

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas

**Paracoccidioidomicose: estudo
experimental em *Calomys callosus***

ALCEU LUIZ CAMARGO VILLELA BERBERT

Uberlândia
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas

Paracoccidioidomicose: estudo experimental em *Calomys callosus*

Tese apresentada ao Colegiado do Programa
de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor.

ALCEU LUIZ CAMARGO VILLELA BERBERT

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia

Uberlândia
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B484p Berbert, Alceu Luiz Camargo Villela, 1960-
Paracoccidioidomicose : estudo experimental em *Calomys callosus* /
Alceu Luiz Camargo Villela Berbert. – Uberlândia, 2010.
106 f.: il.
Orientador: Adriano Mota Loyola.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Paracoccidioidomicose - Teses. 2. *Paracoccidioides brasiliensis*
- Teses. 3. *Calomys callosus*. I. Loyola, Adriano Mota. II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616.992.288.4

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alceu Luiz Camargo Villela Berbert

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Imunologia e Parasitologia.

Uberlândia, 15 de janeiro de 2010.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

Prof^a. Dr^a. Sônia Antunes de Oliveira Mantese

Prof^a. Dr^a. Denise Bertolucci Rocha Rodrigues

Prof^a. Dr^a. Tânia Machado de Alcântara

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Dedico este trabalho à minha família, especialmente minha esposa Ana Paula, companheira em todos os momentos, presença constante, grande motivadora, a quem agradeço pela compreensão pelos momentos de ausência. Aos meus amados pais Alceu e Clélia pela abnegação, exemplo e amor. Aos meus filhos Mateus e Victor Hugo, razão deste esforço.

*“Vai para tua casa, para os teus. Anuncia-
lhes tudo o que o Senhor te fez e como teve
compaixão de ti.”*

Mc.5:19b

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, **Alceu Berbert**, meu agradecimento especial, pela presença constante, exemplo ético e moral, ensinando pelo exemplo.

Ao Doutor **Adriano Mota Loyola**, pela oportunidade, pelo exemplo de seriedade e dedicação, acima de tudo um amigo.

À Doutora **Sônia Antunes de Oliveira Mantese** pelo grande apoio ajudando grandemente na concretização deste projeto.

Ao Doutor **José Roberto Mineo**, pelas palavras de constante motivação e constante orientação.

À Doutora **Margarete Leitão Genari Cardoso**, pela obtenção do *P. brasiliensis* e auxílio na inoculação dos animais.

Ao **Tomás Aquino Moreira**, pela semeadura fúngica, leitura dos exames micológicos diretos e contagem das unidades formadoras de colônias.

Ao Doutor **Arnaldo Moreira** pela orientação e ajuda na documentação fotográfica das lâminas histopatológicas.

A todos os funcionários da Patologia Bucal da Universidade Federal de Uberlândia, especialmente à **Ângela Maria Pereira** e **Débora Fagundes**, pela prontidão.

Às minhas colegas **Gabriele Garcias Faria** e **Maria Margarida N. D. Silva** pela ajuda nas diversas etapas deste trabalho.

Aos Doutores **Marcelo Emílio Beletti** e **Tiago Wilson Patriarca Mineo** pelas sugestões para melhoria deste trabalho.

A todos os colegas do Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, **José Joaquim Rodrigues**, **Lilian Emiko Kato**, pela cobertura nas atividades de Ambulatório.

Aos secretários **Lucileide de Freitas**, **Lucélia da Costa Assis** e **Max Aor Marques**, pela assistência.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/Sn	Linhagem de camundongos resistentes à infecção
ANOVA	Análise de variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
B10.A	Linhagem de camundongos susceptíveis à infecção
BSA	Soro albumina bovina
d.p.i.	Dias após infecção
DHT	Resposta celular tardia
DO	Densidade óptica
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito-monócito
gp	Glicoproteína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-Eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IE	Índice Elisa
IFN- γ	Interferon γ
Ig	Cadeia pesada da imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG2	Imunoglobulina G subclasse 2
IgG2a	Imunoglobulina G subclasse 2a
IgG3	Imunoglobulina G subclasse 3
IgG4	Imunoglobulina G subclasse 4
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
KDa	kilodaltons
kHz	Quilohertz

LT	Linfotoxinas
M	Molar
MØ	Macrófagos
mg/ml	Miligrama/Mililitro
MHC-I	Molécula do complexo principal de histocompatibilidade classe I
MHC-II	Molécula do complexo principal de histocompatibilidade classe II
MIF	Fator migratório inibidor
ml	Mililitro
mm	Milímetro
N	Normal
NK	Célula exterminadora natural (<i>Natural Killer</i>)
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
OKT4	CD4
OKT8	CD8
OPD	Orto-fenilenodiamina
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb18	Cepa virulenta do fungo <i>P. brasiliensis</i>
PBMC	células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 (<i>Polyoxyethylene-sorbitan nonolaurate</i>)
PBS-TM	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e de Molico
PCM	Paracoccidioidomicose
pH	Potencial hidrogeniônico
PMN	Leucócito polimorfonuclear
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
T.A.	Temperatura ambiente
TCR	Complexo receptor da célula T
TGF	Fator de crescimento transformador
TGF-β	Fator de crescimento e transformação β

Th1 Linfócito	T <i>helper</i> 1
Th2 Linfócito	T <i>helper</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UFC	Unidades formadoras de colônias
x <i>g</i>	Veze a gravidade
$\mu\text{g/ml}$	Micrograma/Mililitro
μl	Microlitro
μm	Micrômetro

LISTA DAS ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Escala semi-quantitativa empregada na avaliação da quantidade de colágeno tipo I presente nas lesões teciduais. Ausente (A); positivo + (B); moderadamente positivo ++ (C); fortemente positivo +++ (D) (Objetiva 40x).....40
- Figura 2.** Escala semi-quantitativa empregada na avaliação da quantidade de colágeno tipo III, presente nas lesões teciduais. Ausente (A); positivo + (B); moderadamente positivo ++ (C); fortemente positivo +++ (D) (objetiva 40x).....41
- Figura 3.** Diagrama representativo da metodologia de contagem dos fungos dentro dos granulomas encontrados nos tecidos 44
- Figura 4.** Aspectos micromorfológicos de formas inviáveis de *P. brasiliensis* na vida parasitária encontrada nos animais infectados experimentalmente. Coloração de Gomori-Grocott (Objetiva de 40x).....45
- Figura 5.** Curva de sobrevivência para os grupos de animais estudados com $0,6 \times 10^5$ leveduras de *P. brasiliensis*, obtida ao longo de 15 meses de observação.....47
- Figura 6.** Níveis dos anticorpos IgM e IgG específicos para o *P. brasiliensis* expressos em Índice ELISA (IE). *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn foram infectados intraperitonealmente com $0,6 \times 10^5$ leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*. Amostras de soro foram coletadas aos 7, 15, 30, 60, 90 e 120 d.p.i.. Valores são indicados como média $\pm$ erro padrão da média. A linha pontilhada indica o valor para o *cut-off* da reação (IE > 1,2). Letras diferentes acima das barras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos dentro do mesmo período ($p < 0,05$). Os símbolos *, # e + indicam aumento estatisticamente significativo dos níveis de anticorpos, em relação aos 7 d.p.i., nos *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn respectivamente ($p < 0,05$).....49
- Figura 7.** Aspecto histológico das lesões inflamatórias observadas no tecido pulmonar de *Calomys callosus*, conforme a cronologia do experimento. (A): aos sete d.p.i., a maior parte do parênquima pulmonar (*lado direito da linha*) foi difusamente permeado pelo exsudato (Objetiva: 4x, coloração HE). (B): detalhe do exsudato inflamatório mostrando histiócitos e neutrófilos permeando o tecido conectivo do septo interalveolar (Objetiva: 40x, coloração HE). (C): aos 30 d.p.i., lesão granulomatosa organizada(*) (Objetiva: 10x, coloração HE). (D): detalhe do granuloma com a presença de fungos visualizados dentro de células de Langhans (*seta*) (Objetiva: 40x, coloração HE). (E): aos 90 d.p.i., substituição de todo o parênquima pulmonar por massas coalescentes de inflamação granulomatosa (♦) invadindo e destruindo os bronquíolos (*seta*)(Objetiva: 10x, coloração HE). (F) mesmo período de tempo, mostrando inflamação granulomatosa com áreas de necrose (♦) e massas de *P. brasiliensis* (*seta*)(Objetiva: 20x, coloração HE). Inserção com maior detalhe: *P. brasiliensis* na sua forma morfológica característica (Objetiva: 40x, coloração Grocott).....53
- Figura 8.** Aspecto histológico das lesões inflamatórias observadas no tecido hepático de *Calomys callosus*, conforme a cronologia do experimento. (A): aos sete d.p.i., presença de infiltração granulomatosa (♦) acometendo o parênquima hepático, células gigantes (+) com fungos em seu interior (*seta*)(Objetiva: 40x, coloração HE). (B): aos 15 d.p.i., inflamação granulomatosa bem organizada (♦) apresentando células gigantes com fungos em seu interior (*seta*), circundadas por macrófagos, plasmócitos, linfócitos, e eosinófilos («) (Objetiva: 40x, coloração HE). (C): aos 30 d.p.i., lesão granulomatosa organizada (♦), com células gigantes multinucleadas contendo maior número de fungos em seu interior (*seta*), neutrófilos, eosinófilos e plasmócitos presentes (<)(Objetiva: 40x, coloração HE). (D): aos 60 d.p.i., granulomas ocupando grandes áreas do parênquima hepático (♦) (Objetiva: 4x, coloração HE). (E): aos 90 d.p.i., inflamação granulomatosa (♦) mostrando detalhes das células gigantes com grande número de fungos em seu interior (*seta*) (Objetiva: 100x, coloração HE). (F) aos 120 d.p.i., mostrando inflamação granulomatosa (♦), além de área necrótica ocupando grande extensão do parênquima hepático (‡) (Objetiva: 20x, coloração HE)..... 54

Figura 9. Aspecto histológico das lesões inflamatórias observadas no tecido esplênico de *Calomys callosus*, conforme a cronologia do experimento. (A): aos 30 d.p.i., tecido esplênico evidenciando a presença de granulomas (◆) contendo células gigantes (+) e mononucleares, com fungos em abundância (seta) (Objetiva: 10x, coloração HE). (B): aos 30 d.p.i., detalhes do granuloma mostrando neutrófilos formando microabscessos (circulo) (Objetiva: 100x, coloração HE). (C): aos 60 d.p.i., lesão granulomatosa com área de necrose central (‡). (Objetiva: 20x, coloração HE). (D): aos 60 d.p.i., granuloma composto de células gigantes contendo fungos em seu interior (seta), além de histiócitos, linfócitos, neutrófilos e plasmócitos (Objetiva: 100x, coloração HE). (E): aos 90 d.p.i., inflamação granulomatosa (◆) acometendo grande extensão do baço, com áreas de necrose (‡)(Objetiva: 4x, coloração HE). (F) aos 120 d.p.i., mostrando inflamação granulomatosa confluyente substituindo o parênquima esplênico, com a presença de eosinófilos (◀)(Objetiva: 40x, coloração HE).....55

