

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Resposta humoral de *Calomys callosus* experimentalmente infectados com
Paracoccidioides brasiliensis: estudo comparativo com camundongos susceptíveis e
resistentes**

Gabriele Garcias de Faria

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
Obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia – MG
Setembro – 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Resposta humoral de *Calomys callosus* experimentalmente infectados com
Paracoccidioides brasiliensis: estudo comparativo com camundongos susceptíveis e
resistentes**

Gabriele Garcias de Faria

Adriano Mota Loyola
(Orientador)

Margareth Leitão Gennari Cardoso
(Co-orientadora)

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
Obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia – MG
Setembro – 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Resposta humoral de *Calomys callosus* experimentalmente infectados com
Paracoccidioides brasiliensis: estudo comparativo com camundongos susceptíveis e
resistentes**

Gabriele Garcias de Faria

Adriano Mota Loyola
(Faculdade de Odontologia)

Margareth Leitão Gennari-Cardoso
(Instituto de Ciências Biomédicas)

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em 06 / 12 / 2006

Cecília Lomônaco de Paula
(Coordenadora do Curso)

Uberlândia – MG
Setembro - 2006

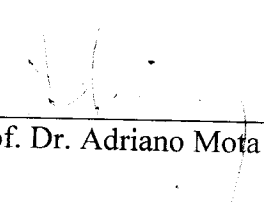
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Resposta humoral de *Calomys callosus* experimentalmente infectados com
Paracoccidioides brasiliensis: estudo comparativo com camundongos susceptíveis e
resistentes**

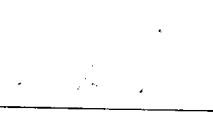
Gabriele Garcias de Faria

Aprovado pela Banca Examinadora em: 18/09/06

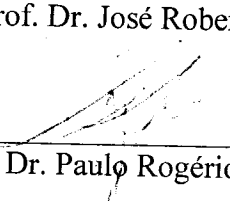
Nota: 100,0



Prof. Dr. Adriano Mota Loyola



Prof. Dr. José Roberto Mineo



Prof. Dr. Paulo Rogério de Faria

Uberlândia, 18 de setembro de 2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me guia e me encoraja nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Elci e Aparecida pelo apoio, incentivo e todo o carinho dado a mim.

Aos meus irmãos Ricardo e Aline que acreditaram em mim e também me incentivaram.

Às minhas grandes amigas que fiz em Ituiutaba: Lícia, Livia e Thaís.

Aos amigos que tenho aqui em Uberlândia: Maria Alcione, Dayanne, Cristina, Natássia, Flaviana e Robson.

À Rosy Iara por me proporcionar oportunidades que fizeram e farão uma grande diferença e em minha vida.

Ao Luciano que com muito carinho agradeço pelo apoio no final desta jornada.

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

Meus profundos agradecimentos:

Ao prof. Dr. Adriano Loyola, meu orientador, mestre e amigo, agradeço por todo o apoio dado para a realização deste trabalho, e também pelo voto de confiança dado a mim.

À prof^a. Dr^a. Margareth Gennari que me ensinou muito do que hoje eu sei fazer no laboratório.

Ao prof. Dr. José Roberto Mineo por me ceder estágio no laboratório que se tornou uma segunda casa para mim.

À Dr^a Deise Aparecida por me dar dicas que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Maria Margarida e ao Alceu, meus grandes companheiros de trabalho.

Aos companheiros de laboratório: Bellisa, Carolina, Cristiane, Cristina Rostikoviska, Fernando, Janaína, Jorge, Karine, Leandro, Priscila, Rafael, Ronaldo, Samantha e Taísa que não apenas me ajudaram nas horas em que eu precisei, mas também contribuíram para os melhores momentos dentro do laboratório.

Aos funcionários do laboratório Max, Andréa e em especial ao Júnão, que foi de grande ajuda neste trabalho.

RESUMO

Modelos experimentais são importantes instrumentos de estudo da paracoccidioidomicose. Este trabalho objetivou avaliar sorologicamente a infecção em *Calomys callosus*, comparativamente aos camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn) à doença. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* nas seguintes concentrações: $0,6 \times 10^5$; 10^6 ; 10^7 e 10^8 . Os soros foram coletados em quatro semanas e na fase avançada da doença. Foi realizado o teste ELISA com e sem avides, sendo os resultados expressos em índices ELISA (IE) e avides (IA). Com quatro semanas de infecção, os camundongos A/Sn apresentaram IEs superiores quando inoculados com 10^7 e 10^8 fungos. Com inóculos menores, camundongos B10.A e *C. callosus* apresentaram IEs superiores. Nas fases avançadas da infecção, IEs foram superiores nos camundongos A/Sn nas diferentes concentrações de inóculo, com os *C. callosus* apresentando IEs intermediários e os camundongos B10.A apresentando IEs menores. No ELISA avides, observou-se aumento de IA da fase precoce para avançada em todos os grupos. Houve semelhança de resposta humoral entre *C. callosus* e camundongos B10.A, caracterizando-o como potencial modelo alternativo de susceptibilidade a paracoccidioidomicose.

Palavras chaves: *Calomys callosus*, paracoccidioidomicose experimental, Ensaio ELISA

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	3
3 – METODOLOGIA	3
3.1 - Desenvolvimento da infecção experimental	3
3.1.1 - Preparo do inóculo	3
3.1.1.1 - Cultivo de leveduras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	3
3.1.1.2 - Inóculo de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> nos animais	3
3.1.2 – Evolução clínica da infecção: coleta de soro e avaliação histopatológica do desenvolvimento da doença	4
3.2 - Análise histopatológica da infecção	5
3.3 - Ensaio Enzimático de Imunoabsorbância (ELISA) para identificação e quantificação de IgG específica anti- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	5
3.3.1 – Preparo do antígeno solúvel de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (AgPb)	5
3.3.2 – ELISA	5
3.3.3 - ELISA avides	6
4 – RESULTADOS	7
4.1 – ELISA	9
4.2 - ELISA avides	10
5 – DISCUSSÃO	11
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

**Resposta humoral de *Calomys callosus* experimentalmente infectados com
Paracoccidioides brasiliensis: estudo comparativo com camundongos susceptíveis e
resistentes**

1 – INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis, um fungo dimórfico, é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), a principal micose sistêmica da América Latina (RESTREPO, 1985). O habitat do *P. brasiliensis* é provavelmente o solo de regiões endêmicas. (ALBORNOS, 1971; NEGRONI, 1966; SILVA-VERGARA et al., 1998). Alguns aspectos ambientais favoráveis ao seu crescimento são temperaturas moderadas e pouco variáveis, solos ácidos, umidade relativamente alta e presença de vegetação abundante (RESTREPO, 1985).

A infecção é usualmente adquirida pela inalação de propágulos transportados pelo ar (McEWEN et al., 1987). A maioria dos indivíduos expostos ao *P. brasiliensis* desenvolve uma infecção assintomática, revelada pela alta proporção de testes cutâneos positivos encontrados na população de áreas endêmicas (MARQUES et al., 1983; COELHO et al., 1994). Entretanto, alguns indivíduos apresentam manifestações clínicas, envolvendo primariamente os pulmões. Daí, a infecção pode ou não se disseminar para outros órgãos e sistemas (BRUMMER et al., 1993).

Muito do conhecimento sobre a patogenia da doença no homem foi obtido por meio de observações experimentais *in vitro* e *in vivo* a partir do desenvolvimento de modelos experimentais. O primeiro relato de uma infecção experimental bem sucedida coube a Montenegro (1927), o qual observou o desenvolvimento da doença em cobaias a partir da inoculação intratesticular de material obtido de lesões humanas. Investigações subseqüentes têm revelado que os modelos experimentais desenvolvidos em camundongos têm se mostrado bastante eficazes no estudo da doença. Várias espécies tem sido empregadas, associadas a diferentes vias de inoculação, entre as quais a intraperitoneal, intravenosa e intratesticular (CALICH et al., 1985; VILANI-MORENO et al., 1998; IABUKI & MONTENEGRO, 1979).

Calich et al. (1985), estabeleceram modelos murinos homogêneos para o estudo da paracoccidioidomicose, inoculando pela via intraperitoneal 5×10^6 leveduras da cepa Pb18 em 9 diferentes tipos de camundongos isogênicos. Deste estudo, os autores propuseram uma classificação discriminando diferentes padrões de susceptibilidade e resistência à infecção, a

saber: 1-Susceptível: cepas B10.A, B10D₂/oSn, B10D₂/nSn; 2-Intermediário: BALB/c, C₅₇Bl/10, CBA, C₃HeB/Fe; 3-Resistente: C₃H/He; 4-Altamente resistente: A/Sn.

