadas no tratamento da PCM; sendo utilizados com mais frequência o Itraconazol, o cotoconazol, o sulfametoxazol, o trimetropim e a anfotericina B, no entanto, estes fármacos apresentam vários efeitos colaterais indesejáveis como: diarreia, náusea, vômito, eritema e efeitos hepatotóxicos (CAMPOS et al., 1984; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

O fármaco anfotericina B, antibiótico isolado do ascomiceto *Streptomyces sp.*, foi o primeiro tratamento administrado em pacientes com micoses profundas, no ano de 1958; sendo reservado para os casos graves da PCM por ser considerado nefrotóxico e apresentar muitos efeitos colaterais, requerendo longo período de hospitalização para a sua administração. É utilizado por via endovenosa e atua mediante ligação ao ergosterol da membrana plasmática da célula fúngica, formando poros que alteram a permeabilidade celular e levam a sua morte (CAMPOS et al., 1984).

Os derivados azólicos atuam por bloqueio na síntese do ergosterol, que faz parte da membrana plasmática da célula fúngica, da síntese de DNA e RNA, e na organização dos microtúbulos. Os três representantes dessa classe, cetoconazol, itraconazol e fluconazol, têm sido utilizados com eficácia no tratamento da PCM (MARTINEZ, 2006).

A duração do tratamento depende do grau de imunossupressão e desnutrição do paciente, da virulência e inóculo do fungo, e do antifúngico utilizado. O Consenso Brasileiro de Paracoccidiodomicose descreve esquemas de tratamento da PCM que variam de 6 a 24 meses (ARAUJO et al., 2009; BRUMMER et al., 1993; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Os principais desafios terapêuticos da PCM são a longa duração do tratamento, a alta frequência de recaídas, sequelas como a fibrose pulmonar, os efeitos colaterais medicamentosos e desenvolvimento da resistência microbiana (MENDES, 2009).

Assim, como para diversas outras infecções fúngicas, o tratamento medicamentoso da PCM persiste como desafio não totalmente resolvido. Para tanto, há necessidade de novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos, bem como terapias alternativas ou complementares as existentes (ALMEIDA et al., 2009).

3.6 Terapia Fotodinâmica

Entre as terapias alternativas que vêm sendo pesquisadas para o tratamento de doenças infecciosas, está a TFD, que devido ao seu efeito microbicida e cicatrizante, atua na cura de feridas (PERUSSI, 2007).

A modalidade terapêutica TFD, associa o uso de luz, oxigênio e compostos fotossensíveis para causar morte ou a inativação de microorganismos. As primeiras

experiências com TFD surgiram no início do século XX, em Monique, onde Oscar Raab e seu professor Herman von Tappeiner observaram que a exposição do corante alaranjado de acridina associado a luz foi letal ao protozoário paramécio. Isoladamente, nem o corante e nem a luz apresentam a capacidade de produzir danos ao sistema biológico alvo (ACKROYD et al., 2001).

O princípio básico da TFD é a presença de um agente fotossensibilizador, que quando irradiado por uma luz visível, de comprimento de onda adequado, e na presença de oxigênio celular, leva a produção de uma forma de oxigênio excitado e resulta em uma sequência de processos fotoquímicos e fotobiológicos, que geram produtos fototóxicos danosos causando a morte da célula-alvo (LUKSIENE, 2003; PERUSSI, 2007). Os radicais gerados pela TFD têm semi-vidas extremamente curtas e reagem apenas nos seus locais de formação, o que reduz a sua toxicidade para os tecidos normais adjacentes (NYMAN; HYNNINEN, 2004).

Esta reação pode ocorrer por dois mecanismos, o tipo I e II. No tipo I envolve a transferência de elétrons ou captação de átomos de hidrogênio entre o fotossensibilizador em seu estado excitado (triplete) e moléculas de substrato, formando radicais livres, que vão reagir com o oxigênio, resultando em espécies reativas de oxigênio (EROs, ou ROS, do inglês, *reactive oxygen species*), como superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, os quais podem oxidar uma variedade de biomoléculas. Já o mecanismo do tipo II é baseado na produção de um estado eletronicamente excitado e altamente reativo de oxigênio, o oxigênio singleto (1O_2) que reage com componentes celulares, principalmente em lipossomos, membrana plasmática e proteínas, levando a morte celular (ZHU; FINLAY, 2008).

A produção do oxigênio singleto, espécies reativas de oxigênio, depende da concentração e localização do agente fotossensibilizador usada na TFD e da dose de luz irradiada no tecido-alvo (TOREZAN, 2009).

Fotossensibilizadores ideais para a TFD precisam apresentar características fotoquímicas e fotofísicas específicas como, atoxicidade no escuro, inativos em seu estado fundamental, absorver luz na região do visível, síntese rápida e com alto rendimento, baixo custo, seletividade pelas células-alvos, rápida eliminação pelas células não-alvo, alta capacidade de produção de oxigênio singleto, e ausência de mutagenicidade (CALZAVARA; VENTURINI; SALA, 2005).

Os corantes são caracterizados pela capacidade de absorver luz visível, sendo alguns desses pigmentos capazes de participar ou induzir reações

fotoquímicas, podendo ser utilizados como agente fotossensibilizador na TFD. Ao selecioná-lo, deve-se levar em consideração seu o espectro de absorção óptica, ou seja, o comprimento de luz que consegue ser absorvido pelo cromóforo presente no corante, pois, é necessária a interação entre esses fatores para obter o efeito fotodinâmico (MACHADO, 2000; ZHU; FINLAY, 2008).

Dentre diversos corantes o mais utilizado é o azul de metileno (AM), corante orgânico descoberto 1876, pertence à classe dos corantes fenotiazínicos, os quais exibem intensa absorção em comprimentos de onda de 600 a 660 nm. Este espectro de radiação é favorável a TFD por estar dentro da “janela foto-terapêutica”, ou seja, apresenta eficiência na penetração da luz em tecidos biológicos provocando fotodanos (MACHADO, 2000; STERNBERG; DOLPHIN, 1996).

A melhor fonte de radiação descrita é a que, por um baixo custo, forneça a maior quantidade de luz possível, sem efeitos térmicos significativos. O laser é uma opção de luz para ativação de fotossensibilizador com desempenho geralmente superior comparado a outras fontes, como diodos emissores de luz (LED), lâmpadas incandescentes e fluorescentes. A luz Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) apresenta um mecanismo de emissão estimulada de radiação, alta energia, baixa divergência (colimada), coerência (mesma fase) e monocromaticidade (mesma frequência) (MACHADO, 2000; PERUSSI; IMASSATO, 2008).

A vantagem da TFD é não gerar efeitos tóxicos cumulativos, tratamento de baixo custo e menor tempo, localizado, e pode ser repetido até a obtenção dos resultados desejados (MACHADO, 2000). Outro benefício são que os microorganismo não adquirem resistência a TFD, pois a morte celular é causada pelo oxigênio singlete e radicais livres (JORI et al., 2006).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, n. 1, p. 248-53, 1971.

- ALMEIDA, F. P. Estudos comparativos do Granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 5, n. 1, p. 125-141, 1930.
- ALMEIDA, L. M. M.; SOUZA, E. A. F.; BIANCHIN, D. B.; SVIDZINSKI, T. I. E.; Repostas in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 1, p. 372-376, 2009.
- ALVES, F.; CARMELLO, J. C.; MIMA, E. G.; JORGE, J. H.; PAVARINA, A. C. Avaliação *in vivo* da Terapia Fotodinâmica sobre os fatores de virulência de *Candida albicans* resistente a fluconazol. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 42, n. Especial, p.0-0, 2013.
- ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
- ARAÚJO, S. A.; PRADO, L. G.; VELOSO, J. M.; PEDROSO, E. R. P. Case of recurrent Paracoccidioidomycosis: 25 years after initial treatment. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 394-396, 2009.
- ARISTIZÁBAL, B. H.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5587-5591, 1998.
- BALABANOV, K.; BALABANOFF, V. A.; ANGELOV, N. Blastomycose sud-americaine chez um laboureur bulgare renevu depuis 30 ans de Brasil. **Mycopathologia** (Den Haag), v. 24, n. 3, p. 265-270, 1964.
- BITTENCOURT, J. I. M.; OLIVEIRA, R. M.; COUTINHO, Z. F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1856-1864, 2005.
- BRITO, T.; FRANCO, M. F. Granulomatous inflammation. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 2, p. 185-182, 1994.
- BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: An Update. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 87-117, 1993.
- CALICH, V. L.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 66, n. 5, p. 585-594, 1985.
- CALZAVARA, P. G. P.; VENTURINI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **The Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 78, n. 1, p. 1-6, 2005.