Figura 10. Percentuais médios de áreas acometidas pelos granulomas nos fragmentos de pulmões (A), fígado (B) e baço (C), provenientes dos diferentes animais estudados, seguindo a cronologia do experimento (em dias). Os símbolos * e ≠ demonstram haver diferença estatística entre o *C. callosus* e os camundongos A/Sn e B10.A, respectivamente. O símbolo ± demonstra haver diferença estatística entre o camundongo B10.A e o A/Sn. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos dentro do mesmo período ($p < 0,05$).....58

Figura 11. Comparativo entre a quantidade de colágenos tipos I e III nos camundongos A/Sn, seguindo a cronologia do experimento. (A) fígado, (B) baço.....60

Figura 12. Comparativo entre a quantidade de colágenos tipos I e III nos camundongos B10.A, seguindo a cronologia do experimento. (A) pulmões, (B) fígado, (C) baço.....61

Figura 13. Comparativo entre a quantidade de colágenos tipos I e III nos *C. callosus*, seguindo a cronologia do experimento. (A) pulmões, (B) fígado, (C) baço.....62

Figura 14. Análise das colorações de reticulina Gomori e tricrômico de Masson nos tecidos estudados, para quantificação e análise semiquantitativa dos colágenos III e I, respectivamente. Percentuais médios dos escores obtidos para os colágenos III e I nos granulomas nos fragmentos de pulmões (A), fígado (B) e baço (C), provenientes dos diferentes animais estudados, observados em dois períodos (inicial e final) do experimento (em dias).....63

Figura 15. Valores percentuais de positividade para *P. brasiliensis*, cepa Pb18, obtidos por meio de exame micológico direto, para cada órgão estudado, distribuídos segundo os animais testados em seis períodos de observação distintos. (A) Todos os órgãos (total), (B) pulmões, (C) fígado (D), baço. O símbolo * demonstra haver diferença estatística entre *C. callosus* e o camundongo A/Sn.....65

Figura 16. Valores percentuais de positividade para *P. brasiliensis*, cepa Pb18, obtidos por meio de exame micológico direto, para cada órgão estudado, distribuídos segundo os animais testados em dois períodos de observação distintos. (A) Todos os órgãos (total), (B) pulmões, (C) fígado (D), baço.....66

Figura 17. Proporção de culturas positivas para *P. brasiliensis*, cepa Pb18, expressas em valores percentuais, distribuídos segundo os órgãos avaliados nos diferentes grupos de animais testados.....67

Figura 18. Proporção de culturas positivas para *P. brasiliensis*, cepa Pb18, expressas em valores percentuais, distribuídos segundo os órgãos avaliados nos diferentes grupos de animais testados: camundongos A/Sn (A), camundongos B10.A (B) e *C. callosus* (C), nos seis períodos de análise (em dias).....68

Figura 19. Percentuais de órgãos positivos para *P. brasiliensis*, cepa Pb18 por animal, em todos os órgãos conjuntamente (A), nos pulmões (B), no fígado (C), e no baço (D), obtidos por meio da cultura, distribuídos segundo dois períodos de observação (em dias) do experimento.....69

.Figura 20. Contagem média de UFC/mg de tecido obtida nos períodos inicial (7 a 30 dias) e final (60 a 120 dias) do experimento. O *C. callosus* mostrou número médio maior de UFC/mg de tecido, em todos os órgãos na primeira metade do experimento, exceto no fígado e no baço em que valores semelhantes foram encontrados, entretanto somente na metade final do experimento. Valores inexpressivos foram encontrados nos pulmões dos camundongos B10.A e A/Sn.....71

Figura 21. Percentual de fungos viáveis identificado nos órgãos avaliados dos diferentes grupos de animais testados, em função da cronologia do experimento. (A) pulmões, (B) fígado, (C) baço. Os símbolos * e ≠ demonstram haver diferença estatística entre o *C. callosus* e os camundongos A/Sn e B10.A, respectivamente. O símbolo ± demonstra haver diferença estatística entre o camundongo B10.A e o A/Sn. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos dentro do mesmo período ($p < 0,05$).....73

Figura 22. Proporção de brotamentos tricrômico de Masson entre os fungos viáveis. Os símbolos * e ≠ demonstram haver diferença estatística entre o *C. callosus* e os camundongos A/Sn e B10.A, respectivamente. O símbolo ± demonstra haver diferença estatística entre o camundongo B10.A e o A/Sn ($p < 0,05$).....75

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Características imunopatológicas evidenciadas na paracoccidioomicose experimental em diferentes linhagens de camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn) infectados com o isolado virulento Pb18 (CALICH et al., 1994; MURPHY et al., 1994).....	28
Quadro 2. Perfil das citocinas na PCM experimental usando camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn), infectados via intraperitoneal, com 5×10^6 leveduras, com isolado virulento de <i>P. brasiliensis</i> , Pb18.....	30
Tabela 1. Distribuição dos tipos de infiltrado granulomatoso predominantes nos animais testados em função de cada órgão examinado.....	56
Tabela 2. Valores de UFC/mg de tecido obtidos em todos os tecidos conjuntamente, em cada grupo de animais estudados, conforme cronologia do experimento. O símbolo * indica diferença estatística significativa entre <i>C. callosus</i> e os camundongos A/Sn e B10.A.....	70

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Paracoccidioidomicose	17
1.1.1	Características da infecção e do fungo	17
1.1.2	Aspectos relativos à virulência dos isolados do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	18
1.1.3	Resposta do hospedeiro	19
1.1.4	Formas clínicas de apresentação da paracoccidioidomicose	26
1.2	Modelos experimentais utilizados no estudo da paracoccidioidomicose	27
1.2.1	<i>Calomys callosus</i> como modelo experimental de doenças infecciosas	31
2	OBJETIVOS	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Animais	34
3.2	Obtenção do inóculo de <i>P. brasiliensis</i>	34
3.2.1	Cultivo de leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	34
3.3	Desenvolvimento da infecção experimental	35
3.3.1	Inoculação dos animais	35
3.3.2	Sacrifício dos animais e coleta das amostras	35
3.4	Avaliação da resposta humoral	36
3.4.1	Preparo de antígeno solúvel de <i>P. brasiliensis</i> (AgPb)	36
3.4.2	Ensaio Enzimático de Imunoabsorbância (ELISA) para identificação e quantificação de IgM e IgG específica anti- <i>P. brasiliensis</i>	37
3.5	Avaliação histopatológica da infecção experimental	38
3.5.1	Obtenção dos cortes histológicos	38
3.5.2	Avaliação morfológica qualitativa da resposta inflamatória	38
3.5.3	Avaliação morfológica semiquantitativa	39
3.5.4	Avaliação semiquantitativa da fibrose nas lesões inflamatórias causadas pelo <i>P. brasiliensis</i>	39
3.7	Pesquisa de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> por meio da pesquisa direta, cultura e contagem de unidades formadoras de colônias	41
3.8	Avaliação do <i>P. brasiliensis</i> nas secções teciduais	43
3.8.1	Contagem de fungos nos tecidos	43
3.9	Normas de biosegurança e considerações éticas	45
3.10	Análise dos resultados	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Avaliação da mortalidade	47
4.2	Avaliação da resposta humoral através da quantificação da IgM e da IgG	48
4.3	Análise histopatológica da infecção pela coloração de hematoxilina e eosina	50
4.4	Avaliação da fibrose	59
4.5	Análise microbiológica	64
4.5.1	Pesquisa direta de fungos	64
4.5.2	Cultura para <i>P. brasiliensis</i>	66
4.5.3	Contagem de unidades formadoras de colônias	70
4.6	Avaliação semiquantitativa dos fungos nas secções teciduais	72
4.6.1	Fungos viáveis	72
4.6.2	Brotamentos fúngicos viáveis	74
5	DISCUSSÃO	76
6	CONCLUSÕES	90
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
	ANEXO I	106

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo termodimórfico causador da paracoccidioidomicose, a mais prevalente micose profunda e sistêmica da América Latina, ocorrendo principalmente no Brasil. *Calomys callosus*, Rengger 1830 (Rodentia, Cricetidae), é um roedor selvagem encontrado no Brasil Central, que tem se mostrado susceptível a infecção experimental pelo *P. brasiliensis*. O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos clínico-patológicos desta infecção em *C. callosus* inoculados com $0,6 \times 10^5$ leveduras de *P. brasiliensis*, cepa Pb18, comparando-o aos camundongos A/Sn e B10.A. Cinco animais de cada grupo foram sacrificados aos 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias pós inóculo (d.p.i.), e fragmentos dos pulmões, fígado e baço foram processados para exame micológico direto, cultura em Mycosel, contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), e para exame histopatológico, através das colorações de hematoxilina e eosina, reticulina de Gomori, tricrômico de Masson, metenamina prata de Gomori-Grocott. Sangue foi coletado do plexo venoso orbital para realização de ELISA e dosagem de IgG e IgM específicos anti-*P. brasiliensis*. Outro grupo, contendo oito animais de cada espécie, foi usado para observação da sobrevida pós-infecção. A mortalidade foi maior em *C. callosus*, com todas as mortes ocorrendo até os 118 d.p.i. Os níveis de IgM mostraram tendência a elevação nos três grupos avaliados. Os camundongos B10.A e *Calomys callosus* mostraram tendência a elevação dos níveis de IgG, observada durante o período experimental. Lesões granulomatosas foram observadas nos órgãos analisados dos três grupos de animais testados, constituídos por células gigantes tipo Langhans, células epitelióides, macrófagos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e necrose. Nos pulmões os granulomas foram mais precocemente observados em *Calomys callosus* (15 d.p.i.), evoluindo com maior presença de necrose no final do experimento. O fígado mostrou granulomas já aos sete d.p.i. em todos os animais, sendo mais necrosante em *Calomys callosus*. Padrão semelhante foi observado também para o baço. Em todos os órgãos analisados, as lesões granulomatosas foram mais extensas em *Calomys callosus* no pulmão e no baço, ocupando aos 90 d.p.i. respectivamente, 90% e 70% dos parênquimas examinados, sendo mais reduzida no fígado. Em relação à avaliação da deposição diferencial de colágeno, observou-se que as lesões em *Calomys callosus* e B10.A tiveram predominantemente deposição de colágeno tipo III. No fígado e baço dos animais B10.A identificou-se deposição crescente de colágeno tipo I, sem entretanto superar os níveis observados para o colágeno tipo III, até o final do experimento. Nos camundongos A/Sn os níveis de colágeno depositados foram mais baixos, comparativamente aos outros animais, não sendo aparentemente identificados nas lesões pulmonares, mostrando tendência a aumento de deposição de colágeno tipo I, nos períodos finais do experimento, verificado no fígado. *Calomys callosus* apresentaram maior número de UFC nos três órgãos estudados, especialmente nos pulmões. As proporções de fungos viáveis identificadas nos diferentes órgãos de *Calomys callosus* foram maiores que aquelas observadas nos outros animais, tendendo a aumento no fígado e pulmões, com o transcorrer da infecção, ocorrendo o mesmo em relação aos brotamentos fúngicos. Conclusões: A infecção experimental produzida pela inoculação de $0,6 \times 10^5$ leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, cepa virulenta Pb18 produziu a doença no *C. callosus*, que sob o ponto de vista clínico-patológico foi mais grave e disseminada do que a observada nos modelos murinos de susceptibilidade e de resistência, sobretudo nos pulmões. *Calomys callosus* pode ser considerado como modelo animal alternativo no estudo da paracoccidioidomicose infecção.