A integridade do compartimento celular da resposta imune é fundamental para o estabelecimento da imunidade protetora contra a infecção pelo *P. brasiliensis* (BURGER et al., 1996). Estudos mostram que camundongos resistentes tendem a apresentar uma resposta imune celular com as seguintes características: eficiente ativação de macrófagos, adequada e sustentada hipersensibilidade do tipo tardio, baixos níveis de anticorpos específicos, predomínio dos isotipos IgG2a e IgG3, desenvolvendo, assim, uma PCM crônica benigna restrita aos pulmões. Já os camundongos susceptíveis tendem a apresentar uma redução na efetividade da resposta imune celular, mostrando ativação preferencial de células B, altos níveis de anticorpos específicos, predomínio do isotipo IgG2b, hipersensibilidade do tipo tardio efêmera, desenvolvendo, assim, uma doença progressiva disseminada resultando em alta taxa de mortalidade. Assim, a resistência na PCM experimental está associada com uma resposta preferencial do tipo Th1, e a susceptibilidade experimental está associada com um padrão predominante do tipo Th2. (FAZIOLI et al., 1994; CANO et al., 1995; CALICH & KASHINO, 1998; CANO et al., 2000). Uma produção sustentada de IFN- γ e IL-2 e uma predominante produção de anticorpos IgG2a estão associadas à resistência ao *P. brasiliensis*. Em contraste a produção de baixos níveis de IFN- γ , secreção precoce de altos níveis de IL-5 e IL-10, eosinofilia, e secreção preferencial dos isotipos IgG2b e IgA caracterizam a doença progressiva nos camundongos susceptíveis (CANO et al., 1998; KASHINO et al., 2000).

Um número crescente de trabalhos tem proposto a utilização do roedor *Calomys callosus*, Rengger 1830 (*Rodentia, Cricetidae*), para o estabelecimento de modelos experimentais de infecção com *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani*, *Schistosoma mansoni*, mostrando, com sucesso, padrões variados de susceptibilidade e resistência a estes microrganismos (BORGES et al., 1982; FAVORETO-JÚNIOR et al., 1998; MELLO & TEIXEIRA, 1984; LENZI et al., 1995). Além disto, o *C. callosus* tem sido identificado como reservatório natural para *T. cruzi* e hantavirus. (DOST et al., 2006; CARROLL et al., 2005).

A proposta do presente trabalho foi investigar a soro-reatividade do *C. callosus* ao *P. brasiliensis* comparativamente aos modelos de infecção em camundongos susceptíveis e resistentes. Esta proposição baseia-se no fato deste animal ser um habitante natural do cerrado da região centro-oeste brasileira considerada endêmica para a PCM. Neste sentido, o desenvolvimento deste modelo poderá oportunizar a identificação de particularidades da resposta humoral ao mencionado fungo.

2 – OBJETIVOS

- 2.1. Identificar e quantificar sorologicamente os anticorpos específicos totais anti-*P. brasiliensis* em *Calomys callosus* analisando comparativamente aos anticorpos IgG específicos anti-*P. brasiliensis* nos camundongos susceptíveis e resistentes a infecção.
- 2.2. Determinar a avidéz dos anticorpos específicos totais anti-*P. brasiliensis* em *Calomys callosus* comparativamente aos anticorpos IgG específicos anti-*P. brasiliensis* nos camundongos susceptíveis e resistentes a infecção.

3 – METODOLOGIA

3.1 - Desenvolvimento da infecção experimental

A infecção experimental foi desenvolvida a partir do inóculo intraperitoneal do fungo *P. brasiliensis* em dois grupos de animais controles, a saber: GRUPO I, camundongos machos resistentes (A/Sn); GRUPO II, camundongos machos susceptíveis (B10.A) e um grupo experimental, GRUPO III, formado por *Calomys callosus* machos. Os animais dos GRUPOS I e II foram provenientes do Centro de Bioterismo da USP, SP, Brasil. Os animais do GRUPO III foram gentilmente cedidos pela Dr^a Eloísa A. V. Ferro (Departamento de Morfologia, ICBIM-UFU, MG, Brasil). Todos os animais tinham idades variando entre oito e 10 semanas.

3.1.1 - Preparo do inóculo

3.1.1.1 - Cultivo de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*

Para o cultivo de leveduras de *P. brasiliensis* foi utilizada a cepa Pb18, descrita como sendo virulenta (KASHINO et al., 1985). O fungo foi cultivado, a temperatura de 37°C, em meio sólido de cultura YPD (extrato de levedura 0,5%, peptona 0,05%, D-glucose 1,5%) acrescido de ágar 1,5% como descrito por Ray et al. (1992).

3.1.1.2 - Inóculo de leveduras de *P. brasiliensis* nos animais

Após 7 dias de crescimento, o fungo foi removido do meio sólido em halo de segurança com auxílio de alça de platina e transferido para frasco Erlenmeyer, devidamente esterilizado, contendo cerca de 5 ml de PBS estéril. O conteúdo do frasco foi homogeneizado com auxílio de pérolas de vidro até a dissolução dos grumos da cultura. Em seguida foi realizada a contagem das células fúngicas utilizando-se uma câmara de Neubauer (Weber Scientific International, Lancing, Sussex, England) e microscópio epifluorescente (Olympus Mod. BH2,

Tokyo, Japão), objetiva de 20x. Para tanto, 10 µl de suspensão da cultura em solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (CALICH et al., 1978) foi inoculada na interface lâmina/lâminula. Tanto a contagem das células totais, quanto das células viáveis (fluorescentes) foi feita considerando os quatro retículos externos, obtendo-se o resultado final a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{número total de células contadas (10 µl)} \times \text{fator de diluição} \times 1.5 \times 10^4}{\text{número de quadrantes do retículo}}$$

Verificou-se que a suspensão de cultura apresentava uma concentração de $1,20 \times 10^8$ células/ml. Deste total, observou-se 82% de células viáveis.

Os animais foram infectados intraperitonealmente com a dose apropriada de células fúngicas contidas em 0,5 ml. As doses foram ajustadas segundo a Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos valores das concentrações de fungos viáveis dos inóculos de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) por grupo de animais utilizados.

Dosagem	0,6 x 10 ⁵	0,6 x 10 ⁶	0,6 x 10 ⁷	0,6 x 10 ⁸
Grupos	células	células	células	células
<i>Calomys callosus</i>	4	4	4	4
A/Sn (resistentes)	4	4	4	4
B10.A (susceptíveis)	4	4	4	4

3.1.2 – Evolução clínica da infecção: coleta de soro e avaliação histopatológica do desenvolvimento da doença

Após a inoculação, os animais foram observados diariamente (duas vezes/dia) para o acompanhamento da evolução clínica da infecção. A presença da infecção foi definida clinicamente quando houve a observação dos seguintes sinais: prostração, perda de pêlos, diminuição do consumo de ração. A coleta de sangue para obtenção do soro foi realizada em dois momentos, sendo o primeiro quando os animais estavam com quatro semanas de infecção; o segundo quando os animais apresentaram agravamento dos sinais da doença. A identificação destes sinais nos animais susceptíveis (B10.A) também foi considerada parâmetro para a realização do sacrifício de todos os animais do experimento. Na ausência destes sinais, ficou definido que os animais seriam sacrificados no momento do primeiro óbito pela doença no referido grupo. Neste estágio, foram coletadas amostras de baço, fígado e pulmão para desenvolvimento do estudo histopatológico.

3.2 - Análise histopatológica da infecção

Os fragmentos de pulmão, fígado e baço dos animais foram removidos no momento do sacrifício ou morte espontânea, fixados em formol 10% e emblocados em parafina. Os cortes obtidos, com espessura de 4 μ m, foram corados por hematoxilina e eosina e pela técnica de metanamina-prata de Gomori–Grocott (MICHALANY, 1980) para evidênciação dos fungos. Para a avaliação histopatológica foram considerados os seguintes itens: presença ou não de lesões orgânicas, tipo de resposta inflamatória, e identificação dos fungos nas lesões.

3.3 - Ensaio Enzimático de Imunoabsorbância (ELISA) para identificação e quantificação de anticorpos (IgG nos camundongos e γ -globulina nos *C. callosus*) específicos anti-*P. brasiliensis*

3.3.1 – Preparo de antígeno solúvel de *P. brasiliensis* (AgPb)

O AgPb foi preparado segundo Scott et al. (1987) com algumas modificações.