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.

CAMPOS, E. P.; SARTORI, J. C.; HETCH, M. L.; FRANCO, F. Clinical and Serologic features of 47 patients with Paracoccidioidomycosis treated by Amphotericin B. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 26, n. 4, p. 212-217, 1984.

CAMPOS, M. V. S.; PENNA, G. O.; CASTRO, C. N.; MORAES, M. A. P.; FERREIRA, M. S.; SANTOS, J. B. Paracoccidioidomycosis at Brasilia's university hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p.169-172, 2008.

CONTI-DIAZ, I. A. On the unknown ecological niche of Paracoccidioides brasiliensis: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 2, p. 131-134, 2007.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M, SABROZA, P.C., WANKE, B. **Paracoccidioidomycosis: mortality in Brazil (1980-1995)**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v.17, n.3, p. 245-254, 2004.

ESPUNHARDI, K. C.; SOUZA, V. C.; FILHO, R. B.; FILHO, M. A. Eficácia do controle farmacológico da paracoccidioidomicose no município de Cacoal – RO. **Uningá Review**, v. 3, n. 4, p. 56-64, 2010.

FAVA, S. D. C.; FAVA-NETTO, C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 3, p. 1-13,1998.

FERREIRA, M. C.; OLIVEIRA, R. T.; SILVA, R. M.; BLOTTA, M. H.; MAMOMI, R. L. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 10, p. 4392-4401, 2010.

FORNAJEIRO, N.; MALUF, M. L. F.; TAKAHACHI, G.; SVIDZINSKI, T. I. E. Inquérito epidemiológico sobre a paracoccidioidomicose utilizando a gp43 em dois municípios do noroeste do Paraná, Brasil. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 2, p.191-193, 2005.

FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**, Boca Raton: CRC Press, 1994. 409p.

FRANCO, M.; MENDES, R. P. & MOSCADI-BACCHI, M. Paracoccidioidomycosis. **Bailliere's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases**, v. 4, n. 4, p. 185-220, 1989.

FRANCO, M. F.; MONTENEGRO, M. R. G.; MENDES, R. P.; MARCOS, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 129-132, 1987.

GREER, D. L.; RESTREPO, E. La epidemiologia de la paracoccidioidemycosis. **Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 82, n. 1, p. 428-443, 1977.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 469-488, 1996.

JORI, G.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; FERRO, S.; COPPELLOTTI, O.; DEI, D. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 28, n. 5, p. 468-481, 2006.

KERR, I. B.; ARARIPE, J. R.; OLIVEIRA, P. C.; LENZI, H.L. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 5, p. 336-350, 1988.

LACAZ, C. S. Aspectos clínicos gerais. Formas polares da paracoccidioidomicose. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C.S.; FIORILLO, A. M. eds. **Paracoccidioidomicose**. São Paulo: Sarvier-Edusp; 1982.

LACAZ, C. S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*, In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1994.cap.1, p.1-4.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; VACARI-HEINS, E. M.; MELLO, N. T. **Paracoccidioidomicose**. In *Micologia Médica*, 9 ed: Sarvier, S. Paulo – SP, 2002.

LONDERO, A. T.; RAMOS, T. C. D. Paracoccidioidomycosis: estudo clínico-micológico d 260 casos observados no interior do estado do Rio Grande do Sul. **Jornal de Pneumologia**, v. 16, n. 4, p.129-132,1990.

LONDERO, L.T.; FISCHMAN, O. Perianal and/or rectal lesions in South American blastomycosis. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 32, n. 3, p. 231-236, 1967.

LUKSIENE, Z. Photodynamic therapy: mechanisms of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Medicine**, v. 39, n. 12, p. 1137-1149, 2003.

LUPI, O.; TYRING, S.K.; MCGINNIS, M. R. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 6, p.931-951, 2005.

- LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das *hyphoblastomicoses* americanas. **Brazil-médico**, v.13, p.121-124, 1908.
- MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação, e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.
- MARQUES, S. A.; CORTEZ, D. B.; LASTÓRIA, J. C.; CAMARGO, R. M. P.; MARQUES, M. E. A. Paracoccidioidomycosis: frequency, morphology, and pathogenesis of tegumentary lesions. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 5, p. 411-417, 2003.
- MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.
- MARTINEZ, R.; MOYA M. J. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. **Revista de Saúde Pública**, v. 26, n. 1, p.12-16, 1992.
- MARTINEZ, R. Etiopatologia e ecologia. In: Veronesi R e Focaccia R. **Tratado de Infectologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 1371-3.
- MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: epidemiologia e ecologia In: Veronesi R, Focacciar, editores. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu; 1996. p.1080-1083.
- MEDOFF, G.; PAINTER, A.; KOBAYASHI, G.S. Mycelial- to yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis* **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 9, p. 4055-4060, 1987.
- MENDES, R. P. Paracoccidioidomycose. In: Rocha MOC, Pedroso ERP. **Fundamentos em Infectologia**. Rio de Janeiro: Rubio; 2009. p. 945-94.
- MULLER, S. F. R.; MIRANDA, M. F. R. Sarcoid-like paracoccidioidomycosis presenting with perineural granuloma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 6, p. 994-995, 2013.
- MOTA, N. G.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; PERAÇOLI, M. T.; AUDI, R. C.; MENDES, R. P.; MARCONDES, J.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; FRANCO, M. F. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 6, p. 765-772, 1985.
- NEGRONI, P. El Paracoccidioides brasiliensis vive saprotificamente en el suelo Argentino. **Prensa Medica Argentina**, v. 53, n. 1, p. 2381-2, 1966.
- NEGRONI, R. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lutz's Mycosis). **The International Journal of Dermatology**, v. 32, n. 12, p. 847-885, 1993.
- NOWOTNY, J. P. **Influência da associação da terapia fotodinâmica e azul**

de metileno na respiração do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*.

Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, 2011.

NYMAN, E. S.; HYNNINEN, P.H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy.

Journal of Photochemistry and Photobiology, n. 73, v. 23, p.1-28, 2004.

PANIAGO, A. M. M.; AGUIAR, J. I. A.; AGUIAR, E. S.; CUNHA, R. V.; PEREIRA, G. R. O. L.; LONDERO, A. T.; WANKE, B. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 455-459, 2003.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos, **Revista Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.

PERUSSI, J. R.; IMASATO, H. Inativação fotodinâmica de microrganismos. In: BAGNATO V. S. **Novas técnicas ópticas para área da saúde**. São Paulo: Livraria da Física; 2008. p. 161-84.

PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: review from 1996-2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009.

PRATES, R. A.; SILVA, E. G.; B.; YAMADA JUNIOR, A. M.; A.; SUZUKI, L. C.; PAULA, C. R.; RIBEIRO, M. S. The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells. Mechanisms for Low-Light Therapy III. **SPIE**, v. 6846, n. 6, 2008.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E. P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females 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. 323-34, 1985.

RESTREPO-MORENO, A. In: **Clinical Mycology**. W. E. Dismukes, P. G. Pappas and J. Sobel. New York, Oxford University Press: 328–345, 2003. (Paracoccidioidomycosis).

RESTREPO-MORENO, A. Infection agents and pathogenesis. In: MURPHY, J.W.; FREIDMAN, H.; BENDINELLI, M., eds. **Fungal infection and immune responses**. New York, London: Plenum Press, 1993. cap.10, p. 251-276.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**, v. 39, n. 3, p. 233-241, 2001.

RIVITTI, E. A.; AOKI, V. Deep fungal infections in Tropical Countries. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 171-190, 1999.

ROCHA, F. F.; CAMPOS, M. G. Monoartrite como manifestação de Paracoccidioidomicose. **Revista Panamericana de Infectología**, v. 9, n. 1, p. 31-33, 2007.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F.; RODRIGUEZ, L. E; CASTRO, C. J. A model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. **Acta Científica Venezolana**, v. 38, n. 2, p. 202-211, 1987.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 31, n. 2, p. 99-113, 1993.

SANTO, A.H. Tendência da mortalidade relacionada à Paracoccidioidomicose, estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de morte. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 23, n. 5, p. 313-324, 2008.

SEVERO, L. C.; AGOSTINE, A. A.; LONDERO, A. T. Acometimento ósseo na paracoccidioidomicose crônica disseminada. Relato dos primeiros casos no Rio Grande do Sul. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 3, p. 241-244, 1996.

SCHEINBERG, M. A.; COHEN, M.; ABDALLA, R. J.; GUIDULE, J. Artroscopia na blastomicose articular do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 29, n. 8, p. 577-578, 1994.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO FDE, Q.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; MORETTI, M.L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SHOME, S. K.; BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. **Revista da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará**, v. 3, n. 1, p. 90-94, 1963.