Palavras-chave: *Calomys callosus*, paracoccidioidomicose, infecção experimental, *Paracoccidioides brasiliensis*, resposta humoral, fibrose, granuloma.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is one of the most prevalent systemic mycosis in Latin America, including Brazil. It is caused by chronic infection with *Paracoccidioides brasiliensis*, a thermally dimorphic fungus. *Calomys callosus*, Rengger 1830 (Rodentia, Cricetidae), is a wild rodent found in Central Brazil and has been shown to be susceptible to experimental infection with *P. brasiliensis*. The objective of this work was to study the clinicopathological aspects of this experimental infection in *Calomys callosus* infected with 0.6×10^5 yeast isolated from *P. brasiliensis* (strain Pb18) and to compare it with two others susceptible animals: A / Sn and B10.A mice. For this, five animals from each group were sacrificed at 7, 15, 30, 60, 90 and 120 days post inoculation (d.p.i.). Samples of the lung, liver and spleen were processed for mycological examination to determine the number of counts of colony forming units (CFU) as well as for histopathological examination using hematoxylin and eosin (H&E), reticulin Gomori, trichromic (Masson), and Grocott's stains. Blood samples from each mice were collected from orbital venous plexus and used to detect IgG and IgM specific anti-*P. brasiliensis* by ELISA. To determine of survival post-infection, others eight animals from each group was used. The mortality rate was higher in *C. callosus* than A / Sn and B10.A mice, being all deaths occurring up to 118 d.p.i. IgM levels tended to rise in all groups, but in B10.A mice and *Calomys callosus* groups, the level of IgG was significantly elevated during the all experimental period. Granulomatous lesions were observed in the roots of all animal groups and all granulomas were composed by Langhans giant cells, epithelioid cells, macrophages, lymphocytes, plasma cells, eosinophils, and necrosis. In *C. callosus*, the development of granulomas in lung was observed with 15 d.p.i. and exhibited extensive necrosis, especially at the end of the experiment. The presence of granulomas in liver was detected with seven d.p.i. in all animals, but the extensive necrosis was observed especially in samples of *Calomys callosus*. Similar pattern was also observed in spleen samples. In addition, in *Calomys callosus* the granulomatous lesions were more extensive in lung and spleen than in liver. The assessment of differential deposition of collagen showed that in *Calomys callosus* and B10.A the lesions were predominantly composed by collagen type III, although in B10.A animals a predominance of collagen type I was observed without, however, exceed the levels observed for collagen type III at the end of the experiment. On the other hand, the levels of collagen were lower in A / Sn mice than *Calomys callosus* and B10.A. and, apparently, it was not identified in the lung. On the other hand, in this group was observed a tendency to increase the deposition of collagen type I in the liver at the end of experiment. *Calomys callosus* showed a higher number of CFU in the three organs studied, especially in the lungs. The proportion of viable fungi in liver, lung and spleen was always higher in *Calomys callosus* than A / Sn and B10.A and tend to increase in liver and lung during the infection progression with the presence of budding fungi. Conclusions: Ours results indicate that the experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) was more aggressive and widespread in *Calomys callosus* than A/Sn and B10, especially in the lung. So, *Calomys callosus* can be considered as an alternative animal model in studies of paracoccidioidomycosis infection.

Keywords: *Calomys callosus*, paracoccidioidomycosis, experimental infection, *Paracoccidioides brasiliensis*, humoral response, fibrosis, granuloma.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Paracoccidioidomicose

1.1.1 Características da infecção e do fungo

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica humana, granulomatosa, produzida por fungo dimórfico denominado *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), pertencente à família *Moniliaceae*, ordem *Moniliales*, classe *Hyphomycetes* (MARTINEZ, 2004). Apresenta distribuição geográfica restrita à América Latina tendo sido identificada na maioria de seus países, sobretudo na Venezuela, Colômbia, Equador, Argentina, e principalmente no Brasil (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A doença acomete principalmente a população rural, de baixo nível sócio-econômico, com maior predileção por etilistas crônicos e mal-nutridos. No homem a principal via de entrada do *P. brasiliensis* é a pulmonar, sendo excepcional sua inoculação através do tegumento cutâneo, gerando a doença (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

Fatores geográficos como vegetação tropical e subtropical, locais junto a galerias de florestas, às margens de rios, solo ácido, com temperatura oscilando entre 17°C e 24°C, altitude até 1.500 metros e índice pluviométrico entre 500 a 2.500 mm/ano estão correlacionados com a presença da doença no homem, ocorrendo mais frequentemente em homens com atividades relacionadas ao solo, principalmente agricultores e lenhadores. No Brasil, estima-se que a taxa de incidência anual seja de 3 por 100.000 habitantes, e que entre as micoses sistêmicas, seja a que apresente a maior mortalidade (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

Presumivelmente micélios e conídios crescem em locais com solo úmido, ricos em matéria orgânica, com pouca variação na temperatura ambiente, (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A presença de *P. brasiliensis* em materiais contaminados tais como ração para cães e fezes de pingüim (*Pygoscelis adeliae*) tem sido descrita, assim como em tatus (*Dasypus novemcinctus*) naturalmente infectados, capturados em área endêmica no estado de Minas Gerais (ENDO et al., 2004; FERREIRA et al., 1990; SILVA-VERGARA et al., 2000). A forma miceliana (forma “M”) cresce lentamente à temperatura ambiente, entre 20 e 30 dias, após semeadura em ágar Sabouraud, formando colônias brancas algodonosas, aderentes ao meio de

cultura (NEGRONI, 1993). Ao exame microscópico direto, são observados filamentos finos, septados, com diâmetro entre 2 e 3 μ m, evidenciando numerosos esporos terminais ou intercalares, de tamanhos variados. Em ágar de infusão cérebro/coração, à 37°C, as colônias assumem aspecto leveduriforme ou cerebriforme, amareladas, após uma semana da semeadura. Neste momento, ao exame microscópico, os fungos aparecem como células arredondadas, com parede única e membrana dupla e refringente, medindo entre 5 e 25 μ m no seu maior diâmetro, isoladas ou com gemulação múltipla (“roda de leme”), algumas apresentando tubo germinativo, forma esta denominada leveduriforme (forma “L”), sendo encontrada nos tecidos parasitados (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

1.1.2 Aspectos relativos à virulência dos isolados do *P. brasiliensis*

Estudos bioquímicos e ultra-estruturais mostram que a parede celular da forma miceliana é composta por uma única camada de células com espessura de 80 a 150nm, apresentando quitina e β -glucana entremeadas. A forma leveduriforme apresenta parede celular com três camadas, duas elétron-densas separadas por uma zona clara. A superfície interna possui quitina e β -glucana, enquanto que a superfície externa é composta por α -glucana, resistente a hidrólise pelos macrófagos. A virulência fúngica correlaciona-se com os níveis de α -1,3-glucana, e com a presença de galactomanana. Outra molécula denominada lactomanana, também imunogênica, está presente na superfície externa da parede celular de micélios e leveduras, entretanto cepas de *P. brasiliensis*, altamente virulentas, apresentam baixos níveis de lactomanana, além de altos níveis de α -1,3 glucana (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

O fungo apresenta uma glicoproteína, de peso molecular 43kDa, denominada gp43, que se liga a laminina, inibindo a função macrofágica, e a expressão do MHC-II, evidenciando papel relevante no mecanismo de escape do fungo (FERREIRA; ALMEIDA, 2006). Representa o principal componente antigênico, reconhecido no soro de 100% dos pacientes com PCM, estando em altas concentrações na forma aguda (juvenil), e desaparecendo do sangue circulante em situações em que a evolução clínica seja favorável ao hospedeiro, sendo, por isso, considerada como importante “marcador sorológico” para diagnóstico, e seguimento de pacientes com PCM sob tratamento medicamentoso, (MARTINEZ, 2004).

Diversificados graus de virulência, correlacionados a diferentes isolados do *P. brasiliensis*, são atribuídos a vários fatores influenciadores, peculiares do hospedeiro, tais

como sexo, idade e condições do sistema imunológico; além de outros inerentes ao próprio fungo, como diversidade genômica (VAZ et al., 1992). Receptores hormonais, encontrados em *P. brasiliensis*, têm sido efetivamente demonstrados como determinantes na defesa do hospedeiro contra o parasita, destacando-se os receptores específicos para estradiol, demonstrados no citoplasma do fungo, capazes de reconhecer estrógenos de mamíferos, não ocorrendo o mesmo com outros esteróides, tais como a testosterona. Estudos *in vitro* têm mostrado que os hormônios femininos inibem a transformação da fase miceliana para leveduriforme, justificando a maior incidência da doença no sexo masculino, a partir da fase pré-puberal (FRANCO, 1986).

Estudos experimentais, envolvendo cepas susceptíveis à infecção pelo *P. brasiliensis* (Pb), têm demonstrado que amostras distintas de uma mesma cepa de *P. brasiliensis* variam quanto a sua virulência, imunogenicidade e tropismo, nos diferentes órgãos e sistemas, sofrendo a influência de repiques repetitivos, ao longo de muitos anos, devido a alteração na síntese de α -1,3 glucana (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008). Quatro padrões de virulência têm sido observados em *P. brasiliensis*: isolados fracamente virulentos, denominados Pb265 e IVIC Pb267; intermediários denominados Pb192, IVIC Pb9 e PbSN; virulentos compostos pelo isolado Pb2052; e o isolado altamente virulento, representado pelo Pb18 (KASHINO et al., 1985; SINGER-VERMES et al., 1989). Recentemente outro isolado denominado PB01, considerado altamente virulento, tem sido empregado experimentalmente (FORTES; KIPNIS; JUNQUEIRA-KIPNIS, 2009).

1.1.3 Resposta do hospedeiro (Imunopatogenia)

A dinâmica da infecção na PCM tem se mostrado semelhante à de outras micoses profundas tais como histoplasrose e coccidioidomicose, produzindo doença pulmonar que, conforme a resposta imunológica do paciente, cura-se espontaneamente, dissemina-se para todo o corpo ou progride para processo granulomatoso crônico (CALICH et al., 2008). A sequência de fenômenos celulares relacionados à entrada do fungo no hospedeiro é caracterizada pela formação de edema local, sendo os fungos circundados por polimorfonucleares, que são rapidamente sucedidos por células mononucleares circundando o local, formando supuração central. Após cinco dias, granuloma epitelióide pode ser observado, mostrando supuração central, contendo células fúngicas, circundadas por células epitelióides e

gigantes, passando a adotar características de granuloma frouxo, com numerosas células fúngicas e multiplicação ativa, que conforme o crescimento e coalescência dos granulomas passa a apresentar fibrose (ALVES et al., 2009); ou torna-se compacto, evidenciando agregados de células epitelióides, com poucos fungos, sem sinais de reprodução (MONTENEGRO; FRANCO, 1994).

A imunidade desenvolvida frente às infecções produzidas por parasitas intra ou extracelulares, envolve a ação interligada das respostas imune celular e humoral, precedidas pela imunidade inata (CALICH et al., 2008).