Leveduras de *P. brasiliensis* foram suspensas em 2 ml de PBS (salina tamponada com fosfato - pH 7,2) estéril contendo inibidores de proteases (aprotinina 10 μ g/ml, leupeptina 50 μ g/ml e PMSF a 1,6 mM). A seguir, foram realizados 15 ciclos de congelamento e descongelamento em N₂ líquido e banho-maria a 37°C, respectivamente. O extrato antigênico foi então submetido a 6 ciclos de 1 minuto em ultra-som e posteriormente macerado em N₂ líquido, com o auxílio de Graal e pistilo. Após esse processo a suspensão foi clarificada por centrifugação a 15.000 rpm a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado, sua concentração protéica determinada pelo método de Lowry et al. (1951), e armazenado a – 20°C, até o momento do uso.

3.3.2 - ELISA

Placas de alta afinidade para ELISA (Corning Costar, Corning, New York, USA) foram incubadas com 1,0 μ g de AgPb em 50 μ l de tampão carbonato, 0,2 M (pH 9,6), por poço, deixados overnight a 4° C, em câmara úmida. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com 50 μ l de PBS 0,01 M contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) acrescidos de gelatina 3%, por 1 hora a 37 °C. Na sequência foi realizada a incubação com amostras de soro dos animais, diluídas 1:128 em solução de PBS-T acrescida de gelatina 1%, por 2 horas a 37°C. Posteriormente foi feita a incubação com 50 μ l dos anticorpos anti-IgG conjugados a

peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), diluídos a 1:2000 para camundongos e anticorpos anti- γ -globulina (Laboratório de Imunologia - UFU) conjugados a peroxidase, diluídos a 1:200 para *Calomys callosus*, em solução de PBS-T acrescido de gelatina 1%, por 1 hora a 37°C. Após cada etapa do experimento, os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T. Para revelação da reação, 50 μ l de substrato {5 mg de OPD (orto-fenilenodiamina), 5 ml de tampão citrato de sódio/ácido cítrico (pH 5) e 5 μ l de H₂O₂ a 30%} foram acrescentados aos poços. A reação foi paralisada com a adição de 25 μ l H₂SO₄ a 2 N, por poço. As densidades ópticas (DO) obtidas foram determinadas em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus; Flow Laboratories, Genebra-Suíça) a um comprimento de onda de 492 nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Os resultados foram expressos em índice ELISA (IE), onde: IE = média dos valores de DO em cada amostra/valores de corte (*cut-off*). Os valores de *cut-off* das reações foram estabelecidos pela média das DOs de três amostras negativas mais três desvios padrões. Amostras cujo IE foi acima de 1.0 foram consideradas positivas.

3.3.3 - ELISA avides

Placas de alta afinidade foram sensibilizadas com antígeno e incubadas com as amostras de soro, como descrito anteriormente. Previamente à adição do conjugado, as placas foram tratadas com uréia a 6M em PBS-T por 5 minutos. Em seguida foram lavadas e o conjugado imunoenzimático foi adicionado e a reação desenvolvida. Os resultados foram expressos em índice avides (IA). O IA foi determinado pela razão entre os valores do IE das amostras tratadas com uréia e o IE das amostras não tratadas com uréia, sendo expresso em porcentagem ($U^+/U^- \times 100$). Foi definido como baixa avides valores de IA $\leq 40\%$; avides intermediária IA variando entre 41 e 70%; e alta avides, índices de IA $\geq 71\%$.

4 – RESULTADOS

No presente trabalho era esperado que os camundongos susceptíveis (B10.A) – considerados parâmetros na evolução da infecção - apresentassem sinais clínicos da doença e/ou viessem a óbito precocemente em relação aos demais grupos. Entretanto foi observado que o grupo de *Calomys callosus* manifestou os sinais clínicos da infecção precocemente em relação aos demais grupos (B10.A e AS/n). Além das manifestações clínicas, as mortes no grupo de *C. callosus* foram também precoces em relação aos grupos de camundongos. Pode-se constatar que a cronologia dos óbitos foi inversamente proporcional às doses dos inóculos utilizados (Tabela 2).

Tabela 2 – Óbitos espontâneos dos animais inoculados nesse experimento, segundo a cronologia e dose de inóculo utilizada, por grupo de animais avaliado.

Animais \ Inóculo	0,6x10 ⁸ células	0,6x10 ⁷ células	0,6x10 ⁶ células	0,6x10 ⁵ células
	Óbito a partir do 23° dia	Óbito a partir do 48° dia	Óbito a partir do 98° dia	Óbito a partir do 115° dia
<i>Calomys callosus</i>				
B10.A	SAC ^{1,2}	SAC	SAC	SAC
A/Sn	SAC	SAC	SAC	SAC

1 – SAC: Sem Alterações Clínicas Evidentes

2 - apenas neste grupo foi identificado óbito (um óbito)

Histopatologicamente, as alterações observadas foram decorrentes da presença de reação inflamatória que variou quanto ao tipo e intensidade, segundo o grupo de animais, órgão e a dose do inóculo empregada. Usualmente foram identificadas lesões caracterizadas por reação inflamatória crônica granulomatosa sem organização definida, com necrose e um maior número de fungos. Este padrão embora comum a todos os tecidos avaliados, mostrou-se mais intenso para inóculos 0,6 x 10⁸ independentemente dos órgãos estudados e dos animais avaliados. Nos grupos que receberam inóculos de 0,6 x 10⁵ perceberam-se diferenças marcantes quanto ao tipo e intensidade do infiltrado inflamatório presente e na vulnerabilidade orgânica a infecção, sendo também mais expressivas nos *C. callosus*. Nestes animais, a diferença de expressividade das lesões foi mais marcante no pulmão (Figura 1).

**Resposta humoral de *Calomys callosus* experimentalmente infectados com
Paracoccidioides brasiliensis: estudo comparativo com camundongos susceptíveis e
resistentes**

1 – INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis, um fungo dimórfico, é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), a principal micose sistêmica da América Latina (RESTREPO, 1985). O habitat do *P. brasiliensis* é provavelmente o solo de regiões endêmicas. (ALBORNOZ, 1971; NEGRONI, 1966; SILVA-VERGARA et al., 1998). Alguns aspectos ambientais favoráveis ao seu crescimento são temperaturas moderadas e pouco variáveis, solos ácidos, umidade relativamente alta e presença de vegetação abundante (RESTREPO, 1985).

A infecção é usualmente adquirida pela inalação de propágulos transportados pelo ar (McEWEN et al., 1987). A maioria dos indivíduos expostos ao *P. brasiliensis* desenvolve uma infecção assintomática, revelada pela alta proporção de testes cutâneos positivos encontrados na população de áreas endêmicas (MARQUES et al., 1983; COELHO et al., 1994). Entretanto, alguns indivíduos apresentam manifestações clínicas, envolvendo primariamente os pulmões. Daí, a infecção pode ou não se disseminar para outros órgãos e sistemas (BRUMMER et al., 1993).

Muito do conhecimento sobre a patogenia da doença no homem foi obtido por meio de observações experimentais *in vitro* e *in vivo* a partir do desenvolvimento de modelos experimentais. O primeiro relato de uma infecção experimental bem sucedida coube a Montenegro (1927), o qual observou o desenvolvimento da doença em cobaios a partir da inoculação intratesticular de material obtido de lesões humanas. Investigações subsequentes têm revelado que os modelos experimentais desenvolvidos em camundongos têm se mostrado bastante eficazes no estudo da doença. Várias espécies tem sido empregadas, associadas a diferentes vias de inoculação, entre as quais a intraperitoneal, intravenosa e intratesticular (CALICH et al., 1985; VILANI-MORENO et al., 1998; IABUKI & MONTENEGRO, 1979).

Calich et al. (1985), estabeleceram modelos murinos homogêneos para o estudo da paracoccidioidomicose, inoculando pela via intraperitoneal 5×10^6 leveduras da cepa Pb18 em 9 diferentes tipos de camundongos isogênicos. Deste estudo, os autores propuseram uma classificação discriminando diferentes padrões de susceptibilidade e resistência à infecção, a

saber: 1-Susceptível: cepas B10.A, B10D₂/oSn, B10D₂/nSn; 2-Intermediário: BALB/c, C₅₇Bl/10, CBA, C₃HeB/Fe; 3-Resistente: C₃H/He; 4-Altamente resistente: A/Sn.