SILVESTRE, M. T. A.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; ROCHA, A.; SOUZA, G. M.; NISHIOKA, S. A. Monoartrite de joelho como manifestação isolada de paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 5, p. 393-395, 1997.

SINDRIN, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos Clínicos e laboratoriais da micologia Médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1999.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D. Pyrrolic photosensitizers, **Current Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 293-324, 1996.

STRAUS, A. H.; FREYMULLER, E.; TRAVASSOS, L. R.; TAKAHASHI, H. K. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen

of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 34, n. 3, p. 181–218, 1996.

TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; FESTA, N. Cyro. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 445-459, 2009.

VALLE, A. C. F.; COSTA, R. B. L. Paracoccidioidomicose. In: BATISTA, R. S.; IGREJA, R. P.; GOMES, A. D.; HUGGINS, D. W. **Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001. p.934-958.

VICENTINI, A. P. GESZTESI, J. L.; FRANCO, F. M.; SOUZA, W.; MORAIS, J. Z.; TRAVASSOS, R. L.; LOPES, D. J. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 4, p. 1465-1460, 1994.

VILLAR, L. A., SALAZAR, M. E. & RESTREPO, A. Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 26, n. 5, p. 269-76, 1998.

ZHU, T. C.; FINLAY, J. C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. **Medical Physics**, v. 37, n. 7, p. 3127-3136, 2008.

WANKE B. Epidemiology of paracoccidioidomycosis: an emerging health problem in the brazilian amazon region: In: Encontro Internacional sobre paracoccidioidomicose, 7, Campos do Jordão, 1999. **Resumos**. Campos do Jordão, 1999. p.39.

WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A. (Eds.): **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994, p. 109–120.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

TERAPIA FOTODINÂMICA NO MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR *Paracoccidioides brasiliensis*

Que será submetido para a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=0037-8682&lng=en&nrm=iso

Aniele Tomadon (1), José Henrique Firmino Ferreira dos Santos (1), Mario José de Rezende (1), Rinaldo Ferreira Gandra (2), Eduardo Alexandre Loth (1), Rose Meire Costa Brancalhão (1).

(1) Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil.

(2) Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Hospital Universitário do Oeste do Paraná, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil.

Correspondence to: Aniele Tomadon, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, R. Universitária, 2069, CEP 85819-110, Cascavel, PR, Brasil (CCBS, Biocel) Tel. Phone: (+55) 45 9998-1007; (+55) 45 3306-3638. E-mail: anitomadon@hotmail.com

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to thank my laboratory partners, the grant received by CNPQ for the fulfillment of the masters and the financial support by Araucaria Foundation - Parana Fund, which enabled the development of this study.

FINANCIAL SUPPORT

This study was supported by Araucaria Foundation - Parana Fund and CRF – Unioeste.

**PHOTODYNAMIC THERAPY IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF ARTHRITIS
INDUCED BY *Paracoccidioides brasiliensis***

**Current Title: PHOTODYNAMIC THERAPY IN THE EXPERIMENTAL
ARTHRITIS**

Resumo Estruturado

Introdução: A paracoccidiodomicose, causada por *Paracoccidioides brasiliensis*, pode levar ao acometimento osteoarticular. Dentre as formas de tratamento para fungos se destaca fotodinâmica (TFD) que apresenta baixos custo e toxicidade, ação local e não induz resistência aos microorganismos. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da TFD no modelo experimental de artrite articular induzida por *P. brasiliensis*. **Métodos:** Ratos *Wistar* machos (n=42) foram distribuídos em grupos, submetidos à inoculação de *P. brasiliensis* e PBS (Controle) na articulação do joelho direito. Após o desenvolvimento da artrite, os ratos foram tratados; os grupos TFD40 e TFD120 com TFD 40 J/cm² e TFD 120 J/cm² respectivamente, o grupo AM com azul de metileno; e os grupo L40 e L120 com laser 40 J/cm² e laser 120 J/cm² respectivamente. Terapias laser e azul de metileno foram utilizadas de forma individual como controle para a TFD. Foram realizadas análises da formação do edema, avaliação anatopatológica e titulação de anticorpos anti-Gp43 por ELISA. **Resultados:** A formação de edema foi significativa no grupo Levedura, com menor formação no grupo TFD40 e TFD120, porém não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos. Na avaliação anatopatológica o grupo TFD120 apresentou a melhor recuperação da morfologia da membrana sinovial. E a titulação do anticorpo anti-Gp43 e análise do índice de artrite foram significativa no grupo Levedura, com a menor titulação e formação de artrite no grupo TFD120, porém não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos. **Conclusões:** O tratamento com TFD 120 J/cm² foi mais eficaz na redução da artrite, comparado com os demais grupos.

Abstract

Introduction: The paracoccidiodomycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis* may lead to osteoarticular involvement. Among the forms of treatment for fungal stands the

photodynamic (PDT) that has low cost and toxicity, local action and does not induce resistance to the microorganisms. The present study aimed to evaluate the effects of PDT in the experimental model of the articular arthritis induced by *P. brasiliensis*. Methods: Wistar rats (n=42) were distributed in groups, submitted to inoculation with *P. brasiliensis* and PBS (control) in the right knee joint. After the development of arthritis the rats were treated; and the PDT40 and PDT120 groups with PDT 40 J/cm² and 120 J/cm² respectively. The MB methylene blue group; L40 and L120 laser groups with 40 J/cm² laser and 120 J/cm², respectively. Laser and methylene blue therapies were used individually as a control for PDT. Edema formation analysis were conducted, anatomopathological evaluation and titrations of anti-Gp43 by ELISA. Results: The edema formation was significant in the yeast group with lower formation in the TFD40 and TFD120 group, but it showed no statistical differences between the groups. In the anatomopathological evaluation the PDT120 group showed the best recovery of the morphology of the synovial membrane. The antibody titration anti-Gp43 and the analyses of the arthritis index were significant in the Yeast group, with the lowest titration and arthritis formation in the PDT120 group, although it showed no statistical differences between the groups. Conclusions: Compared with the other groups, the treatment with PDT 120J/cm² was more effective in reducing arthritis.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, joints, photochemotherapy, knee, synovium.

INTRUDUCTION

The paracoccidioidomycosis (PCM) is mainly caused by inhalation of the etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*, and it represents one of the most important systemic mycosis in Latin America, with an incidence of 80% of the cases in Brazil, where it is

considered a serious public health problem, because it affects mainly men, rural workers in their most productive stage of life, between 30 and 59 years old⁽¹⁾⁽²⁾.

The disease may present itself in chronic forms, especially affecting the lungs, or juvenile form having the febrile lymphoproliferative syndrome⁽²⁾ as its main clinical manifestation. So, the osteoarticular event is frequent, it is estimated that 20 to 40% of the patients show bone changes and 5 to 10% articular changes⁽³⁾⁽⁴⁾; but in the chronic form, the osteoarticular event may be present in up to 60% of the PCM cases. The articular changing is shown as acute synovitis, it is often associated with fever, weight loss and prostration, and may evolve to loss of the joint function⁽⁴⁾⁽⁵⁾.

Several therapies have been used to control fungal mycosis, among them, the drug and photodynamic therapy (PDT), which stands out for its low cost, has centered action on the microorganism and it does not lead to the microbial resistance⁽⁶⁾⁽⁷⁾.

There are no reports in the scientific literature of studies using TDF for the treatment of PCM. In that sense, the study aimed to analyze the effects of PDT on the joint induced by *P. brasiliensis* in Wistar rats.

METHODS

Experimental model of arthritis

The study was approved by the Researching Ethics Committee involving animals from the Western State University of Parana (Unioeste), *campus* of Cascavel, Case No. 2861/2012-GRE. Male *Wistar* rats (n = 42) with 45 days old were used and submitted to the induced experimental model of arthritis *P. brasiliensis* according to Loth et al.⁽⁸⁾, which mimics the articular PCM in humans.

After being infected, the animals were distributed into 7 groups. Yeast Group, which did not receive any kind of treatment; Group MB receiving intra-articular methylene blue;

L40 and L120 groups were treated with laser at energy density of 40 J/cm², 120 J/cm², respectively and PDT40 and PDT120 groups were treated with PDT using the laser at energy density of 40 J/cm², 120 J/cm². The control group only received intra-articular injection of sterile PBS.

The arthritis was induced with *P. brasiliensis* yeasts (strain 18), therefore, yeast samples were diluted in 1% PBS, pH 7.2 to 7.4, at a concentration of 10⁵ cells and submitted to the viability test through the counting of yeast cells in a light microscope, after staining with trypan blue, at the ratio of 1: 1⁽⁹⁾; so, only those showing cell viability above 90% were used in the study⁽¹⁰⁾.