A imunidade inata corresponde à primeira fase da resposta imune, e se baseia em elementos pré-existentes do sistema imune, que interagem diretamente com todos os tipos de microorganismos, levando à sua destruição ou inibição de seu crescimento, não tendo especificidade clonal e não gerando memória específica. A imunidade inata bloqueia a entrada de microorganismos, ou visa sua eliminação. Fazem parte da imunidade inata: as barreiras epiteliais (mecânicas, químicas e microbiológicas), componentes celulares do sistema imune tais como macrófagos e linfócitos especializados, chamados de exterminadores naturais (NK-*natural killer*), e ainda por várias proteínas plasmáticas, tais como as proteínas do sistema complemento (KASHINO, 1997; CALICH et al., 2008). Este tipo de imunidade representa pré-requisito essencial para a resposta imune adaptativa, e diversos elementos da imunidade inata atuam em conjunto, para o controle inicial da multiplicação do patógeno, sendo que a maioria dos mecanismos efetores da imunidade inata se mostram idênticos aos da imunidade adaptativa, ativados em fases posteriores da resposta imune (CALICH et al., 2008). O sistema fagocítico mononuclear representa uma população celular distribuída principalmente no fígado, baço, pulmões e medula óssea, contribuindo para o estabelecimento de mecanismos envolvidos na resistência natural frente a diversos patógenos, atuando tanto como células efetoras, durante a resposta imune adaptativa, como também células apresentadoras de antígenos, durante a resposta imune frente ao *P. brasiliensis* (KASHINO et al., 1985).

Quando o fungo invade o hospedeiro, o sistema complemento é a primeira defesa a ser ativada. Estudos *in vitro* têm demonstrado que esta ativação pelo fungo ocorre pela via alternativa, favorecendo a fagocitose por opsonização dos fungos pela C3b. Componentes do sistema complemento fixam-se sobre o fungo nas lesões teciduais, induzindo efeito lítico sobre o parasita (NOGUEIRA et. al., 1986). Outros produtos deste sistema, C3a, C5a, C567, quimiotáticos para neutrófilos, parecem não influenciar o afluxo destas células para as áreas

lesadas (CALICH et al., 1979), sendo seu efeito protetor na PCM questionado por Burger e colaboradores (1985).

As células NK se desenvolvem na medula óssea e circulam no sangue, usando mecanismo semelhante ao utilizado pelos linfócitos T citotóxicos. São ativadas pelos interferons e citocinas derivadas de macrófagos, contribuindo na defesa inata, limitando o crescimento do *P. brasiliensis*. As células NK são acionadas nas primeiras semanas de infecção, ocorrendo posteriormente queda na sua atividade, associada à depressão da imunidade celular (CALICH; VAZ; BURGER et al., 1998; JANEWAY et al., 2002).

Animais experimentalmente infectados pelo *P. brasiliensis* apresentam acúmulo de neutrófilos nos locais inoculados (DIAS; FIGUEIRA; SOUZA, 2004), mobilizados na tentativa de conter a invasão do fungo. Sua depleção parece estar ligada a aumento na severidade da doença, em camundongos susceptíveis (PINA et al., 2006). Kurita e colaboradores (1999) admitem que o efeito fungistático dos neutrófilos seja potencializado por IFN- γ . Diante do primeiro contato com *P. brasiliensis*, os macrófagos iniciam processo de neutrofilia extravascular, através da liberação de peptídeos quimiotáticos. Infiltração intensa de PMN neutrófilos é vista nos pulmões, na fase aguda da infecção em camundongos por *P. brasiliensis*, contudo estudos mostram que os neutrófilos ingerem leveduras de *P. brasiliensis* através de processo típico de fagocitose (DIAS; FIGUEIRA; SOUZA, 2004), entretanto o fungo sobrevive dentro deles, podendo ainda utilizar os neutrófilos para difundir a infecção a outras células, tais como os macrófagos (SCHAFFNER et al., 1986).

A imunidade adaptativa (específica ou adquirida) é a defesa estimulada por patógenos que invadem os tecidos, sendo conhecidas como celular e humoral (CALICH et al., 2008).

Fazendo parte efetiva da forma de resposta imune celular adaptativa, a resposta inflamatória granulomatosa visa promover a destruição, bloqueio e circunscrição do parasita, prevenindo sua multiplicação (MONTENEGRO; FRANCO, 1994). A formação e eficácia do granuloma relacionam-se à função das células T, sendo a severidade da doença diretamente proporcional à deterioração ou bloqueio da resposta imune celular, diminuindo a capacidade de atuação no bloqueio da multiplicação do fungo, que muitas vezes rompe a barreira inflamatória e se difunde aos tecidos circundantes, formando assim novos focos infecciosos (NASCIMENTO et al., 2008).

A organização e ativação de fagócitos mononucleares separam os granulomas das inflamações crônicas, os quais não estão necessariamente acompanhados por elementos

mononucleares especializados, tais como células epitelióides. Essa coleção focal, mais ou menos compacta e organizada de fagócitos mononucleares e células epitelióides, não necessita estar obrigatoriamente acompanhada de células gigantes multinucleadas ou de elementos acessórios como linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, plasmócitos, mastócitos, fibroblastos e necrose. O desenvolvimento dos granulomas passa por três estágios: 1) nas primeiras 24 horas tem início a formação de infiltrado fagocítico, composto por células mononucleares jovens, 2) entre três a sete dias ocorre maturação e agregação dessas células dentro do granuloma maduro, associado à presença de poucas células gigantes tipo corpo estranho, 3) posterior amadurecimento destas células gerando o granuloma epitelióide. As células gigantes derivam da fusão de fagócitos mononucleares maduros, representando uma característica comum dos granulomas que ocorrem em doenças infecciosas crônicas, como é o caso da PCM (MARIANO, 1995). Morfologicamente as células gigantes multinucleadas são classificadas em células gigantes tipo Langhans, apresentando núcleo circular, perifericamente localizado, e células gigantes tipo corpo estranho, com núcleo espalhado irregularmente através da célula. Fagócitos maduros formam células do tipo corpo estranho, que posteriormente são transformadas em células gigantes tipo Langhans, vistas frequentemente em muitas doenças granulomatosas, entre estas a PCM (ADAMS, 1976; NASCIMENTO et al., 2008).

Michalany e Michalany (1984) definem os granulomas como hiperplasia reacional de macrófagos contra agentes inanimados e microorganismos de baixa virulência. Baseada na morfologia dos granulomas, os tipos polares tuberculóide e não tuberculóide foram descritos. A forma polar tuberculóide segue a lei de Jadassohn-Lewandowsky, onde o agente etiológico está ausente ou escasso (fagocitose completa), e apresenta dois subtipos: tubérculo-símile e sarcóide-símile. Já a forma polar do tipo não tuberculóide não segue a lei de Jadassohn-Lewandowsky, estando o agente etiológico sempre presente, por vezes em número copioso (fagocitose incompleta) e divide-se em dois subtipos: células gigantes e macrófagos persistentes. Na ausência de formação de granuloma compacto *P. brasiliensis* se espalha para múltiplos órgãos através dos sistemas linfático e circulatório, resultando em lesões disseminadas (XIDIEH et al., 1999). O mecanismo que conduz a migração celular para formar e manter o foco granulomatoso não está bem esclarecido, entretanto a participação da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) no recrutamento de células inflamatórias para os pulmões, de camundongos infectados pelo *P. brasiliensis* está envolvida na organização do granuloma e no controle da multiplicação do fungo, e sua expressão depende de INF- γ , TNF- α e IL-12 (MOREIRA et. al., 2006).

As células T *helper* produzem diferentes padrões de citocinas, resultando em funções regulatórias distintas, mostrando resposta Th1, correlacionada a reações de hipersensibilidade tardia, podendo também evidenciar resposta Th2, auxiliando as células B na produção de anticorpos (CANO et al., 1998; CALICH; KASHINO, 1998). Em modelos experimentais de PCM, a presença de IL-2, IFN- γ e da linfotóxina TNF- β tem sido relacionada com a resposta Th1, e estes animais demonstram resistência a infecção. Por outro lado a susceptibilidade está ligada à resposta Th2, havendo produção das citocinas regulatórias IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10, responsáveis pela PCM progressiva (CALICH; KASHINO, 1998).

O TNF- α e o IFN- γ participam na migração e diferenciação do macrófago em células epitelióides e células gigantes, durante a formação de granulomas bem estruturados; de grande importância na resistência contra *P. brasiliensis*. A interação parasita-hospedeiro induz a uma superprodução de TNF- α por parte das células fagocíticas, podendo estar associada a dano tecidual, quando em altas concentrações. A expressão do TGF- β 1 nas lesões fibróticas mucosas e cutâneas, na forma crônica da PCM em regressão, sugere que o TGF- β 1, além dos seus efeitos imunorregulatórios, possa ter também papel na reparação tecidual (PARISE-FORTES et al., 2006).

A interleucina-2 (IL-2) é sintetizada por células T ativadas e representa importante determinante da magnitude da resposta imune. A IL-2 estimula também a síntese de outras citocinas derivadas das células T, tais como IFN- γ , linfotóxicas (LT), e também o crescimento de células NK aumentando sua função citolítica. Juntamente com a IL-12 e TNF- α , a IL-2 age sinergicamente, induzindo a produção de IFN- γ pela célula NK, tendo ação protetora na PCM experimental (CALICH; KASHINO, 1998).

O IFN- γ tem papel fundamental na resistência à infecção por *P. brasiliensis*, e a atividade pró-inflamatória dessa citocina parece ser crucial para a circunscrição de lesões pulmonares. A depleção de IFN- γ promove a disseminação fúngica nos pulmões, fígado e baço; altera o padrão granulomatoso focal nos pulmões, em camundongos B10.A e A/Sn infectados com Pb18, tornando a inflamação difusa, e conduz à formação de granulomas frouxos, com rica presença de fungos, perdendo a capacidade de circunscrever o processo infeccioso, conseqüentemente destruindo a arquitetura pulmonar (CANO et al. 1998).

No decorrer da infecção experimental por *P. brasiliensis* a atividade fungicida do macrófago está relacionada diretamente com a produção de IFN- γ , TNF- α e óxido nítrico (NO) (BRUMMER et al., 1988). O NO é uma importante espécie intermediária reativa de nitrogênio, que, na célula alvo, combina-se com grupos metais e enzimas responsáveis pela

síntese de DNA e ciclo respiratório, levando à morte celular. Este efeito depende da produção da enzima óxido-nítrico-sintetase induzível (iNOS). Embora a iNOS pareça ser essencial para a resistência contra paracoccidioidomicose, alta e continuada produção de NO possivelmente esteja associada com susceptibilidade a doença (ALVES et al., 2009).

A fibrose é uma freqüente e incapacitante seqüela de processos infecciosos, doenças imunes, exposição tóxica a drogas, podendo também resultar de processo criptogênico (FRIEDMAN, 1993). Na sua formação, aumento substancial na produção de citocinas, tais como o TNF- α , TGF- β , são observados (DA SILVA et al., 2009).