A integridade do compartimento celular da resposta imune é fundamental para o estabelecimento da imunidade protetora contra a infecção pelo *P. brasiliensis* (BURGER et al., 1996). Estudos mostram que camundongos resistentes tendem a apresentar uma resposta imune celular com as seguintes características: eficiente ativação de macrófagos, adequada e sustentada hipersensibilidade do tipo tardio, baixos níveis de anticorpos específicos, predomínio dos isotipos IgG2a e IgG3, desenvolvendo, assim, uma PCM crônica benigna restrita aos pulmões. Já os camundongos susceptíveis tendem a apresentar uma redução na efetividade da resposta imune celular, mostrando ativação preferencial de células B, altos níveis de anticorpos específicos, predomínio do isotipo IgG2b, hipersensibilidade do tipo tardio efêmera, desenvolvendo, assim, uma doença progressiva disseminada resultando em alta taxa de mortalidade. Assim, a resistência na PCM experimental está associada com uma resposta preferencial do tipo Th1, e a susceptibilidade experimental está associada com um padrão predominante do tipo Th2. (FAZIOLI et al., 1994; CANO et al., 1995; CALICH & KASHINO, 1998; CANO et al., 2000). Uma produção sustentada de IFN- γ e IL-2 e uma predominante produção de anticorpos IgG2a estão associadas à resistência ao *P. brasiliensis*. Em contraste a produção de baixos níveis de IFN- γ , secreção precoce de altos níveis de IL-5 e IL-10, eosinofilia, e secreção preferencial dos isotipos IgG2b e IgA caracterizam a doença progressiva nos camundongos susceptíveis (CANO et al., 1998; KASHINO et al., 2000).

Um número crescente de trabalhos tem proposto a utilização do roedor *Calomys callosus*, Rengger 1830 (*Rodentia*, *Cricetidae*), para o estabelecimento de modelos experimentais de infecção com *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani*, *Schistosoma mansoni*, mostrando, com sucesso, padrões variados de susceptibilidade e resistência a estes microrganismos (BORGES et al., 1982; FAVORETO-JÚNIOR et al., 1998; MELLO & TEIXEIRA, 1984; LENZI et al., 1995). Além disto, o *C. callosus* tem sido identificado como reservatório natural para *T. cruzi* e hantavirus. (DOST et al., 2006; CARROLL et al., 2005).

A proposta do presente trabalho foi investigar a soro-reatividade do *C. callosus* ao *P. brasiliensis* comparativamente aos modelos de infecção em camundongos susceptíveis e resistentes. Esta proposição baseia-se no fato deste animal ser um habitante natural do cerrado da região centro-oeste brasileira considerada endêmica para a PCM. Neste sentido, o desenvolvimento deste modelo poderá oportunizar a identificação de particularidades da resposta humoral ao mencionado fungo.

2 – OBJETIVOS

2.1. Identificar e quantificar sorologicamente os anticorpos específicos totais anti-*P. brasiliensis* em *Calomys callosus* analisando comparativamente aos anticorpos IgG específicos anti-*P. brasiliensis* nos camundongos susceptíveis e resistentes a infecção.

2.2. Determinar a avidéz dos anticorpos específicos totais anti-*P. brasiliensis* em *Calomys callosus* comparativamente aos anticorpos IgG específicos anti-*P. brasiliensis* nos camundongos susceptíveis e resistentes a infecção.

3 – METODOLOGIA

3.1 - Desenvolvimento da infecção experimental

A infecção experimental foi desenvolvida a partir do inóculo intraperitoneal do fungo *P. brasiliensis* em dois grupos de animais controles, a saber: GRUPO I, camundongos machos resistentes (A/Sn); GRUPO II, camundongos machos susceptíveis (B10.A) e um grupo experimental, GRUPO III, formado por *Calomys callosus* machos. Os animais dos GRUPOS I e II foram provenientes do Centro de Bioterismo da USP, SP, Brasil. Os animais do GRUPO III foram gentilmente cedidos pela Dr^a Eloísa A. V. Ferro (Departamento de Morfologia, ICBIM-UFU, MG, Brasil). Todos os animais tinham idades variando entre oito e 10 semanas.

3.1.1 - Preparo do inóculo

3.1.1.1 - Cultivo de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*

Para o cultivo de leveduras de *P. brasiliensis* foi utilizada a cepa Pb18, descrita como sendo virulenta (KASHINO et al., 1985). O fungo foi cultivado, a temperatura de 37°C, em meio sólido de cultura YPD (extrato de levedura 0,5%, peptona 0,05%, D-glucose 1,5%) acrescido de ágar 1,5% como descrito por Ray et al. (1992).

3.1.1.2 - Inóculo de leveduras de *P. brasiliensis* nos animais

Após 7 dias de crescimento, o fungo foi removido do meio sólido em halo de segurança com auxílio de alça de platina e transferido para frasco Erlenmeyer, devidamente esterilizado, contendo cerca de 5 ml de PBS estéril. O conteúdo do frasco foi homogeneizado com auxílio de pérolas de vidro até a dissolução dos grumos da cultura. Em seguida foi realizada a contagem das células fúngicas utilizando-se uma câmara de Neubauer (Weber Scientific International, Lancing, Sussex, England) e microscópio epifluorescente (Olympus Mod. BH2,

Tokyo, Japão), objetiva de 20x. Para tanto, 10 µl de suspensão da cultura em solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (CALICH et al., 1978) foi inoculada na interface lâmina/lâminula. Tanto a contagem das células totais, quanto das células viáveis (fluorescentes) foi feita considerando os quatro retículos externos, obtendo-se o resultado final a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{número total de células contadas (10 µl)} \times \text{fator de diluição} \times 1.5 \times 10^4}{\text{número de quadrantes do retículo}}$$

Verificou-se que a suspensão de cultura apresentava uma concentração de $1,20 \times 10^8$ células/ml. Deste total, observou-se 82% de células viáveis.

Os animais foram infectados intraperitonealmente com a dose apropriada de células fúngicas contidas em 0,5 ml. As doses foram ajustadas segundo a Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos valores das concentrações de fungos viáveis dos inóculos de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) por grupo de animais utilizados.

Dosagem	$0,6 \times 10^5$	$0,6 \times 10^6$	$0,6 \times 10^7$	$0,6 \times 10^8$
Grupos	células	células	células	células
<i>Calomys callosus</i>	4	4	4	4
A/Sn (resistentes)	4	4	4	4
B10.A (susceptíveis)	4	4	4	4

3.1.2 – Evolução clínica da infecção: coleta de soro e avaliação histopatológica do desenvolvimento da doença

Após a inoculação, os animais foram observados diariamente (duas vezes/dia) para o acompanhamento da evolução clínica da infecção. A presença da infecção foi definida clinicamente quando houve a observação dos seguintes sinais: prostração, perda de pêlos, diminuição do consumo de ração. A coleta de sangue para obtenção do soro foi realizada em dois momentos, sendo o primeiro quando os animais estavam com quatro semanas de infecção; o segundo quando os animais apresentaram agravamento dos sinais da doença. A identificação destes sinais nos animais susceptíveis (B10.A) também foi considerada parâmetro para a realização do sacrifício de todos os animais do experimento. Na ausência destes sinais, ficou definido que os animais seriam sacrificados no momento do primeiro óbito pela doença no referido grupo. Neste estágio, foram coletadas amostras de baço, fígado e pulmão para desenvolvimento do estudo histopatológico.

3.2 - Análise histopatológica da infecção

Os fragmentos de pulmão, fígado e baço dos animais foram removidos no momento do sacrifício ou morte espontânea, fixados em formol 10% e emblocados em parafina. Os cortes obtidos, com espessura de 4 μ m, foram corados por hematoxilina e eosina e pela técnica de metanamina-prata de Gomori–Grocott (MICHALANY, 1980) para evidenciação dos fungos. Para a avaliação histopatológica foram considerados os seguintes itens: presença ou não de lesões orgânicas, tipo de resposta inflamatória, e identificação dos fungos nas lesões.

3.3 - Ensaio Enzimático de Imunoabsorbância (ELISA) para identificação e quantificação de anticorpos (IgG nos camundongos e γ -globulina nos *C. callosus*) específicos anti-*P. brasiliensis*

3.3.1 – Preparo de antígeno solúvel de *P. brasiliensis* (AgPb)

O AgPb foi preparado segundo Scott et al. (1987) com algumas modificações.