Prior to infection, the animals were anesthetized with 50 mg/kg ketamine and 5 mg/kg of midazolam intraperitoneally. After the sedation was observed, the trichotomy of the right knee joint of each animal was done.

In order to induce the arthritis, a suspension containing 10⁵ yeast cells Pb18 was injected into the knee medial region of the animals with 1 ml syringe and 27 gauge needle, 50 µL.

Treatments

After 7 days of fungal inoculation, all groups except Yeast and Control groups started the treatments. The groups L40 and L120 have been treated with laser at the energy density of 40 J/cm², 120 J/cm², respectively. The laser used was GaAlAs (660nm, 30mW), Ibramed brand, and it was applied daily and punctually on the knee that received the inoculum. It is only justified the creation of the laser groups because of the need to analyze the isolated effect of irradiation due to its action in some microorganisms⁽¹⁰⁾.

The MB group which was treated with the methylene blue photosensitizer, was made to verify the isolated effect of the dye due to its bactericidal characteristics⁽¹¹⁾. On the first day

of the treatment this group received an injection of 50 uL of methylene blue (diluted in sterile PBS 1%) in the joint where the arthritis and the other subsequent dose was induced after 48 h.

But in the animals of the TFD40 and TFD120 groups the treatments with PDT were applied on the eighth day which consisted of intra-articular injection on the knee of 50 uL of methylene blue (diluted in 1% sterile PBS) and the other subsequent dose 48 hours later. Although, after the first shot with the photosensitizer, the daily treatment with the laser GaAIs (specification above) 40 and 120 J/cm², respectively, was applied punctually.

Edema Evaluation

The evaluation of the edema formation was determined macroscopically through measuring the lateral diameter of the right knee joint, held in extension. The data were obtained in millimeters using a Western digital pachymeter. The measurement was conducted in the pre-inoculation of *P. brasiliensis*, and it was repeated every day, from the eighth to the tenth day, that is to say, on the days of treatment⁽⁸⁾.

Euthanasia, histological processing and Elisa

On the 11th day, at the end of the treatments, the animals were anesthetized intraperitoneally with 50 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg of xylazine. The blood of the animals was collect for analyses by ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). The right knee joint of each animal was fixed in a 10% formalin solution, decalcified in 5% of trichloroacetic acid for 14 days. Then the samples were processed for paraffin embedding⁽¹²⁾. Histological sections, 7 µm thick, were stained with silver by the Grocott method⁽¹³⁾ for viewing *P. brasiliensis* with hematoxylin and eosin for the general morphological analysis of tissues⁽¹²⁾. The arthritis was evaluated using the scale of arthritis, according to Hansch et al.⁽¹⁴⁾, punctuating from 0.5 to 3 for each item based on the presence and intensity of

morphological changes such as hyperplasia of the synovial membrane, cellular infiltration in the synovial tissue, pannus formation, cartilage destruction.

The ELISA test was carried out according to Ramos et al.⁽¹⁵⁾, which aimed to evaluate the titration of the anti-gp43 antibody. Briefly, 96-well plates were sensitized with purified gp43 antigen.

Next, 100 μ L of the plasma of all animals containing glycerin (1: 1) were added to the dilution plate of 1: 1, 1:50, 1: 450 and 1: 1350, followed by the reaction with the secondary antibody (anti -IgG peroxidase, Sigma-Aldrich ®). The Assays were performed in triplicate and read by absorbance microplate reader at 492 nm.

Statistical analysis

The numerical variables were analyzed by inferential statistics through the Student t test, Two-sided, unpaired for comparison between the groups and evaluation of the treatments. In comparing the resulting variables of the histopathological findings, the ANOVA and *Tukey Multiple Comparison Test* were used. The significance level was 5% with value of α set at $p < 0.05$. The statistical analysis was performed using the *Graph Pad Prism*® software, version 3.0 for *Windows XP from Microsoft Office*® platform.

RESULTS

The anatomopathological analysis of the groups infected with *P. brasiliensis* revealed the involvement of the joint in the synovial membrane region (SM), in their intimate and subintimal layers (Figure 1). In the control group, no changes were observed in the tissue morphology (Figure 1A and 1B).

The presence of the *P. brasiliensis* in the infected joints has been confirmed by the Grocott staining method (Figure 1C).

The anatomopathological analysis of the yeast group revealed classical signs of articular PCM present in the SM (Figure 1D), increasing cellularity, lymphocyte and plasmocyte infiltrations, diffuse inflammatory infiltrate (Figure 1E), pannus formation with multilayers formation in SM resulting from the loss of the epithelioid arrangement (Figure 1E), presence of giant multinucleated cells (Figure 1F), angiogenesis (Figure 1G), granulomatous formation with unorganized granulomas (Figure 1H) and edema. In the groups L40, L120 and MB these signals remained present, but in a more attenuated way.

In the TFD40 group, the changes present themselves concentrated in the perimeniscal region of the subintimal; however, in the group with TFD120 (Figure 1I) a decrease in cellularity was observed compared to the yeast group, with presence of adipocytes and lower edema formation in that place (Figure 1J), when compared to the other treated groups.

The anatomopathological analysis showed signs of chronic inflammation more attenuated in the PDT 120 J/cm² treatment.

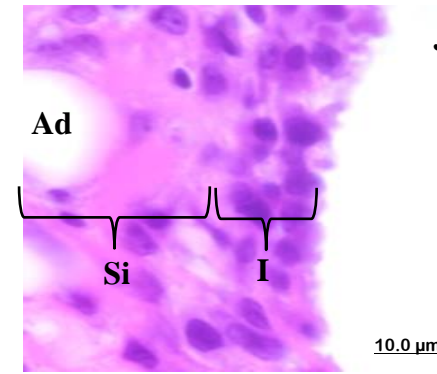
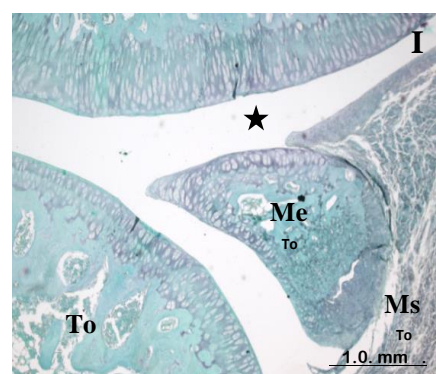
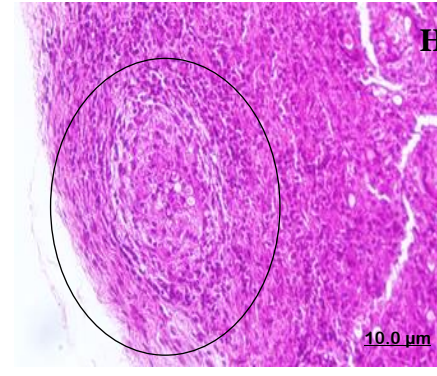
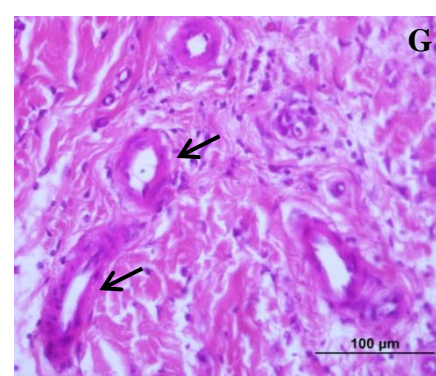
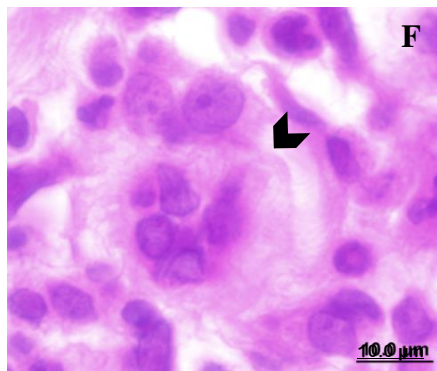
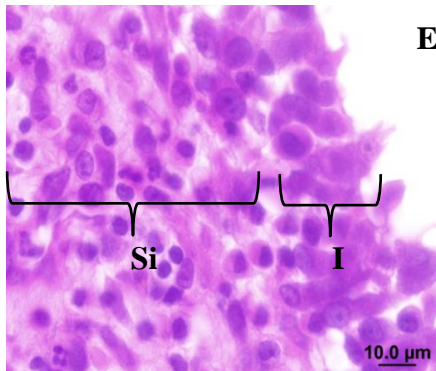
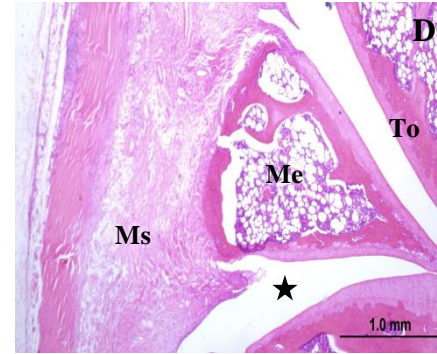
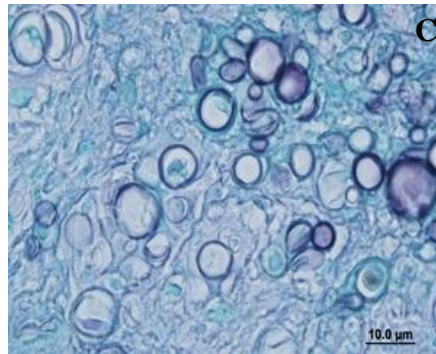
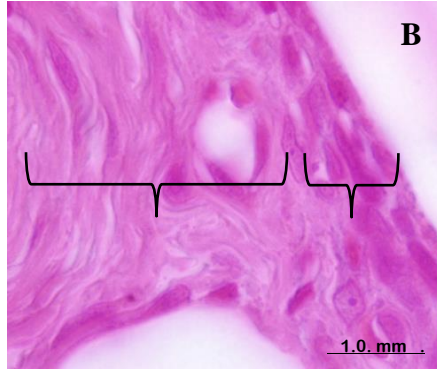
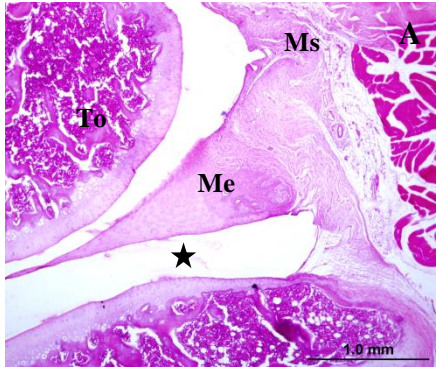