Na infecção experimental pelo Pb18, foi documentada em camundongos susceptíveis a presença de lesões disseminadas, não encapsuladas, com grande número de fungos na forma leveduriforme, e fibras colágenas tipo III esparsas, enquanto que nos camundongos resistentes, granulomas em pequeno número, encapsulados, com colágeno tipo I, ou lesões residuais com fungos degenerados são observados (XIDIEH et al., 1999). Estudando a organização estrutural do granuloma, Kerr e colaboradores (1988a) mostraram uma dinâmica vinculada a mudança fenotípica de colágeno tipo III para colágeno tipo I, demonstrando que a formação do colágeno, nos granulomas, aumenta do centro para a periferia. PCM induzida em camundongos Swiss foi caracterizada pelo aumento da formação de granulomas como reflexo do descontrole da proteção. Nestes granulomas, os autores puderam evidenciar fibrose progressiva caracterizada pela presença de colágeno tipos I e III em intensidades semelhantes, sugerindo a existência de diferentes graus de maturação da fibrose, representando mecanismo de defesa do hospedeiro na tentativa de tentar circunscrever a infecção, prevenindo a disseminação do fungo (DA SILVA et al., 2009). A reprodução da doença de Chagas experimentalmente induzida em *C. callosus* tem mostrado regressão espontânea do infiltrado inflamatório, do parasitismo e da fibrose, que ocorre sem qualquer interferência de tratamento específico. (MAGALHÃES-SANTOS; LIMA; ANDRADE, 2002)

Camundongos susceptíveis utilizados na infecção experimental pelo isolado altamente virulento Pb18 desenvolvem muitas lesões, não encapsuladas, com grande número de células leveduriformes e colágeno tipo III distribuídos de modo esparsos, enquanto que os camundongos resistentes produzem poucos granulomas encapsulados com colágeno tipo I, ou lesões residuais tendo a presença de fungos degenerados (XIDIEH et al., 1999).

A fibrose, encontrada especificamente nos pulmões de camundongos susceptíveis, reflete o concomitante aumento no número de unidades formadoras de colônias

(UFC), com a formação de granulomas extensos e bem desenvolvidos. Entretanto o número de granulomas, por si só, não reflete obrigatoriamente o número de UFC (DA SILVA et al. 2009).

Como parte integrante da resposta imune, a resposta imune humoral, evidenciada em modelos murinos por Calich e colaboradores (1998), mostra diferenças na cinética da produção de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*, das classes IgM e IgG, em camundongos susceptíveis B10.A e resistentes A/Sn. Nos camundongos B10.A ocorre elevação significativa nos níveis de anticorpos IgM, durante os estágios precoces da infecção, mostrando aumento nos títulos de IgG, detectados mais tardiamente, conforme a evolução da doença mostrou-se desfavorável. Camundongos resistentes A/Sn evidenciaram baixos títulos de IgG específicos, durante todo o curso da infecção, documentado até 16 semanas, tendo sido registrado pico de IgM somente na última semana de observação. Referiram ainda que o padrão de resposta imune observado pela produção de IgG, nos camundongos susceptíveis, foi similar a encontrada na doença em humanos, com elevação dos níveis de IgG encontrados conforme disseminação e gravidade da doença (VAZ et al., 1992).

Estudos microbiológicos e histopatológicos têm grande significado na obtenção de informações na evolução da paracoccidioidomicose experimentalmente induzida, provendo dados sobre o estabelecimento do diagnóstico. Também favorecem o seguimento da infecção no organismo, quantificando a presença do microorganismo e do dano tecidual. Técnicas de coloração com hematoxilina e eosina (HE), metenamina de prata de Gomori-Grocott são as mais frequentemente usadas para avaliação de órgãos infectados pelo *P. brasiliensis*, auxiliando o estabelecimento de correlações entre padrões de celularidade, presentes nos infiltrados granulomatosos da PCM, e a quantidade de fungos ali encontrados, provendo melhor avaliação da doença no transcurso da infecção (DA SILVA et al., 2009).

1.1.4 Formas clínicas de apresentação da paracoccidioidomicose

Clinicamente a doença tem sido classificada em duas formas: uma denominada crônica, podendo ser unifocal ou multifocal (tipo adulto); outra, aguda ou subaguda (tipo juvenil). A forma crônica da PCM ocorre em mais de 90% dos casos, principalmente no sexo masculino, tendo alta frequência de envolvimento pulmonar, podendo acometer linfonodos, membranas mucosas do trato digestivo e respiratório alto, fígado, adrenais e a pele, estando a resposta imune celular demonstrada pela presença de granulomas epitelióides típicos, que circundam e impedem a multiplicação do fungo (ALBORNOZ, 1982; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A forma juvenil afeta crianças e adolescentes de ambos os sexos, desenvolvendo-se em decorrência da disseminação hematogênica da infecção pulmonar primária, evoluindo de modo mais severo, e apresentando taxa de mortalidade significativa (GROSSO et al., 2003). A forma aguda apresenta resposta imune celular precária (MONTENEGRO, 1986), havendo rápida deterioração do estado geral, cursando com febre séptica, astenia, anorexia, perda de peso, leucocitose com eosinofilia e anemia (NEGRONI, 1993). Envolvimento severo do sistema reticuloendotelial, com hipertrofia de linfonodos, hepatoesplenomegalia e disfunção da medula óssea ocorre freqüentemente (MAMONI et al., 2002).

Quando comparadas do ponto de vista imunopatológico, a forma juvenil é freqüentemente associada à anergia, mostrando lesões necrotizantes e fungos em abundância, cursando com imunidade celular precária e altos títulos de anticorpos circulantes. Já a forma adulta, crônica, mostra resposta hiperérgica, em que as lesões raramente se disseminam, estando associada à formação de granuloma tuberculóide, com pequeno número de fungos. A imunidade celular está preservada e os níveis de anticorpos circulantes são baixos (FRANCO et al., 2000).

1.2 Modelos experimentais utilizados no estudo da PCM

Visando promover maior entendimento da patogênese da PCM e mimetizar o processo infeccioso que acomete humanos, modelos experimentais têm sido desenvolvidos. A primeira infecção experimental do parasito foi realizada por Splendore, em 1910, inoculando material oriundo das lesões de secreções humanas em porquinhos da Índia, gatos, cachorros, e macacos (MIGAKI et al., 1982). Montenegro, em 1927, inoculando material obtido de lesões humanas em cobaia (porquinhos-da-Índia), por via intra-testicular, observou o desenvolvimento de orquite. Posteriormente, outros animais foram inoculados, como o camundongo, o rato e o *hamster*. Espécies animais distintas exibem diferentes graus de susceptibilidade à infecção por *P. brasiliensis*; e dentro de uma mesma espécie animal esta variação também ocorre, estando relacionada à idade, sexo e linhagem do animal, virulência de *P. brasiliensis* e via de inoculação utilizada (COELHO et al., 1994).

Recentemente o emprego de camundongos isogênicos tem recebido destaque. Isto se deve ao conhecimento acumulado por inúmeros experimentos, caracterizando aspectos sorológicos, morfológicos dos granulomas, qualitativos e quantitativos relacionados ao fungo, vinculados a cronologias estabelecidas nos experimentos, proporcionando comparações entre animais. Assim, os camundongos isogênicos A/Sn e B10.A têm sido amplamente aceitos e utilizados com este fim, respectivamente caracterizando resistência e susceptibilidade a PCM. Empregando a via intraperitoneal (i.p.) e inóculos contendo 5×10^6 células leveduriformes, camundongos susceptíveis B10.A demonstraram ineficiente ativação macrofágica, hipersensibilidade tardia deprimida, níveis altos de anticorpos específicos contra *P. brasiliensis*, principalmente dos isotipos IgG1, IgG2b, e IgA, tendo a presença de granulomas frouxos, ricos em fungos, manifestando a doença de maneira progressiva. Os camundongos A/Sn resistentes, entretanto, desenvolvem forte hipersensibilidade tardia, com ativação de macrófagos, e a produção de baixos níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, dos isotipos IgG1 e IgG2a, com a identificação de granulomas compactos, evoluindo a doença muitas vezes para a cura espontânea (CALICH et al., 1994; MURPHY et al., 1994; CANO et al., 1985; CALICH; VAZ; BURGER, 1998) (Tabela 1).

Cano e colaboradores (1995) realizaram a inoculação de 10^6 leveduras de *P. brasiliensis*, isolado Pb18, pela via intratraqueal (i.t.), em camundongos A/Sn e B10A. Nos A/Sn foi verificado aumento significativo dos níveis de anticorpos específicos IgG2a e IgG3; entretanto na quarta semana de infecção os camundongos susceptíveis B10.A apresentaram

títulos do isotipo IgG2b significativamente elevados. As respectivas características de resistência e susceptibilidade dos camundongos A/Sn e B10.A se mantiveram semelhantes às encontradas nas inoculações intraperitoneais, demonstrando que ambas as vias de inóculo favorecem a disseminação fúngica a vários órgãos, nos animais susceptíveis. A IL-4 está associada à secreção de IgG1, enquanto que o TGF- β tem se mostrado importante fator para início da secreção de IgA e IgG2b. O IFN- γ é o maior indutor da secreção de IgG2a, e estimula a secreção de IgG3, em resposta a antígenos tipo 2, independentemente de células T, sendo estes achados consistentes com a predominante influência do IFN- γ na ativação da células B nos animais resistentes (CANO et al., 1998).

Quadro 1. Características imunopatológicas evidenciadas na paracoccidiodomicose experimental em diferentes linhagens de camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn) infectados com o isolado virulento Pb18 (CALICH et al., 1994; MURPHY et al., 1994).

Animais estudados	Camundongos susceptíveis B10.A	Camundongos resistentes A/Sn
Expressão MHC II	Transitória	Sustentada
Hipersensibilidade tipo tardia	Deprimida	Forte
Ativação de macrófagos	Inefetiva	Efetiva
Lesões granulomatosas	Numerosas, desorganizadas	Poucas, organizadas
Produção de anticorpos específicos	Altos níveis	Baixos níveis
Ativação de polimorfonucleares	Baixa	Alta
Ativação policlonal de células B	Alta	Baixa
Isotipo predominante	IgG2b, IgA	IgG2a
Antigenemia	Presente	Ausente
Leveduras viáveis	Numerosas	Ausentes
Tipo de resposta	Th2	Th1
Citocinas envolvidas	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β	IL-2, IFN- γ
Evolução da doença	Progressão	Regressão

Calich e Kashino (1998) estudaram as citocinas produzidas pela infecção por *P. brasiliensis* em camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn), inoculados intraperitonealmente (Quadro 2). Os camundongos resistentes A/Sn produziram níveis precoces e sustentados de IFN- γ e IL-2; as citocinas tipo 2 (IL-4 e IL-5) iniciaram seu aparecimento oito semanas após a infecção. Os camundongos susceptíveis B10.A mostraram

baixos níveis de IFN- γ , concomitantemente a níveis significantes de IL-5 e IL-10, detectados precocemente. Os autores sugerem que a secreção precoce de altos níveis de TNF- α e IFN- γ , seguida de níveis elevados e mantidos de IL-2 e IFN- γ tenha papel importante no mecanismo de resistência à infecção por *P. brasiliensis*. Em contraste, baixos níveis de TNF- α e IFN- γ , secretados de maneira precoce e efêmera, associados à produção elevada de IL-5. IL-10 e TGF- β caracterizam a doença progressiva e disseminada encontrada nos animais susceptíveis (Quadro 2).