Leveduras de *P. brasiliensis* foram suspensas em 2 ml de PBS (salina tamponada com fosfato - pH 7,2) estéril contendo inibidores de proteases (aprotinina 10 μ g/ml, leupeptina 50 μ g/ml e PMSF a 1,6 mM). A seguir, foram realizados 15 ciclos de congelamento e descongelamento em N₂ líquido e banho-maria a 37°C, respectivamente. O extrato antigênico foi então submetido a 6 ciclos de 1 minuto em ultra-som e posteriormente macerado em N₂ líquido, com o auxílio de Graal e pistilo. Após esse processo a suspensão foi clarificada por centrifugação a 15.000 rpm a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado, sua concentração protéica determinada pelo método de Lowry et al. (1951), e armazenado a – 20°C, até o momento do uso.

3.3.2 - ELISA

Placas de alta afinidade para ELISA (Corning Costar, Corning, New York, USA) foram incubadas com 1,0 μ g de AgPb em 50 μ l de tampão carbonato, 0,2 M (pH 9,6), por poço, deixados overnight a 4° C, em câmara úmida. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com 50 μ l de PBS 0,01 M contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) acrescidos de gelatina 3%, por 1 hora a 37 °C. Na seqüência foi realizada a incubação com amostras de soro dos animais, diluídas 1:128 em solução de PBS-T acrescida de gelatina 1%, por 2 horas a 37°C. Posteriormente foi feita a incubação com 50 μ l dos anticorpos anti-IgG conjugados a

peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), diluídos a 1:2000 para camundongos e anticorpos anti- γ -globulina (Laboratório de Imunologia - UFU) conjugados a peroxidase, diluídos a 1:200 para *Calomys callosus*, em solução de PBS-T acrescido de gelatina 1%, por 1 hora a 37°C. Após cada etapa do experimento, os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T. Para revelação da reação, 50 μ l de substrato {5 mg de OPD (orto-fenilenodiamina), 5 ml de tampão citrato de sódio/ácido cítrico (pH 5) e 5 μ l de H₂O₂ a 30%} foram acrescentados aos poços. A reação foi paralisada com a adição de 25 μ l H₂SO₄ a 2 N, por poço. As densidades ópticas (DO) obtidas foram determinadas em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus; Flow Laboratories, Genebra-Suíça) a um comprimento de onda de 492 nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Os resultados foram expressos em índice ELISA (IE), onde: IE = média dos valores de DO em cada amostra/valores de corte (*cut-off*). Os valores de *cut-off* das reações foram estabelecidos pela média das DOs de três amostras negativas mais três desvios padrões. Amostras cujo IE foi acima de 1.0 foram consideradas positivas.

3.3.3 - ELISA avides

Placas de alta afinidade foram sensibilizadas com antígeno e incubadas com as amostras de soro, como descrito anteriormente. Previamente à adição do conjugado, as placas foram tratadas com uréia a 6M em PBS-T por 5 minutos. Em seguida foram lavadas e o conjugado imunoenzimático foi adicionado e a reação desenvolvida. Os resultados foram expressos em índice avides (IA). O IA foi determinado pela razão entre os valores do IE das amostras tratadas com uréia e o IE das amostras não tratadas com uréia, sendo expresso em porcentagem ($U^+/U^- \times 100$). Foi definido como baixa avides valores de IA $\leq 40\%$; avides intermediária IA variando entre 41 e 70%; e alta avides, índices de IA $\geq 71\%$.

4 – RESULTADOS

No presente trabalho era esperado que os camundongos susceptíveis (B10.A) – considerados parâmetros na evolução da infecção - apresentassem sinais clínicos da doença e/ou viessem a óbito precocemente em relação aos demais grupos. Entretanto foi observado que o grupo de *Calomys callosus* manifestou os sinais clínicos da infecção precocemente em relação aos demais grupos (B10.A e AS/n). Além das manifestações clínicas, as mortes no grupo de *C. callosus* foram também precoces em relação aos grupos de camundongos. Pode-se constatar que a cronologia dos óbitos foi inversamente proporcional às doses dos inóculos utilizados (Tabela 2).

Tabela 2 – Óbitos espontâneos dos animais inoculados nesse experimento, segundo a cronologia e dose de inóculo utilizada, por grupo de animais avaliado.

Animais \ Inóculo	0,6x10 ⁸ células	0,6x10 ⁷ células	0,6x10 ⁶ células	0,6x10 ⁵ células
	Óbito a partir do 23° dia	Óbito a partir do 48° dia	Óbito a partir do 98° dia	Óbito a partir do 115° dia
<i>Calomys callosus</i>				
B10.A	SAC ^{1,2}	SAC	SAC	SAC
A/Sn	SAC	SAC	SAC	SAC

1 – SAC: Sem Alterações Clínicas Evidentes

2 - apenas neste grupo foi identificado óbito (um óbito)

Histopatologicamente, as alterações observadas foram decorrentes da presença de reação inflamatória que variou quanto ao tipo e intensidade, segundo o grupo de animais, órgão e a dose do inóculo empregada. Usualmente foram identificadas lesões caracterizadas por reação inflamatória crônica granulomatosa sem organização definida, com necrose e um maior número de fungos. Este padrão embora comum a todos os tecidos avaliados, mostrou-se mais intenso para inóculos 0,6 x 10⁸ independentemente dos órgãos estudados e dos animais avaliados. Nos grupos que receberam inóculos de 0,6 x 10⁵ perceberam-se diferenças marcantes quanto ao tipo e intensidade do infiltrado inflamatório presente e na vulnerabilidade orgânica a infecção, sendo também mais expressivas nos *C. callosus*. Nestes animais, a diferença de expressividade das lesões foi mais marcante no pulmão (Figura 1).

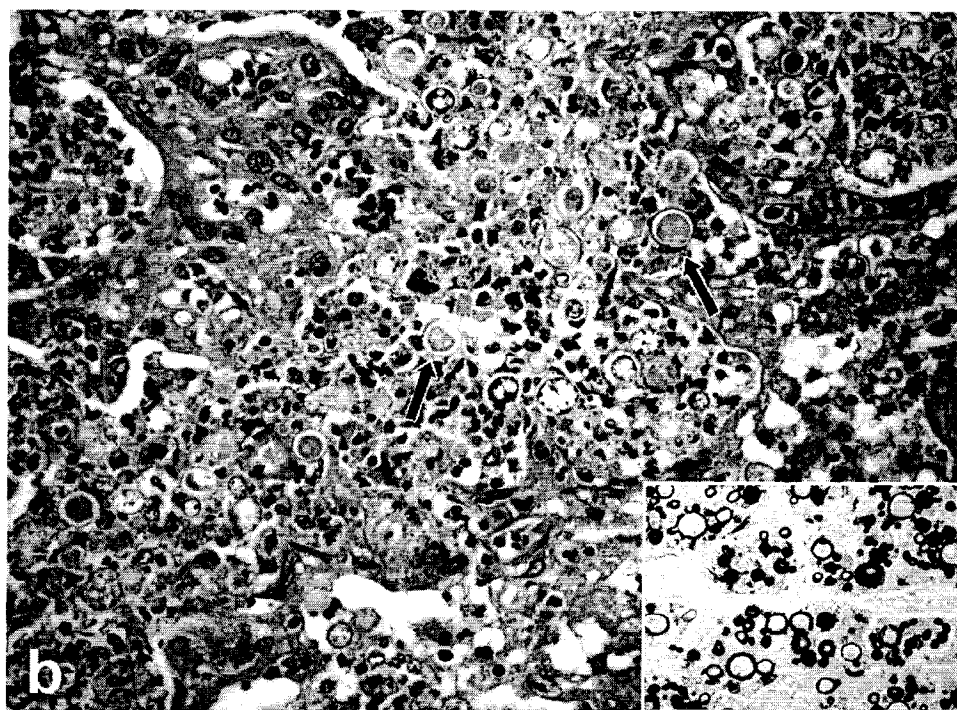
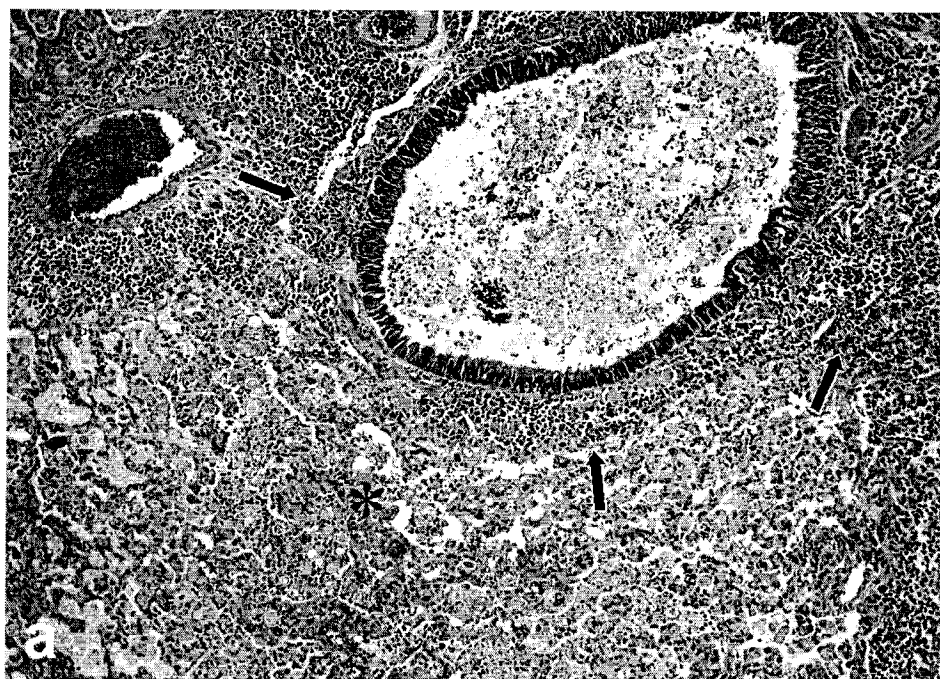