Figure 1. Photomicrographies of the joint of the right posterior limb of male *Wistar* rats, sagittal section. In A, panoramic view of the joint of the Control group (without infection) with an increase of 4x; in B, synovial membrane of the control group with an increase increase of 1000x; in C, the presence of several fungi in the synovial membrane with an increase of 1000x ; in D, panoramic view of the joint of the Yeast group, infected with *P. brasiliensis* and untreated, with an increase of 4x; in E, synovial membrane of the Yeast group with an increase of 1000x ; in F, multinucleated cell in the synovial membrane with an increase of 1000x (+); in G, angiogenesis is present in the Yeast group with an increase of 1000x; H, immature granuloma; R, panoramic view of the articulation PDT120 group treated with PDT 120 J/cm², with an increase of 4x; in J, synovial membrane of the PDT 120 J/cm² group. Íntima (I), subintimal (Si), adipocytes (Ad), giant multinucleated cell (arrowhead), blood vessels (arrows), immature granuloma (circle). hematoxylin and eosin staining in the photomicrographes A, C, E, F, G, H, I and Grocott in C and I.

In the evaluation of the edema the results showed an increase of the articular volume on the knees of the Yeast group ($p = 0.0001$). In the other treated groups (L40, L120, MB, PDT120 and PDT40) no significant increase was observed. At the end of the experiment, the PDT groups have shown the lowest swelling rates (PDT40 and PDT120 groups value of $p=0.8359$ and $p=0.7167$, respectively), as shown in Table 1.

Table 1: Presentation of the medium diameter, the lateral diameter (mm) of the posterior right knee joint of the animals, at the beginning and end of the experiment.

GROUPS	Pre-inoculation	8th day	11th day	Difference	P value
Control	10,28 ± 0,17	10,32 ± 0,20	10,48 ± 0,30	1,95%	0,6261
Yeast	10,47 ± 1,57	13,10 ± 1,16	14,70 ± 1,26	40,40%	0,0001*
L40	11,12 ± 0,49	12,33 ± 0,72	12,04 ± 0,49	8,87%	0,0625
L120	11,28 ± 0,44	11,53 ± 0,52	11,80 ± 0,44	4,61%	0,1563
MB	11,13 ± 1,06	11,26 ± 0,36	11,43 ± 1,06	2,70%	0,2970
PDT40	11,83 ± 0,85	10,89 ± 0,83	11,92 ± 0,85	0,76%	0,8359
PDT120	12,27 ± 0,77	12,43 ± 0,40	12,16 ± 0,77	1,87%	0,7167

Pre-inoculation, measurement performed before the infection by *P. brasiliensis*; 11th day, at the end of the experiment; (n=42) *Wistar* rats; control group; yeast group; L40, treated with laser 40 J/cm²; L120, treated with laser 120 J/cm²; MB, treated with methylene blue; PDT40 treated with association of the laser 40 J/cm² with methylene blue; TFD120 treated with laser 120 J/cm² associated with methylene blue; P, significance level p <0.05; * , significant value when compared to the other groups by the t test.

The arthritis index showed that the the most intense inflammation was achieved in yeast and L40 groups; statistically significant data were observed in yeast group (p <0.0001) (Figure 2)

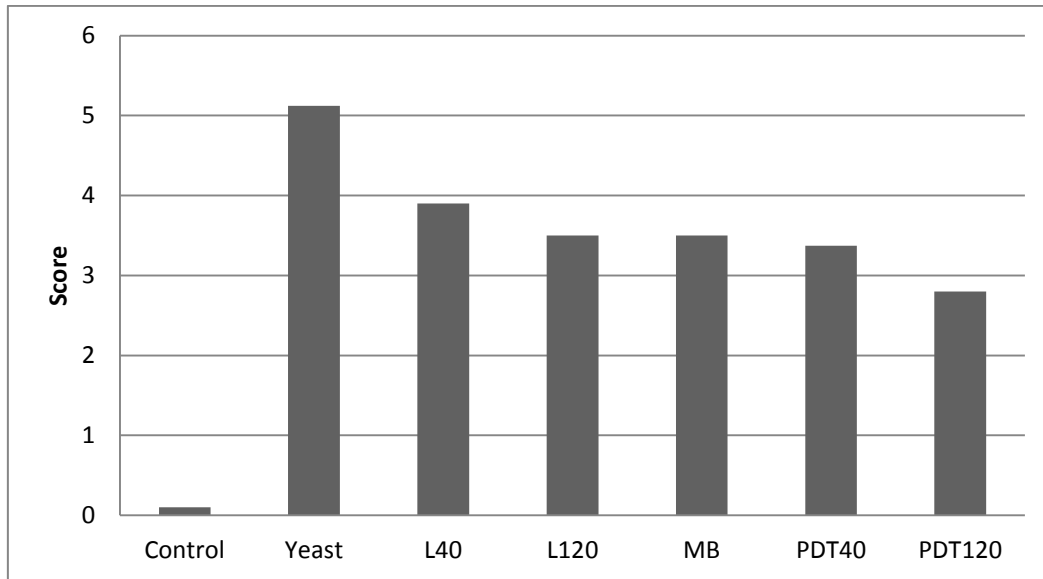


Figure 2: Graph of the average arthritis index shown in the study groups according to Hansch et al. (2004) (n=42); Control group without infection and treatment; Yeast group, infected and untreated; L40, treated with laser 40 J/cm²; L120, treated with laser 120 J/cm²; MB, treated with methylene blue; PDT40, treated with laser 40 J/cm² associated with methylene blue; PDT120, treated with laser 120 J/cm² associated with methylene blue; P, significance level p <0.05; * , significant value when compared to the other groups by ANOVA and *Tukey Multiple Comparison Test*.

The titration analysis of anti-gp43 antibodies of *P. brasiliensis* has indicated a greater production of specific antibodies in yeast group (p = 0.001). In the other groups no statistically significant differences were observed when comparing the averages of the groups (Figure 3).