Calich e colaboradores (1985), usando 5×10^6 leveduras, inoculadas via i.p., utilizando diversas cepas de camundongos, de ambos os sexos, observados durante 592 dias, categorizaram os animais em relação à infecção como: muito resistentes, resistentes, intermediários e susceptíveis. Os camundongos A/Sn foram alocados como altamente resistentes, tendo tempo de sobrevida médio de 377 dias; os C3H/He como resistentes, tendo sobrevida média de 238 dias; os BALB/c como susceptibilidade intermediária, com sobrevida média entre 150 a 200 dias; e os camundongos B10.A, como susceptíveis mostrando média de sobrevida inferior a 140 dias.

Singer-Vermes e colaboradores (1994), inoculando camundongos machos B10.A e A/Sn com 5×10^6 leveduras do isolado Pb18 via i.p., evidenciaram aumento equivalente no número de UFC em ambos os animais até a 12^a semana pós inóculo, quando evidenciou queda nos camundongos resistentes e aumento nos susceptíveis, obtendo diferença estatisticamente significativa na 16^a semana de infecção, no omento/pâncreas, baço, pulmões e fígado.

Cano e colaboradores (1995) inoculando camundongos machos B10.A e A/Sn com 10^6 leveduras do isolado Pb18 via i.t., evidenciaram nos animais A/Sn infecção fúngica restrita aos pulmões e sobrevida média de 393 dias, ao passo que, os camundongos B10.A tiveram sobrevida média de 181 dias. Os animais foram acompanhados pelo período de 400 dias, tendo sido observado sobrevivência de 95% dos animais A/Sn e B10.A pertencentes aos grupos-controle. A contagem de UFC foi mais expressiva nos pulmões de ambos os animais, sendo maiores nos camundongos A/Sn, no período compreendido entre sete e 30 d.p.i., passando a ser significativamente maior nos camundongos B10.A, somente a partir do 16 d.p.i., coincidindo com evidente disseminação fúngica para o fígado.

Quadro 2. Perfil das citocinas na PCM experimental, observado em camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn), infectados i.p., com 5×10^6 leveduras, do isolado virulento Pb18 (CALICH; KASHINO, 1998).

Características	Camundongos susceptíveis (B10.A)	Camundongos resistentes (A/Sn)
Secreções de IL-2 e IFN- γ	Baixas e transitórias	Altas e persistentes
Secreção de IL-4	Tardia e transitória	Tardia e transitória
Secreção de IL-5	Precoce e tardia	Tardia
Secreção de IL-10	Pico precoce	Pico tardio
Produção de TNF- α	Baixa	Alta
Secreção de TGF- β	Alta	Baixa

1.2.1 *Calomys callosus* como modelo experimental de doenças infecciosas

Calomys callosus é um cricetídeo de porte semelhante ao camundongo. Está presente em uma ampla distribuição geográfica, desde o norte da Argentina ao leste dos Andes, e no chaco boliviano e paraguaio. No Brasil encontra-se nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sul até o estado do Paraná (MELLO, 1969). *C. callosus* apesar de originalmente apresentar hábitos pastorais, está adaptado a viver em diferentes biomas, tais como semidesertos, savanas, cerrados, pampas, florestas de coníferas, bancos de gramíneas naturais, pastagens, matas secundárias, capoeiras, etc. Algumas vezes é encontrado em ambientes domésticos, peridomiciliar ou domiciliar. Apresenta atividade noturna, sedentário e vive no solo, não sendo trepador nem saltador; seu espaço físico vital é considerado de amplitude estreita (MARES; OJEDA; KOSKO, 1981). A longevidade média do *C. callosus* é de 715,2 ($\pm 274,3$) dias para o macho e 822,5 ($\pm 271,8$) dias para a fêmea (MELLO, 1984). No cerrado do Brasil, a presença do *C. callosus* é notada nas áreas de mata derrubada invadidas por pastagens, presença de gramíneas, capoeira, mata ciliar, arvoredos do cerrado de árvores baixas e arvoredos fechados (MELLO, 1984).

Investigações constataram *C. callosus* naturalmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (RIBEIRO, 1973) e pelo vírus Machupo (KILGORE et al., 1995). Esse roedor tem-se mostrado altamente susceptível às doenças infecto-parasitárias como esquistossomose, leishmaniose (MELLO, 1977; MELLO; TEIXEIRA, 1984), toxoplasmose (FAVORETO-JÚNIOR, 1998), e paracoccidiodomicose (FARIA, 2009).

C. callosus é considerado reservatório natural de *Trypanosoma cruzi* e tem-se mostrado um modelo experimental adequado para se estudar a doença de Chagas (OLIVEIRA et al., 1997). Lesões neuronais cardíacas podem estar presentes e tem sido estudadas em *C. callosus* infectados cronicamente pelo *T. cruzi* (DE-SOUZA et al., 1999). Fortes e colaboradores (2009) demonstraram susceptibilidade por parte de *C. callosus* à infecção pelo PB01, com persistência de fungos viáveis no pâncreas.

Recentemente (BERBERT et al., 2007), observações histológicas e sorológicas utilizando *Calomys callosus* e camundongos reconhecidos como susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn) a PCM, infectados intraperitonealmente com leveduras do isolado Pb18, com quantidades variáveis do fungo, a saber: $0,6 \times 10^5$, $0,6 \times 10^6$, $0,6 \times 10^7$ e $0,6 \times 10^8$, evidenciaram resposta frente à infecção altamente desfavorável em *C. callosus*, sugerindo que este animal apresente deficiência no controle do processo infeccioso comparativamente a infecção desenvolvida nos outros dois animais. O padrão agressivo de infecção observado em

Calomys foi traduzido por maior quantidade de granulomas frouxos, necróticos, permeados por maior quantidade de fungos, ocupando área mais extensas nos órgãos atingidos, em especial nos pulmões. *C. callosus* morreram precocemente nos grupos formados pelos diferentes inóculos e a presença de grande quantidade de fungos, entremeados nas lesões granulomatosas frouxas, sinalizaram para uma grande susceptibilidade deste animal à PCM. Alterações macroscópicas e microscópicas foram proporcionais à dose do inóculo; entretanto as diferenças mais notáveis foram encontradas nos grupos em que a dose de inóculo foi de $0,6 \times 10^5$ leveduras, tendo *C. callosus* apresentado lesões ainda mais graves e mais extensas do que aquelas apresentadas pelos camundongos. Amostras de soros foram coletadas após quatro semanas e na fase avançada da infecção. Os níveis de IgG foram então mensurados por ensaio ELISA, sendo que *C. callosus* apresentaram níveis semelhantes aos dos camundongos B10.A em todas as doses de inóculo, nos dois períodos analisados.

Faria (2009), utilizando inóculo menor ($0,6 \times 10^5$), observando *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn, dosando anticorpos IgG1 e IgG2a específicos anti-*P. brasiliensis* constatou em *C. callosus* níveis de IgG2a muito inferiores àqueles observados para os animais resistentes e até mesmo para os camundongos susceptíveis. Considerando a baixa dose de inóculo utilizada, sugere que *C. callosus* apresentem alto nível de susceptibilidade ao *P. brasiliensis*.

Diante disto, dando seqüência ao estudo do modelo de infecção experimental por *P. brasiliensis* em *C. callosus*, realizou-se estudo histológico, microbiológico e da dinâmica da resposta humoral ao fungo ao longo de 120 dias da infecção.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

- Avaliar, segundo parâmetros histopatológicos e microbiológicos, o desenvolvimento da infecção experimental em *Calomys callosus* por meio da inoculação intraperitoneal da cepa Pb18 do *Paracoccidioides brasiliensis*, comparativamente àquela desenvolvida em camundongos A/Sn e B10.A, reconhecidos na literatura, como modelos de resistência e susceptibilidade a infecção, respectivamente.

2.2 Específicos:

- Avaliar comparativamente a sobrevivência de *C. callosus* infectados experimentalmente pelo *P. brasiliensis*, com aquela observada para a infecção experimental desenvolvidos em camundongos A/Sn e B10.A.
- Estudar a evolução da resposta tecidual ao *P. brasiliensis* por meio de microscopia de luz de transmissão, a partir da avaliação qualitativa e semi-quantitativa do infiltrado inflamatório, da fibrose, da extensão do dano tecidual associado a lesões identificadas nos pulmões, fígado e baço de *C. callosus* e camundongos A/Sn e B10.A.
- Avaliar a evolução da paracoccidioidomicose experimental a partir da identificação e quantificação do *P. brasiliensis* nos pulmões, fígado, baço de *C. callosus* e dos camundongos A/Sn e B10.A, pelo exame micológico direto, cultura e por avaliação histopatológica.
- Avaliar a resposta sorológica dos animais testados por meio da quantificação de IgM e IgG anti-*P. brasiliensis* ao longo do período experimental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Calomys callosus, Rengger 1830 (*Rodentia*, *Cricetidae*), cepa Canabrava, machos, procedentes de colônia mantida pelo Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Eloísa A. V. Ferro, e camundongos machos da linhagem A/Sn e B10.A, procedentes do Centro de Bioterismo da Universidade de São Paulo (USP - São Paulo, SP), todos entre 8 e 10 semanas de idade e pesando entre 25 e 30g no momento da inoculação, foram utilizados no presente experimento. Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob condições padrões de luminosidade (ciclos alternados de claro/escuro de 12 horas), temperatura ambiente ($25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$), e umidade relativa do ar ($55\% \pm 5\%$), recebendo ração e água *ad libitum*.

3.2 Obtenção do inóculo de *P. brasiliensis*

3.2.1. Cultivo de leveduras de *P. brasiliensis*

Para o cultivo de leveduras de *P. brasiliensis* foi utilizado o isolado Pb18, gentilmente cedido pela Dra. Maria Cristina Roque Barreira, do Departamento de Biologia Celular e Molecular de Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). O fungo foi cultivado à temperatura de 37°C , em meio de cultura YPD (extrato de levedura 0,5%, peptona 0,05%, D-glicose 1,5%) acrescido de ágar 1,5%.

Após sete dias de crescimento, amostras dos fungos foram removidas do meio sólido em halo de segurança com auxílio de alça de platina e transferidas para frasco *Erlenmeyer* devidamente esterilizado, contendo cerca de 5ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. O conteúdo do frasco foi homogeneizado com auxílio de pérolas de vidro até a dissolução dos grumos da cultura. Em seguida, as células fúngicas foram contadas utilizando-se, para tanto, uma câmara de Neubauer (Weber Scientific International, Lancing, Sussex, England) e microscópio epifluorescente (Olympus Mod. BX60, Tokyo, Japan) com

objetiva de 20x e ocular de 10x. Para tanto, 10µl de suspensão da cultura em solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (CALICH; PURCHIO; PAULA, 1978) foi inoculada na interface lâmina/lamínula. Tanto a contagem das células totais quanto das células viáveis (fluorescentes) foi realizada considerando os quatro retículos externos, obtendo-se viabilidade de 80%, a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número total de células contadas (10µl)} \times \text{fator de diluição} \times 1,5 \times 10^4}{\text{Número de quadrantes do retículo}}$$

3.3 Desenvolvimento da infecção experimental

3.3.1. Inoculação dos animais

Foram utilizados no total 114 animais, sendo 38 *C. callosus*, 38 camundongos A/Sn e 38 camundongos B10.A. Cada grupo foi subdividido em sete grupos experimentais. Os primeiros seis grupos foram caracterizados como correspondendo à cronologia de observação experimental, a saber: sete, 15, 30, 60, 90 e 120 dias pós-infecção; o sétimo grupo, contendo oito animais de cada espécie, correspondeu ao grupo analisado para sobrevivência pós-infecção.