Figura 1 – Secção histológica de pulmão do *C. callosus*, inoculado com $0,6 \times 10^5$ leveduras. (a) Infiltrado por reação inflamatória crônica granulomatosa rica em fungos, comprometendo a arquitetura do parênquima pulmonar (*). Na área mais preservada, evidencia-se infiltrado linfo-histiocitário peri bronquiolar (seta) e intra-alveolar (Aumento original 100x, HE). (b) Segmento do pulmão apresentando infiltrado neutrofilico purulento. Reação inflamatória crônica granulomatosa rica em fungos (seta) (Aumento original 400x, HE). **Detalhe:** Coloração pela técnica de metanamina-prata de Gomori–Grocott mostrando grande quantidade de leveduras (Aumento original 400x).

4.1 - ELISA

A mensuração de IgG (camundongos A/Sn e B10.A) e γ -globulina (*Calomys callosus*) específicas anti-*P. brasiliensis*, nas amostras de soro coletadas após quatro semanas de inoculação e na fase avançada de infecção, respectivamente são mostradas nas Figuras 2 e 3. Todavia, para dois *C. callosus* que receberam o inóculo de Pb18 com $0,6 \times 10^8$ leveduras, o ELISA foi realizado com soros coletados antes de completarem quatro semanas de infecção, em função do óbito ter ocorrido na 3ª semana de infecção.

Como pode ser observado, na quarta semana de infecção houve uma variação da resposta humoral frente às diferentes dosagens do inóculo. Nos grupos em que os animais foram inoculados com $0,6 \times 10^5$ e $0,6 \times 10^6$ células fúngicas, os camundongos B10.A e os *C. callosus* apresentaram IEs superiores aos dos camundongos A/Sn. Já nos grupos em que os animais foram inoculados com $0,6 \times 10^7$ e $0,6 \times 10^8$ células fúngicas, os camundongos A/Sn apresentaram IEs superiores aos dos camundongos B10.A e também *C. callosus*. Nas amostras de soro coletadas na fase avançada da doença, os IEs foram superiores nos camundongos A/Sn em todas as dosagens dos inóculos, com os *C. callosus* apresentando IEs intermediários e os camundongos B10.A apresentando IEs menores (exceto no inóculo de $0,6 \times 10^8$), entretanto também positivos.

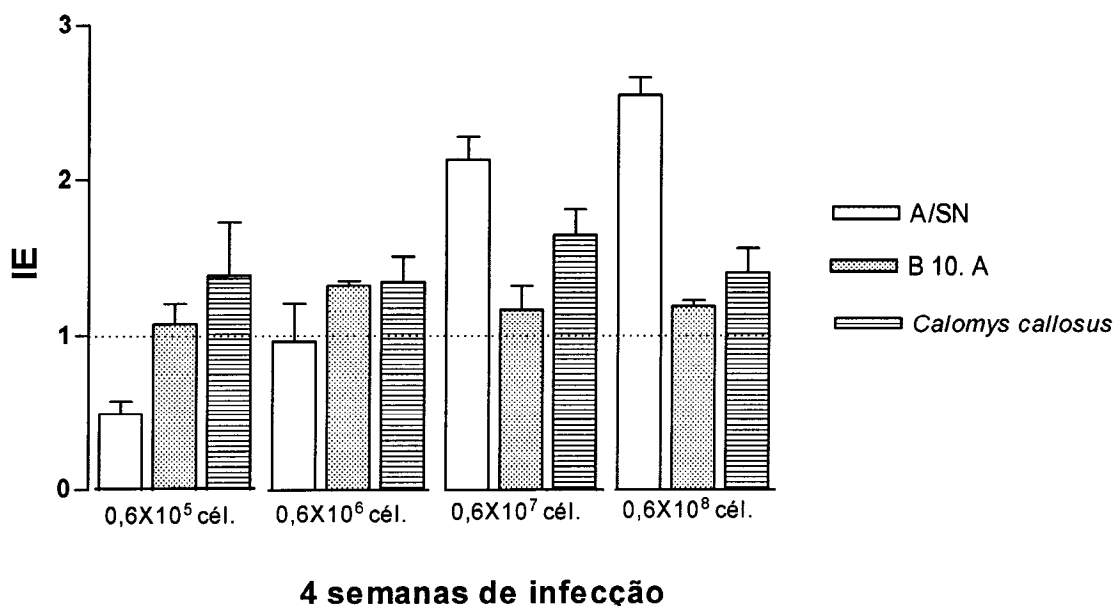


Figura 2 – ELISA: Níveis de anticorpos específicos (IgG nos camundongos A/Sn e B10.A; γ -globulina nos *Calomys callosus*) nos animais infectados com $0,6 \times 10^5$, 10^6 , 10^7 , 10^8 leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18), com quatro semanas de infecção. Os resultados foram expressos em Índice ELISA.

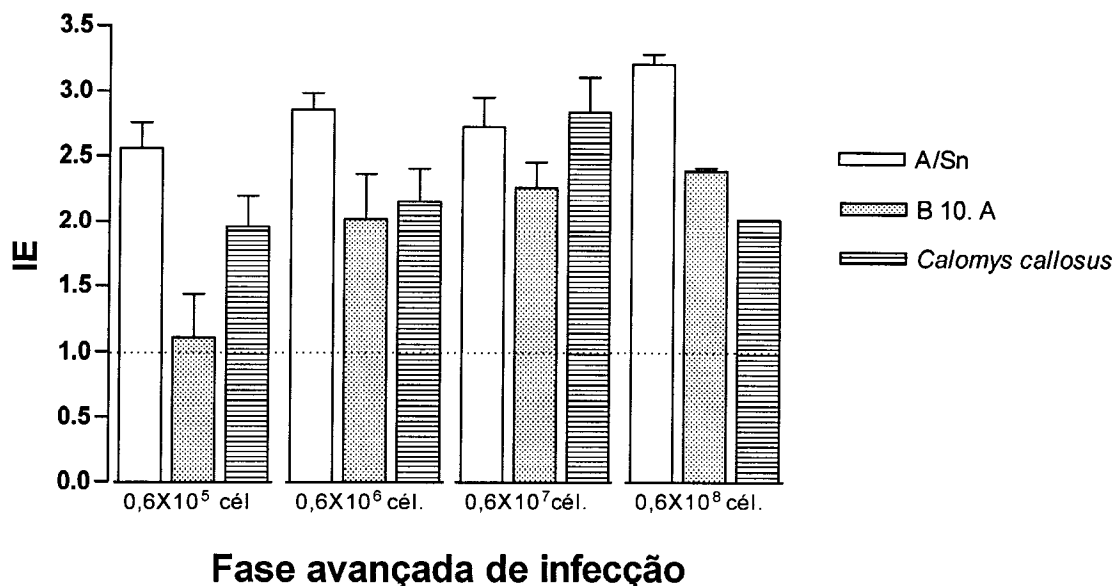


Figura 3 – ELISA: Níveis de anticorpos específicos (IgG nos camundongos A/Sn e B10.A; γ -globulina nos *Calomys callosus*) nos animais infectados com $0,6 \times 10^5$, 10^6 , 10^7 , 10^8 leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18), em fase avançada de infecção. Os resultados foram expressos em Índice ELISA.