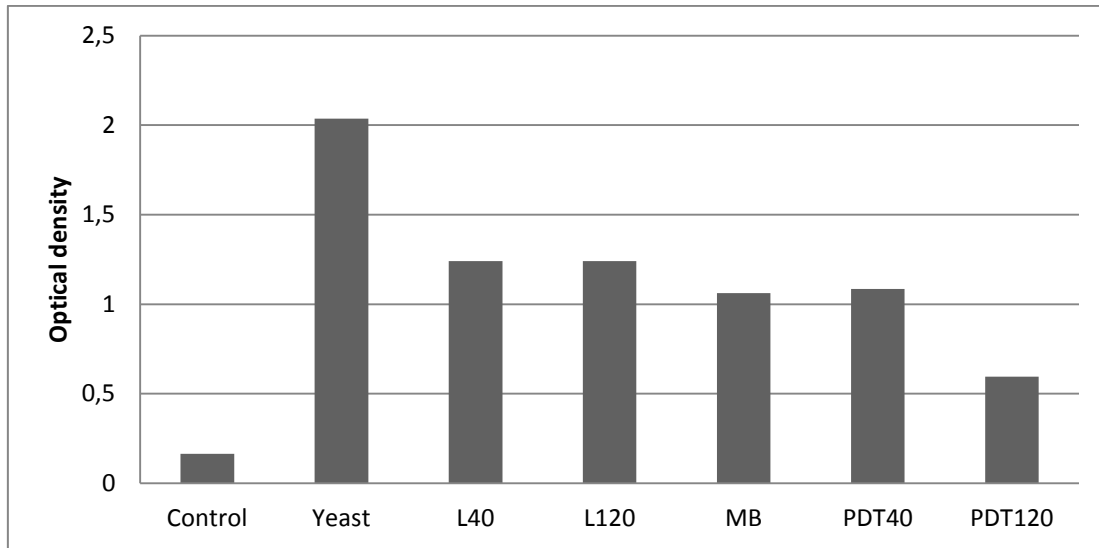


Figure 3: Referring to the reading by optical density of the concentration of anti-gp43 antibody in the serological samples of the groups (n=42); control group without infection and treatment; yeast group, infected and untreated; L40, treated with laser 40 J/cm²; L120, treated with laser 120 J/cm²; MB, treated with methylene blue; PDT40, treated in combination of the laser 40 J/cm² with methylene blue; PDT120, treated with laser 120 J/cm² combined with methylene blue; P, significance level p < 0.05; *, Significant value when compared to the other groups by ANOVA and *Tukey Multiple Comparison Test*.

DISCUSSION

This is a pioneer study in the use of PDT as a form of treatment for the infection by *P. brasiliensis* which promotes restraint when discussing with peers.

The changes in the joint caused by *P. brasiliensis* in the experimental model of arthritis showed anatomopathological aspects of fungal infection with primary involvement of the SM in its intima and subintimal layers, as described by Wild et al.⁽⁵⁾ and Loth et al.⁽⁸⁾ who developed the experimental model of arthritis used in this study.

Changes in the entire morphology of SM were observed, compromising the functionality of the joint, and even with the formation of granuloma that surrounds the fungus

aiming its elimination or containment of the dissemination. Kerr et al.⁽¹⁸⁾ reported not only the persistence of the pathogen but also the source of new foci of infection, which demonstrates the importance of the study of therapies.

The formation of the articular edema in the groups infected with the fungus, except PDT40 and PDT120 as a result of fungal infection has also been reported by other authors like Amanai et al.⁽¹⁷⁾ and Loth et al.⁽⁸⁾ who used *Candida albicans* in an osteoarthritis model in rats.

It was possible to observe reduction of edema caused by the pathogen and partially normal tissue aspects in the SM region of the joint through the application of the PDT to the treatment of arthritis caused by *P. brasiliensis*. Such results were most significant using the dosage of 120 J/cm².

In an *in vitro* study performed by Souza et al.⁽¹⁸⁾ using PDT photosensitizer methylene blue and low energy density of 2.04 J/cm², a reduction of 42% was found in the viability of *C. albicans*, and Nowotny⁽¹⁹⁾ checked out the *in vitro* partial inactivation *P. brasiliensis* with the use of the PDT 30 J/cm² with the same photosensitizer, but in the present study higher doses of light were used since the homogeneous photo radiation in living tissue is more difficult due to its anatomical complexity and no optical homogeneity⁽²⁰⁾.

Tanaka et al.⁽²⁰⁾ induced murine experimental arthritis with methicillin-resistant *S. aureus*, and found bactericidal effect and improvement of the inflammation with the use of low dosage of PDT 20 J/cm²; but Demidova and Hamblin⁽²¹⁾ explain that the PDT against fungi requires higher dosages when compared to bacteria due to the structure of its cell wall and cytoplasmic membrane. As a way to control PDT, the laser was used individually, in the dosages of 40 J/cm² and 120 J/cm² (groups L40 and L120) and the MB, however, the results have not led to improvement of the inflammation. Similarly, Souza et al.⁽¹⁸⁾ using only the MB, for the control of PDT, the fungi *C. krusei*, *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. dubliniensis*,

they found no change in the number of colony forming units per mL suggesting that the photosensitizer showed no cytotoxic effect for the pathogen.

The analysis of the intensity of the arthritis through the Hansch et al.⁽¹⁴⁾ scale demonstrated that in the Yeast group the arthritis performed intensively at the end of the 11 days of experiment, differing from the study of Loth et al.⁽⁸⁾ in which the arthritis was more expressive only in the groups where the *P. brasiliensis* fungus remained 45 days in the joint giving as a possible explanation the virulence of the strains used and the immune response of animals.

The TFD120 group had the lowest rate of arthritis when compared to the other treatments. According to a review carried out by Lins et al.⁽²²⁾, the laser therapy seems to promote biostimulation through the acceleration in the repairment of the injured tissues, although they were not observed in this study. But the PDT has the ability to eliminate the causative organism of the injury⁽²³⁾. Therefore, the analysis of the anti-gp43 antibodies showed lesser titration, demonstrating the reduction in the immunological response, probably due to a decrease in the fungal load because of the therapy used.

The amount of specific IgG antibodies is related to developments of PCM, therefore, high levels of anti-gp43 are found with the progression of the chronic form of the severity of the disease⁽²²⁾; Moreover, Shikanai-Yassuda et al.⁽²⁾ show a positive correlation between the expression of specific antibodies and the severity of this disease.

After the analysis by titration of anti-gp43 antibodies, the data showed a greater production in the Yeast group, and these are higher values than the ones presented by Loth et al.⁽⁸⁾ on the 15th day of the experiment. Even with the use of purified gp43 antigen (glycoprotein with a molecular weight of 43 kilodaltons), and having high specificity of the test with the antigen used. According to Loth et al.⁽⁸⁾ a reaction can occur with isotypes of immunoglobulin, probably IgM.

CONCLUSION

For *P. brasiliensis* established in the intra-articular region, the treatment with PDT 120 J/cm² demonstrated improvement in the evaluation of the tissue morphology and reduction of the volume joint which is certainly associated with the inactivation of the fungus.

CONFLICT OF INTERESTS

There are no conflict of interests in the development of this study, it was sent uniquely for a possible publication for the RSBMT.

REFERENCES

1. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* 2002; 18:1441-1454.
2. Shikanai-Yasuda MA, Telles F de Q, Filho, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:297–310.
3. Scheinberg MA, Cohen M, Abdalla RJ, Guidule J. Artroscopia na blastomicose articular do joelho: um relato de caso. *Rev. bras. ortop* 1994; 29:577-578.
4. Rocha FF, Campos MG. Monoartrite como manifestação de Paracoccidioidomicose. *Rev Panam Infectol* 2007; 9:31-33.

5. Silvestre MT, Ferreira MS, Borges AS, Rocha A, de Souza GM, Nishioka SA. Monoartrite de joelho como manifestação isolada de paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; 30:393–395.
6. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated *in vitro*. *Lasers Surg Med*. 1996; 18:253-259.
7. Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J. bras. pneumol* 2006; 32(5):449-460.
8. Loth EA, Biazim SK, dos Santos JHFF, et al. Dose response effect of *Paracoccidioides brasiliensis* in an experimental model of arthritis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2014; 56:259-264.
9. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immuno*, 2001: A.3B.1–A.3B.2.
10. Mayer-Biscanin, M, Mravak-Stipetic M, Ierolimov, V. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre *Candida Albicans* crescimento em pacientes com estomatite protética. *Photomed laser Surg* 2005; 23:328-332.
11. Calzavara PGP, Venturini M, Sala R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J Photochem Photobiol B* 2005; 78:1-6.