Os animais de todos os grupos experimentais foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com 250µl de PBS contendo $0,6 \times 10^5$ leveduras de *P. brasiliensis*, cepa Pb18. Durante todo o período experimental, os animais foram observados duas vezes ao dia para avaliação do estado geral.

3.3.2 Sacrifício dos animais e coleta das amostras

Após anestesia pela inalação de éter sulfúrico, os animais foram sacrificados utilizando-se a técnica de deslocamento cervical, seguindo cronograma pré-estabelecido, constando seis períodos de observação já considerados anteriormente. No momento da eutanásia, amostras de sangue foram colhidas nos diferentes períodos experimentais a partir do plexo venoso retro-orbital, quando tubos capilares de vidro eram digitalmente posicionados e pressionados perpendicularmente contra o epicanto interno do olho, utilizando movimentos de semi-rotação do tubo nos sentidos horário e anti-horário. Amostras de sangue coletadas em tubos *ependorf* de dimensões apropriadas foram centrifugadas a 720 x g por 10 minutos. As

amostras de soro obtidas foram então armazenadas a -20°C até o momento de sua utilização para as análises sorológicas.

Ademais, os animais foram parcialmente eviscerados para coleta dos pulmões, do fígado e do baço. Após a análise macroscópica dos órgãos, fragmentos foram amostrados para a realização dos estudos histopatológicos e microbiológicos. Para o estudo histopatológico, fragmentos coletados em uma região pré-determinada dos órgãos foram fixados em solução de paraformaldeído a 10%, e aí mantidos não mais que 72 horas. Para o estudo microbiológico, outros fragmentos dos mesmos órgãos foram pesados e colocados em frasco estéril contendo soro fisiológico, e encaminhados para a realização da pesquisa direta e cultura para fungo.

3.4 Avaliação da resposta humoral

3.4.1 Preparo de antígeno solúvel de *P. brasiliensis* (AgPb)

O AgPb foi preparado segundo Scott (1987) com algumas modificações como descrito a seguir: leveduras do isolado Pb18 foram suspensas em 2ml de PBS estéril contendo os inibidores de proteases aprotinina a 10µg/ml (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, 10820), leupeptina a 50µg/ml (Alexis Biochemicals, código 260-009-M005) e fluoreto de fenilmetilsulfonil a 1,6mM (PMSF - Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código P76260). 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 seis ciclos de 30 segundos em ultra-som (Thornton, Impec Eletrônica, São Paulo, Brasil) a 40KHZ e posteriormente macerado em N₂ líquido. Após esse processo, a suspensão foi clarificada por centrifugação a 20.000 x *g* por 15 minutos, a 4°C (Centrifuge 5810R; Eppendorf, Hamburg, Germany). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C, até o momento do uso. O conteúdo protéico dos extratos foi estimado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando como curva padrão de proteína a soro albumina bovina (BSA-Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código A8022), em diluição seriada de 0,25mg/ml a 1,5mg/ml. A leitura da reação foi realizada a 595nm em espectrofotômetro (Biomate 3, Termo Scientific, Waltham, USA).

3.4.2 Ensaio Enzimático de Imunoabsorância (ELISA) para identificação e quantificação de IgM e IgG específicas anti-*P.brasiliensis*

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados para determinar os níveis de anticorpos IgM e IgG totais, específicos para *P. brasiliensis* em amostras de soros individuais de *C. callosus*, dos camundongos B10.A e A/Sn experimentalmente infectados com $0,6 \times 10^5$ células fúngicas.

Placas de alta afinidade para ELISA foram sensibilizadas com 5µg/ml do *AgPb* diluídos em tampão carbonato 0,06M (pH 9,6), *overnight*, a 4°C, em câmara úmida, para ligação do antígeno à placa. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T), acrescido de 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo) (PBS-TM 5%) por uma hora, à temperatura ambiente. Na etapa seguinte, as placas foram incubadas com amostras de soros diluídas a 1:32 para o anticorpo IgM e 1:64 para o anticorpo IgG em PBS-TM 1%. Após incubação por 1 hora a 37°C, foram adicionados os conjugados de cabra anti-IgM (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código A8786) ou anti-IgG (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código A3673) de camundongos, marcados com peroxidase, diluídos a 1:1000 em PBS-TM 1%. As placas foram incubadas por uma hora a 37°C. Após cada etapa da reação, os poços foram lavados seis vezes com PBS-T, excetuando-se após o bloqueio em que as placas foram lavadas três vezes. A reação foi revelada pela adição do substrato contendo 0,03% de H₂O₂ e 1mg/ml de orto-fenilenodiamina (OPD - Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA, código P9029) diluído em tampão citrato/fosfato (pH 5,0). A interrupção da reação foi feita pela adição de 25µL de H₂SO₄ a 2N, por poço. As densidades ópticas (DO) obtidas foram determinadas em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus; Flow Laboratories, Geneva, Switzerland) a um comprimento de onda de 492nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Os resultados foram expressos em índice ELISA (IE), onde: IE é o quociente da médias dos valores de DO em cada amostra pelos valores de corte (*cut-off*). Os valores de *cut-off* das reações foram estabelecidos pela média de DO de três amostras negativas mais três desvios padrões. As amostras com IE acima de 1,2 foram consideradas positivas (SILVA et al., 2002).

3.5 Avaliação histopatológica da infecção experimental

3.5.1 Obtenção dos cortes histológicos

Os fragmentos teciduais, previamente fixados em paraformaldeído (10%), foram processados rotineiramente para a análise de microscopia de luz visível, considerando a desidratação e diafanização dos fragmentos por meio de processador automático de tecidos (Histotécnico, Lupe PT05, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, os fragmentos foram incluídos em parafina e secções histológicas de 3µm de espessura foram obtidas e coletadas em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas. Seguindo-se a desparafinação em estufa 60°C, os cortes foram diafanizados em três banhos de xilol por cinco minutos, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 70%), e corados pelas técnicas da hematoxilina e eosina, reticulina de Gomori; tricrômico de Masson e metenamina prata de Gomori-Grocott (MICHALANY, 1980).

Após a coloração, as lâminas foram desidratadas pela passagem em soluções alcoólicas de concentrações crescentes (70%, 90%, 100%) e clarificadas no xilol. Todas as lâminas foram montadas em lamínula por meio de *Permount* (Sigma Co, USA).

3.5.2 Avaliação morfológica qualitativa da resposta inflamatória

A avaliação da resposta inflamatória foi realizada a partir da identificação do tipo e padrão de circunscrição do granuloma, dado pelos seguintes aspectos:

1. Caracterização da composição celular
2. Presença de necrose
3. Padrão de circunscrição (frouxo; compacto)

Desta forma, os granulomas frouxos foram definidos como reação epitelióide mal definida, com células gigantes em número variável, inflamação exsudativa, mostrando extensas áreas de necrose, rica em fungos. Os compactos foram caracterizados pela presença de células epitelióides agrupadas, formando granulomas bem definidos, tendo poucos fungos degenerados (RESTREPO et al., 1992).

Para fins de descrição objetiva dos achados histopatológicos, os granulomas foram categorizados em três tipos:

- 1 – Infiltrado inflamatório granulomatoso, contendo células de Langhans e macrófagos epitelióides, com ausência de plasmócitos, neutrófilos (com ou sem microabscessos) e eosinófilos.
- 2 – Infiltrado inflamatório granulomatoso do tipo 1, acrescido da presença de plasmócitos, neutrófilos (com ou sem microabscessos) e eosinófilos.
- 3 – Infiltrado inflamatório granulomatoso do tipo 2, acrescido de necrose por coagulação.

3.5.3 Avaliação morfológica semi-quantitativa

A avaliação do grau de acometimento do órgão pela doença foi realizada a partir da estimativa do percentual de área ocupada pelos granulomas paracoccidioídicos nas secções histológicas de cada órgão em particular. Para tanto, cada secção histológica foi avaliada em aumento de 400x, estabelecendo-se inicialmente o percentual ocupado por campo. Em seguida, foi realizada uma média a partir dos campos avaliados para cada grupo de animais testados, em função dos tempos definidos de observação.

3.5.4 Avaliação semiquantitativa da fibrose nas lesões inflamatórias causadas pelo *P. brasiliensis*

A avaliação semiquantitativa da fibrose foi realizada a partir de cortes histológicos corados pelas técnicas da reticulina de Gomori e do tricrômico de Masson, que permitem a visualização das fibras colágenas tipos III e I, respectivamente.

Para a avaliação semiquantitativa de colágeno tipo I foram utilizados os critérios de Kerr e colaboradores (1988b) relacionados abaixo e ilustrados na Figura 1, a saber:

- (-):** ausência de deposição de colágeno.
- (+):** expressão fraca visualizada pela deposição de colágeno de cor cinza-azulado, fibrilar frouxo, núcleos numerosos.
- (++):** expressão moderada, fibras tênues azul-esverdeadas, alguns núcleos ainda arredondados.
- (+++):** expressão forte, colágeno homogêneo azul-esverdeados mais intenso, fibras espessas com núcleos achatados.