4.2 - ELISA avidéz

A Figura 4 apresenta os valores de Índice Avidéz (IA) dos anticorpos específicos nas amostras de soro avaliadas.

Nos camundongos A/Sn e B10.A os valores de IA elevam-se proporcionalmente às dosagens dos inóculos utilizados. Com quatro semanas de infecção os valores de IA foram de médio a alto para os camundongos resistentes e de baixo a alto para os camundongos susceptíveis. Os valores de IA foram mais elevados nos estágios mais avançados da infecção para os diferentes inóculos considerados.

Nos *Calomys callosus* os valores de IA não apresentaram uma elevação proporcional ao inóculo, sendo, de médio a alto com quatro semanas de infecção. Entretanto, houve aumento dos valores de IA nos estágios mais avançados de infecção.

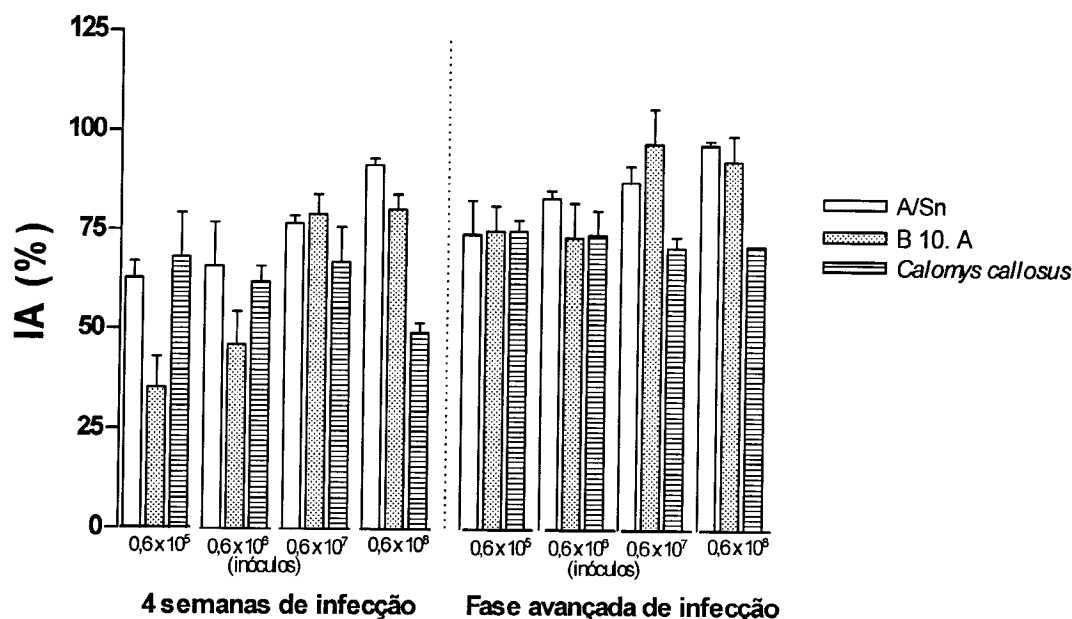


Figura 4 – ELISA Avidex: Índice de Avidex (IA) para os anticorpos específicos (IgG nos camundongos A/Sn e B10.A; γ -globulina nos *Calomys callosus*) dos soros obtidos com quatro semanas e em fase avançada de infecção. Os valores são expressos segundo os diferentes inóculos de leveduras empregados.

5 – DISCUSSÃO

Este estudo identificou e quantificou sorologicamente por meio de ensaio ELISA, as imunoglobulinas totais (γ -globulina) específicas ao antígeno de *P. brasiliensis* em *C. callosus*, e as imunoglobulinas G (IgG) específicas ao antígeno de *P. brasiliensis* em camundongos susceptíveis (B10.A) e camundongos resistentes (A/Sn) ao fungo, inoculados intraperitonealmente com leveduras de *P. brasiliensis*. Além disso, foi determinada a avidex dos anticorpos referidos acima, por meio de ensaio ELISA avidex. Para isso, utilizou-se o soro dos diferentes animais inoculados com diferentes concentrações de leveduras de *P. brasiliensis*, a saber: $0,6 \times 10^5$; $0,6 \times 10^6$; $0,6 \times 10^7$ e $0,6 \times 10^8$. Os soros desses animais foram analisados após quatro semanas de infecção e posteriormente, em fase avançada de infecção, sendo os resultados expressos por índice ELISA (IE) e índice avidex (IA).

Com quatro semanas de infecção pode-se observar que os camundongos A/Sn tiveram IE menor em relação aos camundongos B10.A e *C. callosus* nos inóculos menores ($0,6 \times 10^5$

e $0,6 \times 10^6$ leveduras) e IE maior em relação aos camundongos B10.A e *C. callosus* nos inóculos maiores ($0,6 \times 10^7$ e $0,6 \times 10^8$ leveduras). Cano et al. (1995) mostraram que, após quatro semanas de inoculação em camundongos A/Sn e B10.A (com 10^6 leveduras), o pico mais alto de Ig total foi encontrado nos animais susceptíveis, e que, em oito semanas, esse título aumenta abruptamente em animais resistentes, tornando-se mais altos que nos susceptíveis. Nossos resultados são semelhantes aos observados naquele trabalho quando analisamos os inóculos menores ($0,6 \times 10^5$ e $0,6 \times 10^6$ leveduras). Em inóculos maiores, o IE do soro de animais resistentes se torna maior do que os outros animais. Provavelmente, por ser um número muito maior de fungos, o estímulo antigênico aos animais resistentes foi maior, gerando estímulo imunológico e produção de anticorpos. Interessante observar que os IEs de *C. callosus* infectados têm perfis semelhantes aos dos camundongos susceptíveis.

Ao observarmos o IE no estágio mais avançado da infecção, pode-se ver que os camundongos resistentes mantiveram os mais altos IEs. E camundongos susceptíveis também aumentaram IE em relação ao primeiro mês, mas ainda continuaram menores do que os resistentes. Os IEs de *Calomys callosus*, nessa fase, foram maiores do que os animais susceptíveis (exceto no inóculo de $0,6 \times 10^8$ células fúngicas), porém, também menores do que os resistentes. Cano et al. (1998) mostraram que até a quarta semana, a Ig total específica foi menor em camundongos A/Sn. Porém, com oito semanas e após bloqueio de IFN- γ houve aumento da Ig total nos dois grupos de animais (resistentes e susceptíveis), mas muito maior nos animais resistentes. Em nosso estudo, provavelmente, a maior concentração de leveduras inoculadas poderia estar favorecendo uma inibição da produção de IFN- γ , aumentando, concomitantemente, a produção de anticorpos. O estímulo nitrogênico exacerbado na paracoccidiodomicose pode levar a uma maior produção de óxido nítrico e esta produção se tornar nociva às células do sistema imune, diminuindo a produção de IFN- γ (BOCCA et al., 1998).

Na forma disseminada da PCM humana, altos níveis de anticorpos específicos e depressão da imunidade celular estão associados com características histopatológicas, mostrando perda da inflamação granulomatosa organizada, contendo grande número de células fúngicas no tecido (MONTENEGRO & FRANCO, 1994). Casos graves de paracoccidiodomicose humana mostram ativação policlonal de linfócitos B, com grande número de plasmócitos secretando anticorpos irrelevantes (CHEQUER-BOU-HABIBI et al., 1989). O número de leveduras infectando os animais infectados com $0,6 \times 10^7$ e $0,6 \times 10^8$

células poderia estar mimetizando casos de paracoccidioidomicose grave, com alta produção de anticorpos.

Quanto ao índice de avidéz (IA) determinado nos três grupos de animais e nos diferentes inóculos, observou-se que com quatro semanas de infecção os índices de avidéz foram de médio a alto nos camundongos A/Sn e nos *C. callosus* e de baixo a médio nos camundongos B10.A. Na fase avançada de infecção os IA tiveram valores maiores em todos os animais, sendo, portanto maiores do que os IAs na fase precoce de infecção (quatro semanas).

O único estudo relacionado à avidéz anticórpica frente à infecção com *P. brasiliensis* foi o de Neves et al. (2003), o qual mostrou que soros de pacientes com paracoccidioidomicose apresentando imunodifusão positiva, quando testados para determinar a avidéz por ELISA, apresentaram IA muito maior do que os soros negativos para esse teste.