12. Junqueira LCU, Junqueira LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. 1.ed. São Paulo: Livraria e Editora Santos Ltda, 1983. 123p.
13. Grocott RG. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine–silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol* 1955; 25:975–979.
14. Hansch A, Frey O, Gajda M, Susanna G, Boettcher J, Bräuer R, et al. Photodynamic treatment as a novel approach in the therapy of arthritic joints. *Lasers Surg Med* 2008; 40:265–272.
15. Ramos SP, Sano A, Ono MA, Camargo ZP, Estevão D, Miyaji M, et al. Antigenuria and antigenaemia in experimental murine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2005; 43:631–6.
16. Kerr IB, de Oliveira PC, Lenzi HL. Connective matrix organization in chronic granulomas of experimental paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1988; 103:11-20.
17. Amanai T, Nakamura Y, Aoki S, Mataga I. Micro-CT analysis of experimental *Candida* osteoarthritis in rats. *Mycopathologia* 2008; 166:133–141.
18. Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AOC. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light, *J Photochem Photobiol B* 2006; 83:34-38.
19. Nowotny JP. Influência da associação da terapia fotodinâmica e azul de metileno na respiração do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*. [Dissertação]. [São José dos Campos]: Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, 2011.

20. Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya, N, Seki, S, Nemoto, K, et al.
Photodynamic Therapy Using Intra-Articular Photofrin for Murine MRSA Arthritis: Biphasic Light Dose Response for Neutrophil-Mediated Antibacterial Effect. *Lasers Surg Med* 2011; 43:221-229.

21. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004; 17:245-254.

22. Lins RDAU, Lucena KCR, Granville-Garcia AF, Dantas EM, Catão MHCV, Carvalho Neto LG. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *An Dermatol* 2010; 85:849-855.

23. Wainwright M. Methylene blue derivatives--suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16:381-394.

ANEXO A

Parecer de aprovação do projeto.



PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Terapia fotodinâmica em lesão induzida por *Paracoccidioides brasiliensis* em ratos", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

Obs: Os projetos intitulados "Avaliação da resposta da terapia medicamentosa com Itraconazol no modelo experimental de artrite por *Paracoccidioides brasiliensis*" e "Terapia fotodinâmica em lesão induzida por *Paracoccidioides brasiliensis* em ratos", não deverão ser realizados um comitadamente ao outro, conforme orientação do parecerista ad-hoc.

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, 12/11/13

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2861/2012-GRE

ANEXO B

Normas para publicação:

ESCOPO: A **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** é um periódico oficial da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, multidisciplinar, com acesso aberto (Licença *Creative Commons* - CC-BY - <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que publica pesquisas originais relacionadas a doenças tropicais, medicina preventiva, saúde pública, doenças infecciosas e assuntos relacionados. A preferência para publicação será dada a artigos que relatem pesquisas e observações originais. A Revista possui um sistema de revisão por pares, para a aceitação de artigos, e sua periodicidade é bimestral. A Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical é publicada em inglês.

POLÍTICA DE AVALIAÇÃO: Os manuscritos submetidos com vistas à publicação na **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** são avaliados inicialmente pelos profissionais da secretaria quanto à adequação às normas. Em seguida, são encaminhados para, no mínimo, dois revisores para avaliação e emissão de parecer fundamentado (revisão por pares), os quais, oportunamente, serão utilizados pelos editores para decidir sobre a aceitação, ou não, do mesmo. Em caso de divergência de opinião entre os revisores, o manuscrito será enviado para um terceiro relator para fundamentar a decisão editorial final, de acordo com o *workflow* do processo de submissão da **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** (disponível online em <http://www.scielo.br/revistas/rsbmt/iinstruc.htm#005>).

O contato com o escritório editorial pode ser estabelecido no endereço abaixo:

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Av. Getúlio Gurarita s/n Caixa Postal: 118,
CEP: 38001-970 Uberaba, Minas Gerais, Brasil
Tel: 55 34 3318-5287 Fax: 55 34 3318-5279
e-mail: rsbmt@rsbmt.ufmt.edu.br
<http://www.scielo.br/rsbmt>

TIPOS DE MANUSCRITOS:

Artigos Originais: devem relatar pesquisas originais que não tenham sido publicadas ou consideradas para publicação em outros periódicos. O limite de palavras é de 3.500 (excluindo resumo, título e referências). O manuscrito deve conter resumo estruturado com até 250 palavras, com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo Estruturado, Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito (Introdução, Métodos, Resultados, Discussão), Conflito de Interesses, Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas. Um total de cinco ilustrações (tabelas e figuras) é permitido.

Artigos de Revisão: devem ser uma análise crítica de avanços recentes e não apenas revisão da literatura, geralmente a convite do editor. Artigos de Revisão têm o limite de 3.500 palavras (excluindo resumo, título e referências). Devem ter resumo com até 250 palavras (não estruturado). Cinco ilustrações são permitidas (tabelas e figuras). São publicadas também minirrevisões. Minirrevisões têm no máximo 3.000 palavras (excluindo resumo, título e referências). Devem ter resumo (não estruturado) com até 200 palavras, três ilustrações (tabelas e figuras) e máximo de 3.000 palavras. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo não estruturado, Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito, Conflito de Interesses, Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas.

Editoriais: usualmente, escritos a convite, considerando os tópicos da área de enfoque da revista, não excedendo a 1.500 palavras, sem resumo e palavras-chaves e no máximo uma figura ou tabela e dez referências.

Comunicações Breves: devem ser relatos sobre novos resultados interessantes dentro da área de abrangência da revista. As comunicações breves devem ter no máximo 2.000 palavras (excluindo resumo, título e referências); Devem conter resumo estruturado com no máximo 100 palavras (com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões) e com até 15 referências. Um máximo de três ilustrações (tabelas e figuras) é permitido. Até três palavras-chaves devem ser

fornecidos. O corpo do manuscrito não devem conter subdivisões ou subtópicos. Declaração de conflito de interesses deve ser incluída.

Relatos de Casos: devem ser relatos breves com extensão máxima de 1.500 palavras (excluindo título, resumo e referências), com máximo de três ilustrações (tabelas e figuras), até 12 referências, resumo não estruturado com no máximo 100 palavras e três palavras-chaves. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo, Palavras-Chaves, Texto do Manuscrito (Introdução, Relato de Caso, Discussão), Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas.

Relatórios Técnicos: devem ser precisos e relatar os resultados e recomendações de uma reunião de *experts*. Será considerado, se formatado como um editorial.

PREPARAÇÃO DO MANUSCRITO: Autores são aconselhados a ler atentamente estas instruções e segui-las para garantir que o processo de revisão e publicação de seu manuscrito seja tão eficiente e rápido quanto possível. Os editores reservam-se o direito de devolver manuscritos que não estejam em conformidade com estas instruções.

Sistema de Submissão *On-line*: Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão *on-line* nos endereços <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo> ou <http://www.scielo.br/rsbmt>. O autor deve escolher dentro do item “Tipos de Manuscrito” uma categoria para o manuscrito: Artigos Originais, Editoriais, Artigos de Revisão, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas, Réplica à Carta ou Outros (quando não se encaixar em nenhuma das categorias listadas). A responsabilidade pelo conteúdo do manuscrito é inteiramente do autor e seus co-autores.

Carta de Apresentação: a) deve conter uma declaração, assegurando de que se trata de pesquisa original e que, ainda, não foi publicada, nem está sendo considerada por outro periódico científico. Devem constar, também, que os dados/resultados do manuscrito não são plágio. b) deve ser assinada por todos os

autores e, na impossibilidade restrita, o autor principal e o último autor podem assinar pelos outros co-autores, mediante procuração. c) Os autores devem incluir na *Cover Letter* uma declaração de ciência de que o manuscrito, após submetido, não poderá ter a ordem, nem o número de autores alterados, sem justificativa e/ou informação à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. d) Devem declarar que concordam, caso o manuscrito seja aceito para publicação, transferir todos os direitos autorais para a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Contribuição dos autores: Os autores devem incluir, em documento separado, uma declaração de responsabilidade especificando a contribuição, de cada um, no estudo.

Edição da Pré-Submissão: todos os manuscritos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser em inglês. É altamente recomendável que os autores utilizem os serviços de uma empresa profissional de edição e/ou tradução. A revisão/edição da língua inglesa não garante que o manuscrito será aceito para publicação.

FORMATAÇÃO DO MANUSCRITO: O manuscrito deve ser preparado usando *software* padrão de processamento de textos e deve ser impresso (fonte *Times New Roman* tamanho 12) com espaço duplo em todo o texto, título/legendas para as figuras, e referências, margens com pelos menos 3cm. O manuscrito deve ser dividido nas seguintes seções: Cartão de Apresentação (endereçada ao Editor-Chefe), Página de Título, Título, Resumo, palavras-chaves, Texto do Manuscrito, Agradecimentos, Suporte Financeiro, Declaração de Conflito de Interesses, Lista de Referências, Título das Figuras/Legendas. A Carta de Apresentação, Página de Título, Agradecimentos e Suporte Financeiro devem ser incluídos em documentos separados (estes dois últimos podem ser incluídos junto com a Página de Título). Abreviações devem ser usadas com moderação.

Página de Título: deve incluir o nome dos autores na ordem direta e sem abreviações, afiliações institucionais (Departamento, Instituição, Cidade, Estado e País de cada autor). O endereço completo do autor para correspondência deve ser especificado, incluindo telefone, fax e e-mail. Na página de título também podem ser

incluídos agradecimentos e suporte financeiro. A quantidade de autores por manuscrito é limitada a oito, exceto para estudos multicêntricos.

Indicação de potenciais revisores: Os autores são convidados a fornecer os nomes e informações de contato (e-mail e telefone) por três potenciais revisores imparciais. Favor informar revisores de região e instituição diferente dos autores.

Título: deve ser conciso, claro e o mais informativo possível, não deve conter abreviações e não deve exceder a 200 caracteres, incluindo espaços.

Título Corrente: com no máximo 50 caracteres.

Resumo Estruturado: deve condensar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves) e abreviações devem ser evitadas. Deve ser subdividido em: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões.

Palavras-chaves: 3 a 6 palavras devem ser listados em Inglês, imediatamente abaixo do resumo estruturado.

Introdução: deve ser curta e destacar os propósitos para o qual o estudo foi realizado. Apenas quando necessário citar estudos anteriores de relevância.

Métodos: devem ser suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas.

Ética: em caso de experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação humana responsável (institucional, regional ou nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Quando do relato de experimentos em animais, indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais em laboratório foram seguidas e o número de aprovação deve ser enviado à Revista.

Ensaio Clínico: No caso de Ensaio Clínico, o manuscrito deve ser acompanhado pelo número e órgão de registro do ensaio clínico (Plataforma REBEC). Estes requisitos estão de acordo com a BIREME/OPAS/OMS e o Comitê Internacional dos Editores de Revistas Médicas (<http://www.icmje.org>) e do Workshop ICTPR.

Resultados: devem ser um relato conciso e impessoal da nova informação. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve relacionar-se diretamente com o estudo que está sendo relatado. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto, evitando que se torne excessivamente longa.

Agradecimentos: devem ser curtos, concisos e restritos àqueles realmente necessários, e, no caso de órgãos de fomento não usar siglas.

Conflito de Interesse: todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo.

Suporte Financeiro: informar todos os tipos de fomento recebidos de agências de fomento ou demais órgãos ou instituições financiadoras da pesquisa.

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na medida em que aparecem no texto. Listar todos os autores quando houver até seis. Para sete ou mais, listar os seis primeiros, seguido por “et al”. Digitar a lista de referências com espaçamento duplo em folha separada e no final do manuscrito. Referências de comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos “em preparação” ou “submetidos para publicação” não devem constar da lista de referência. Se essenciais, podem ser incorporados em local apropriado no texto, entre parênteses da seguinte forma: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980); (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados). Citações no texto devem ser feitas pelo respectivo número das referências, acima da palavra correspondente, em ordem numérica crescente, separadas por parênteses, sem vírgula. [Ex.: Mundo^{(1) (2) (3)}; Vida^{(30) (42) (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50)}]. As referências no fim do manuscrito devem estar de acordo com o sistema de requisitos uniformes utilizado para manuscritos enviados para periódicos biomédicos (Consulte: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Os títulos

dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no *Index Medicus* (Consulte: <http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=limits>).

Alguns exemplos de referências:

1. Citação de Artigos em Geral: autores, título do artigo na língua original em que foi publicado, nome do periódico, ano, volume, páginas inicial e final completas.

Russell FD, Coppell AL, Davenport AP. *In vitro* enzymatic processing of radiolabelled big ET-1 in human kidney as a food ingredient. *Biochem Pharmacol* 1998; 55:697-701.

2. Capítulo de livro: autores do capítulo, título do capítulo, editores, nome do Livro, edição, cidade, editora, ano e página.

Porter RJ, Meldrum BS. Antiepileptic drugs. *In*: Katzung BG, editor. *Basic and clinical pharmacology*. 6th ed. Norwalk (CN): Appleton and Lange; 1995. p. 361-380.

3. Livro: autores do livro, nome do livro, edição, cidade, editora e ano.

Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

4. Dissertação/Tese: Autor, nome da tese/dissertação, ano, quantidade de páginas, Tipo (Dissertação ou Tese), Nome da Instituição, Ano, Cidade.

Cosendey MAE. *Análise da implantação do programa farmácia básica: um estudo multicêntrico em cinco estados do Brasil*. 2000. 358 p. (Doctor's Thesis). Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz; 2000 Rio de Janeiro.

Figuras: devem ser submetidas, em arquivos separados, nomeados apenas com o número das figuras (exemplo: Figura 1; Figura 2). Todas as figuras devem ter numeração arábica, citadas no texto, consecutivamente. **Título e Legendas:** devem ser digitadas com espaçamento duplo no final do manuscrito. **Dimensões:** As dimensões das figuras não devem ultrapassar o limite de 18cm de largura por 23cm de altura. Veja abaixo a correta configuração para cada formato de figura:

- **Fotografias:** devem ser obrigatoriamente submetidas em alta resolução no formato *Tiff*. Certifique-se que a mesma foi capturada na resolução mínima de

600 DPI, preferencialmente entre 900-1200dpi, preparadas utilizando programa de Editoração de Imagens (*Adobe Photoshop, Corel Photo Paint, etc*).

- **Gráficos:** criados usando *Microsoft Excel*, devem ser salvos com a extensão original (.xls).
- **Mapas e Ilustrações:** devem ser vetorizadas (desenhados) profissionalmente utilizando os *softwares Corel Draw ou Illustrator* em alta resolução.
- **Imagens:** produzidas em *software* estatístico devem ser convertidas para o formato *Excel* ou se o programa permitir, em formato PDF.

Ilustrações Coloridas: devem ser aprovadas pelos editores e as despesas extras para confecção de fotolitos coloridos serão de responsabilidade dos autores.

Tabelas: devem ser digitadas com espaçamento simples, com título curto e descritivo (acima da tabela) e submetidas em arquivos separados. Legendas para cada tabela devem aparecer no rodapé da mesma página que a tabela. Todas as tabelas devem ter numeração arábica, citadas no texto, consecutivamente. Tabelas não devem ter linhas verticais, e linhas horizontais devem ser limitadas ao mínimo. Tabelas devem ter no máximo 18cm de largura por 23cm de altura, fonte *Times New Roman*, tamanho 9.

Processo de Envio: os artigos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical deverão utilizar apenas a via eletrônica. Todos os manuscritos deverão ser enviados via internet para <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>, seguindo as instruções no topo de cada tela. O processo de revisão pelos pares também será totalmente pela via eletrônica.

Sobre Reenvio e Revisões: a revista diferencia entre: a) manuscritos que foram rejeitados e b) manuscritos que serão re-avaliados após a realização das correções que foram solicitadas aos autores.

Reenvio: caso o autor receba uma carta informando que seu trabalho foi rejeitado e queira que os editores reconsiderem tal decisão, o autor poderá re-enviá-lo. Neste caso será gerado um novo número para o manuscrito.

Revisão: caso seja necessário refazer seu manuscrito com base nas recomendações e sugestões dos revisores, ao devolvê-lo, para uma segunda análise, por favor, encaminhe o manuscrito revisado e informe o mesmo número do manuscrito.

Após a Aceitação: Uma vez aceito para publicação, o processo de publicação inclui os passos abaixo:

a) Formulário de concessão de direitos autorais, fornecido pela secretaria da revista, deve retornar para a revista assinado pelos autores.

b) Provas: serão enviadas ao autor responsável, mencionado no endereço para correspondência, no formato PDF, para que o texto seja cuidadosamente conferido. Nesta etapa do processo de edição, não serão permitidas mudanças na estrutura do manuscrito. Após os autores receberem as provas, deverão devolvê-las corrigidas, dentro de dois quatro dias.

c) Os artigos aceitos comporão os números impressos obedecendo ao cronograma em que foram submetidos, revisados e aceitos.

d) Os artigos aceitos remanescentes a cada número da revista serão disponibilizados *online* enquanto aguardam a prioridade para publicação na versão impressa.

Re-impressões: a Revista fornece ao autor, gratuitamente, excertos do artigo em formato PDF, via e-mail.

Custos de Publicação: Não haverá custos de publicação.

A tradução de todo manuscrito deve ser realizada antes da submissão do mesmo. A contratação e o pagamento dos serviços de tradução são de responsabilidade dos autores. A **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** não fornece qualquer tipo de serviço de tradução. Custos de publicação de imagens coloridas são de responsabilidade dos autores.