O resultado observado nesses animais é semelhante ao descrito na literatura (BACHMANN et al., 1997), em que anticorpos de baixa afinidade predominam durante a fase aguda da infecção e anticorpos de alta afinidade são produzidos mais tardiamente na infecção.

Foi também mostrado que houve um aumento na avidéz dos anticorpos na fase crônica da doença, mas em alguns casos a diferença da avidéz entre fase aguda e crônica foi pequena. Embora estes achados estejam dentro do esperado, vale salientar que as pequenas diferenças entre os IA da fase aguda para crônica devem ser cuidadosamente avaliadas. Neste sentido, há que considerar limitações técnicas ou decorrentes da própria complexidade da resposta imune na paracoccidioidomicose nestes animais. Mais investigações devem ser conduzidas neste sentido, haja vista o limitado número de trabalhos relacionados à avidéz de IgG nesta doença.

Os resultados parciais observados até aqui mostraram uma semelhança no padrão de resposta desses anticorpos pelo soro de *Calomys callosus* e de camundongos B10.A classicamente identificado com susceptibilidade à infecção, demonstrando a potencialidade do emprego do *C. callosus* no estabelecimento de um modelo experimental para paracoccidioidomicose.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, England, v. 9, p. 248-253, Nov. 1971.
- BACHMANN, M. F.; KALINKE, U.; ALTHAGE, A.; FREER, G.; BURKHART, C.; ROOST, H. P.; AQUET, M.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R. M. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. **Science**, v. 276, p. 2024-2027, Jun. 1997.
- BORGES, M. M.; MELLO, D. A.; TEIXEIRA, M. L. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) with *Trypanosoma cruzi*. **Revista Saúde Pública**, Brazil, v. 16, n. 4, p. 233-243, Aug. 1982.
- BOCCA, A. L.; HAYASHI, E. E.; PINHEIRO, A. G.; FURLANETTO, A. B.; CAMPANELLI, A. P.; CUNHA, F. Q.; FIGUEIREDO, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **Journal of Immunology**, United States, v. 161, n. 6, p. 3056-3063, Sep. 1998.
- BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, United States, v. 6, n. 2, p. 89-117, Apr. 1993.
- BURGER, E.; VAZ, C. A. C.; SANO, A.; CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; XIDIEH, C. F.; KASHINO, S. S.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, United States, v. 55, n. 4, p. 391-398, Oct. 1996.
- CALICH, V. L. G.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 66, n. 3, p. 175-177, Feb. 1978.
- 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**, England, v. 66, p. 585-594, Oct. 1985.
- CALICH, V. L.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 5, p. 615 – 623, Jan. 1998.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infection and immunity**, United States, v. 63 n. 5, p. 1777-1783, May 1995.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L.M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, Washington, United States, v. 66, n. 2, p. 800-806, Feb. 1998.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L.M.; COSTA, T. A.; MENGEL, J. O.; XIDIEH, C. F.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Depletion of CD8⁺ T Cells in vivo impair host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, United States, v. 68, n. 1, p. 352-359, Jan. 2000.

CARROLL, D. S.; MILLS, J. N.; MONTGOMERY, J. M.; BAUSCH, D. G.; BLAIR, P. J.; BURANS, J. P.; FELICES, V.; GIANELLA, A.; IIHOSHI, N.; NICHOL, S. T.; OLSON, J. G.; ROGERS, D. S.; SALAZAR, M.; KSIAZEK, T. G. Hantavirus pulmonary syndrome in Central Bolivia: relationships between reservoir hosts, habitats, and viral genotypes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, United States, v. 72, n. 1, p. 42-46, Jan. 2005.

CHEQUER-BOU-HABIBI, D; OLIVEIRA-NETO, M. P.; FERREIRA DA CRUZ, M. F.; GALVÃO-CASTRO, B. The possible role of circulating immune complexes in the deficiency of cell mediated immunity in paracoccidioidomycosis, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brazil, v. 22, n. 2, p. 205-212, 1989.

COELHO, K. I. R.; DEFAVERI, J.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; PERAÇOLI, M. T. S. Experimental paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 87-106.

DOST, C. K.; SARAIVA, J.; ZENGRAF, U.; MONESI, N.; ENGEL, W.; ABUQUERQUE, S. Is nitric oxide involved in the tolerance of *Calomys callosus* as a reservoir host towards *Trypanosoma cruzi* infection? **Journal of Infection**, v. 52, p. 49-55, 2006.

FAVORETO-JÚNIOR, S.; FERRO, E. A. V.; CLEMENTE, D.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 93, n. 1, p. 103-107, Jan/Feb. 1998.

- FAZIOLI, R. A.; SINGER-VERMES, L. M.; KASHINO, S. S.; BURGER, E.; FRANCO, M. F.; MOSCARDI-BACCHI, M.; CALICH, V. L. G. Delayed-type hypersensitivity response in na isogenic murine model of paracoccidioidomycosis. **Mycopatologia**, Netherlands, v. 126, n 3, p. 137-146, Jun. 1994.
- IABUKI, K; MONTENEGRO, M. R. Experimental paracoccidioidomycosis in the syrian hamster: Morphology, ultrastructure and correlation of lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. **Mycopathologia**, Netherlands, vol 67, n. 3, p. 131-141, Jul. 1979.
- KASHINO, S. S.; CALICH, V. L. G.; BURGER, E.; SINGER-VERMES, L. M. *In vivo* and *in vitro* characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathologia**, v. 92, p. 173-178, Dec. 1985.
- KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L. H.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; SINGER, L. M.; CALICH, V. L. G. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection Is Linked to a Preferential Th1 Immune Response, Whereas Susceptibility Is Associated with Absence of IFN-gamma Production. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 20, n. 1, p. 89-97, 2000.
- LENZI, J. A.; MOTA, E. M.; PELAJO-MACHADO, M.; PAIVA, R. A.; LENZI, H. L. *Calomys callosus*: an alternative model to study fibrosis in schistosomiasis mansoni. The pathology of the acute phase. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 90, n. 2, p. 311-318, Mar/Apr. 1995.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951.
- MARQUES, S. A.; FRANCO, M. F.; MENDES, R. P.; SILVA, N. C.; BACCILI, C.; CURCELLI, E. D.; FERRACIN, A. C.; OLIVEIRA, C. S.; TAGLIARINI, J. V.; DILON, N. L. Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic area of Botucatu (São Paulo-Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brazil, v. 25, n. 2, p. 87-92, Mar/Apr. 1983.
- McEWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PATIÑO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, England, v. 25, n 3, p. 165-175, Jun. 1987.
- MELLO, D. A.; TEIXEIRA, M. L. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) with *Leishmania donovani chagasi* (Laison, 1982). **Revista Saúde Pública**, Brasil, v. 18 n. 4, p. 337-341, Aug. 1984.

- MICHALANY, J. Técnica histológica em anatomia patológica. Editora Pedagógica e Universitária, 1980.
- MONTENEGRO, J. Acerca da inoculabilidade da blastomicose no Brasil. **Brasil Médico**, Brasil, v. 41, p. 808-12, 1927.
- MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M., Pathology. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 87-106.
- NEGRONI, P. E. *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente em el suelo argentino. **Prensa Medica Argentina**, Argentina, v. 53, p. 2831-2832, 1966.
- NEVES, A. R.; MAMONI, R. L.; ROSSI, C. L.; CAMARGO, Z. P.; BLOTTA, M. H. S. L. Negative Immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, United States, v. 10, n. 5, p. 802-807, Sep. 2003.
- RAY, M. K.; DEVI, K. U.; KUMAR, G. S.; SHIVAJI, S. Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1918 – 1923, 1992.
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, England, vol. 23, n. 5, p. 323-334, Oct. 1985.
- SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract. **Journal of Immunology**, United States, v. 139, n. 9, p. 221-227, Nov. 1987.
- SILVA-VERGARA M. L.; MARTINEZ R.; CHADU A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; MAFFEI, C. M. L. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, England, v. 36, n. 1, p. 37-42, Feb. 1998.
- VILANI-MORENO, F.; FECCHIO, D.; DE MATTOS, M. C; MOSCARDI-BACCHI, M.; DEFAVERI, J.; FRANCO, M. Study of pulmonary experimental paracoccidioidomycosis by analysis of bronchoalveolar lavage cells: resistant vs. Susceptible mice. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 141, n. 2, p. 79-91, Feb. 1998.