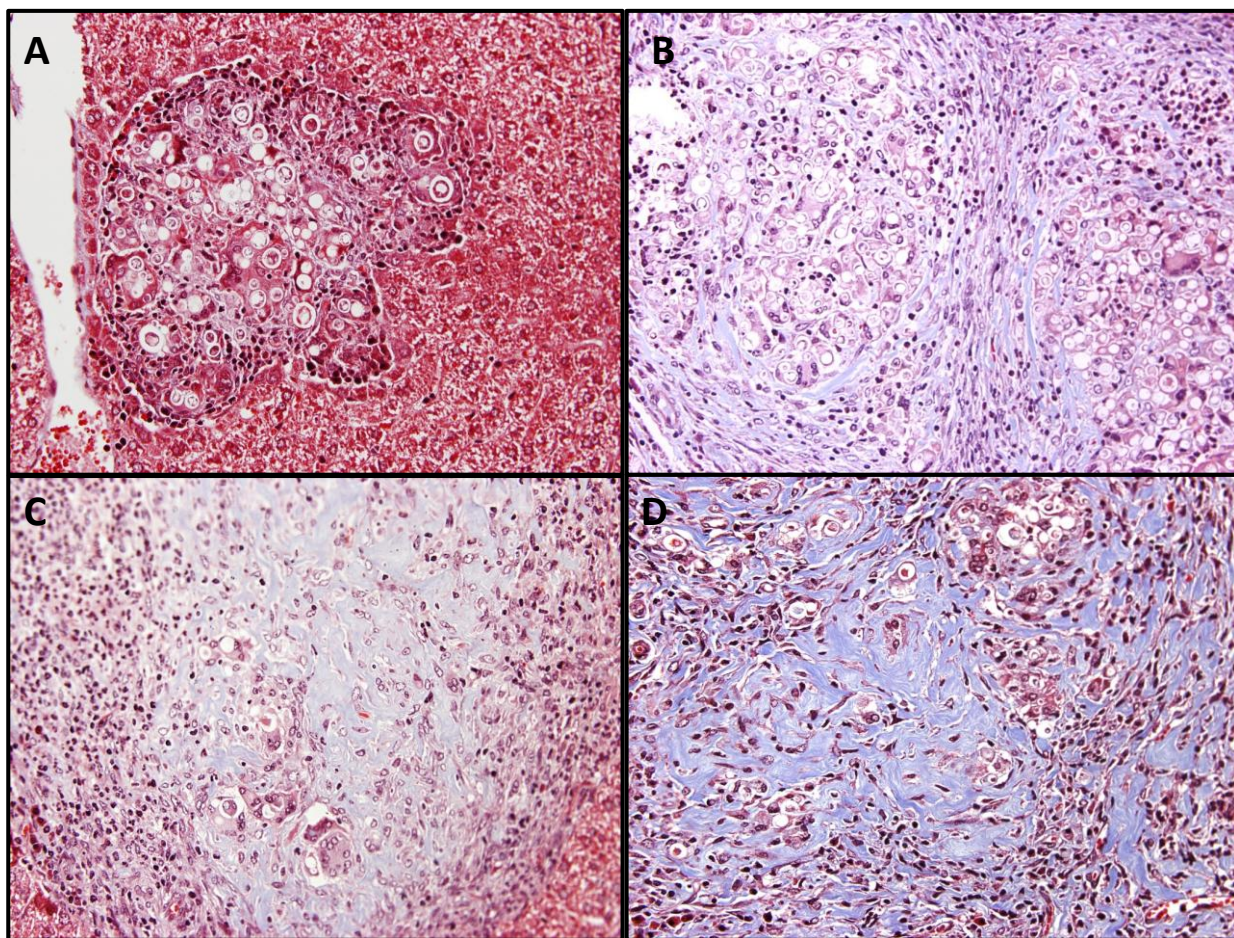


Figura 1. Escala semi-quantitativa empregada na avaliação da quantidade de colágeno tipo I presente nas lesões teciduais. Ausente (A); positivo + (B); moderadamente positivo ++ (C); fortemente positivo +++ (D) (Objetiva: 40x).

Em relação ao colágeno tipo III, optou-se pela utilização de escala semi-quantitativa baseada naquela preconizada por Silva e colaboradores (1999) conforme descrição abaixo e ilustrado na Figura 2:

(-): ausência de deposição de fibras

(+): expressão fraca: fibras delicadas esparsas, de comprimentos variáveis, em geral pequenas, vistas no interior ou externamente aos granulomas.

(+ +): expressão moderada, tendo feixes constituídos por múltiplas fibrilas, sem aspecto fragmentado, permeando ou contornando, parcial ou totalmente, os granulomas.

(+++): expressão forte, com feixes espessos e longos, sem fragmentação, permeando ou contornando totalmente os granulomas.

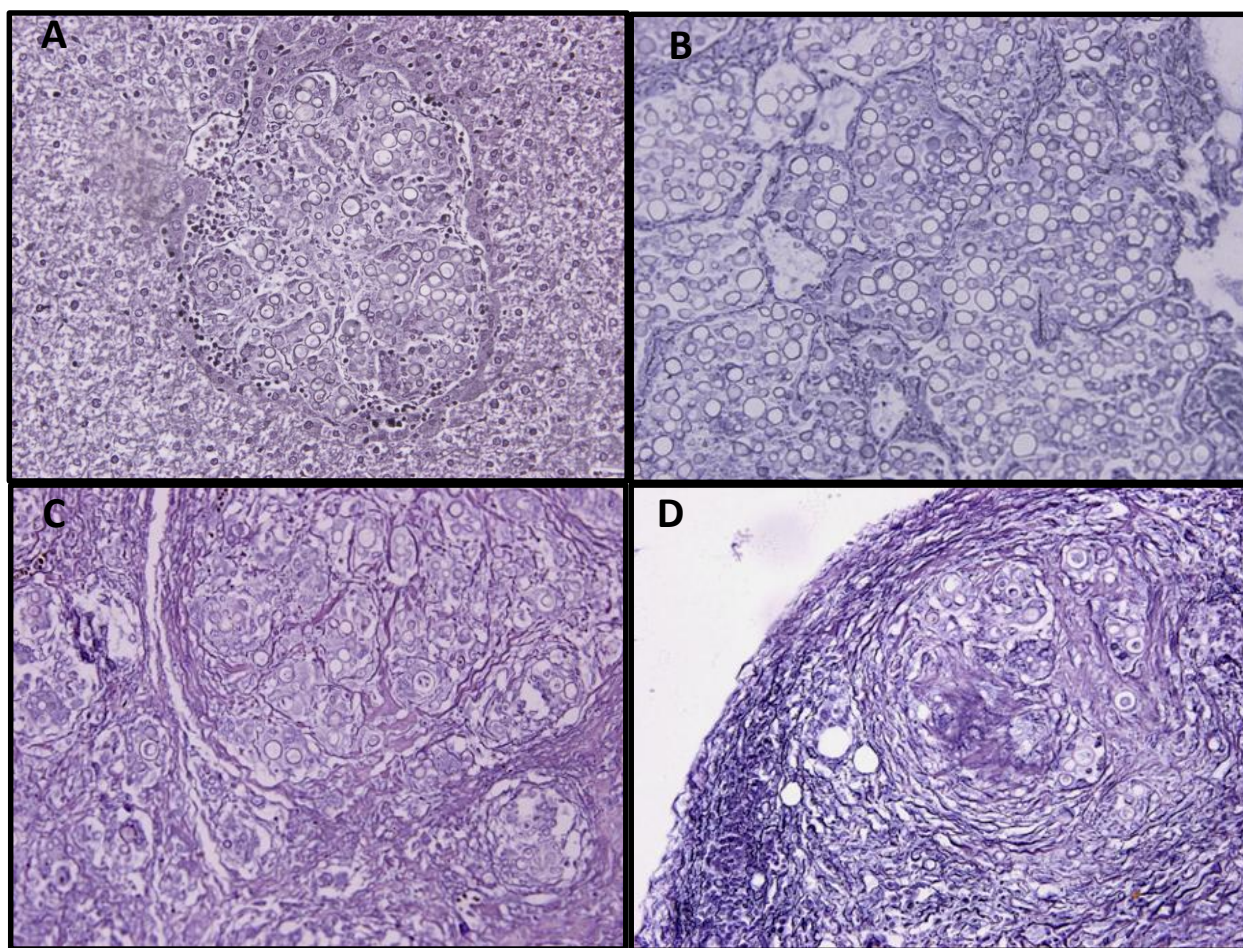


Figura 2 . Escala semi-quantitativa empregada na avaliação da quantidade de colágeno tipo III, presente nas lesões teciduais. Ausente (A); positivo + (B); moderadamente positivo ++ (C); fortemente positivo +++ (D) (objetiva: 40x).

Para ambas as avaliações, os resultados foram expressos pela média dos escores ao longo dos períodos de observação do experimento e pelas médias das fases iniciais (sete a 30 d.p.i) e finais do experimento (60 a 120 d.p.i).

3.7 Pesquisa do *P. brasiliensis* por meio de pesquisa direta, cultura e contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Fragmentos representativos dos órgãos de cada grupo animal testado medindo 16 mm³ foram amostrados, pesados e transferidos para tubos de ensaio estéreis contendo soro fisiológico (NaCl 0,9%). Em seguida, os fragmentos orgânicos foram seccionados, macerados e homogeneizados em 5ml de PBS estéril com auxílio de gral e pistilo de vidro número 1.

Alíquotas de 100µl da suspensão celular de cada órgão foram semeados em placas de Petri, contendo ágar Mycobiotic (Difco, Detroit, USA), e armazenadas em estufa microbiológica (Orion 502, FANEM, São Paulo, SP, Brasil) entre 35°C e 36°C, por um período de 30 dias. Para a pesquisa micológica direta, o restante da suspensão celular foi depositado em lâmina de vidro, acrescido de duas gotas de hidróxido de sódio (NaOH) 20%. O conjunto foi então recoberto por lamínula de vidro para observação microscópica.

Na pesquisa direta, a identificação do fungo teve como parâmetro o reconhecimento de formas compatíveis com leveduras de *P. brasiliensis*: estruturas arredondadas, isoladas ou não, gemulantes ou não, com parede única e membrana dupla refringente.

A identificação do *P. brasiliensis* em cultura foi feita a partir do reconhecimento de colônias cerebriformes de cor creme. A quantificação do seu crescimento foi realizada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). A plotagem dos resultados foi feita levando-se em consideração a média de UFC por miligrama de tecido obtido em cada grupo de animais, nas fases iniciais (sete a 30 d.p.i.) e finais do experimento (60 a 120 d.p.i.).

Os resultados foram analisados considerando as seguintes abordagens:

1. Proporção de órgãos com exame de pesquisa direta, positivo para cada grupo experimental.
2. Proporção de animais com resultados positivos segundo a cronologia do experimento, considerando cada órgão em particular nos diferentes grupos de animais avaliados.
3. Proporção de órgãos com cultura positiva para cada grupo experimental segundo a cronologia do experimento.
4. Número de UFC por miligrama de tecido estudado, segundo a cronologia do experimento para cada órgão analisado nos diferentes grupos experimentais.

3.8 Avaliação do *P. brasiliensis* nas secções teciduais

Para a identificação específica do fungo no tecido, realizou-se a técnica de metenamina-prata de Gomori-Grocott, com a qual os fungos eram identificados como estruturas arredondadas coradas em preto, sobre fundo verde. A produção de blastoconídeos, muitas vezes sob a forma de brotamentos, também foram considerados (MICHALANY, 1980).

As lâminas foram examinadas ao microscópio óptico (Olympus UIS2/UIS).

3.8.1 Contagem de fungos nos tecidos

A contagem de fungos foi realizada a partir da identificação das áreas em que a presença do *P. brasiliensis* foi flagrada, tendo como parâmetro os granulomas de maiores dimensões observados nas secções teciduais. Toda a extensão dos granulomas foi avaliada seguindo-se uma linha imaginária traçada nos seus maiores diâmetros a partir de campos sequenciais utilizando objetiva de 40x e ocular de 10x, sendo a contagem de fungos realizada através de programa específico para análise e contagem de células (*software* IMAGE J) (Figura 3). A expressão de contagem dos fungos foi feita considerando a proporção de fungos viáveis e de brotamentos por campo contado, considerando os diferentes órgãos nos grupos experimentais testados e a cronologia do experimento.

Na contagem, inicialmente, foram consideradas as formas fúngicas reconhecidas como viáveis e inviáveis. Para identificação das formas viáveis foram levados em conta os seguintes parâmetros: reconhecimento de leveduras com parede celular completa, com forma oval ou arredondada, sem brotamentos ou com exosporulação (formas em roda de leme, *Mickey Mouse* ou em cacho de uva) e apresentando citoplasma corado uniformemente em preto (RESTREPO, 2000). O tamanho e o número de brotamentos não foram considerados para a medida da viabilidade.

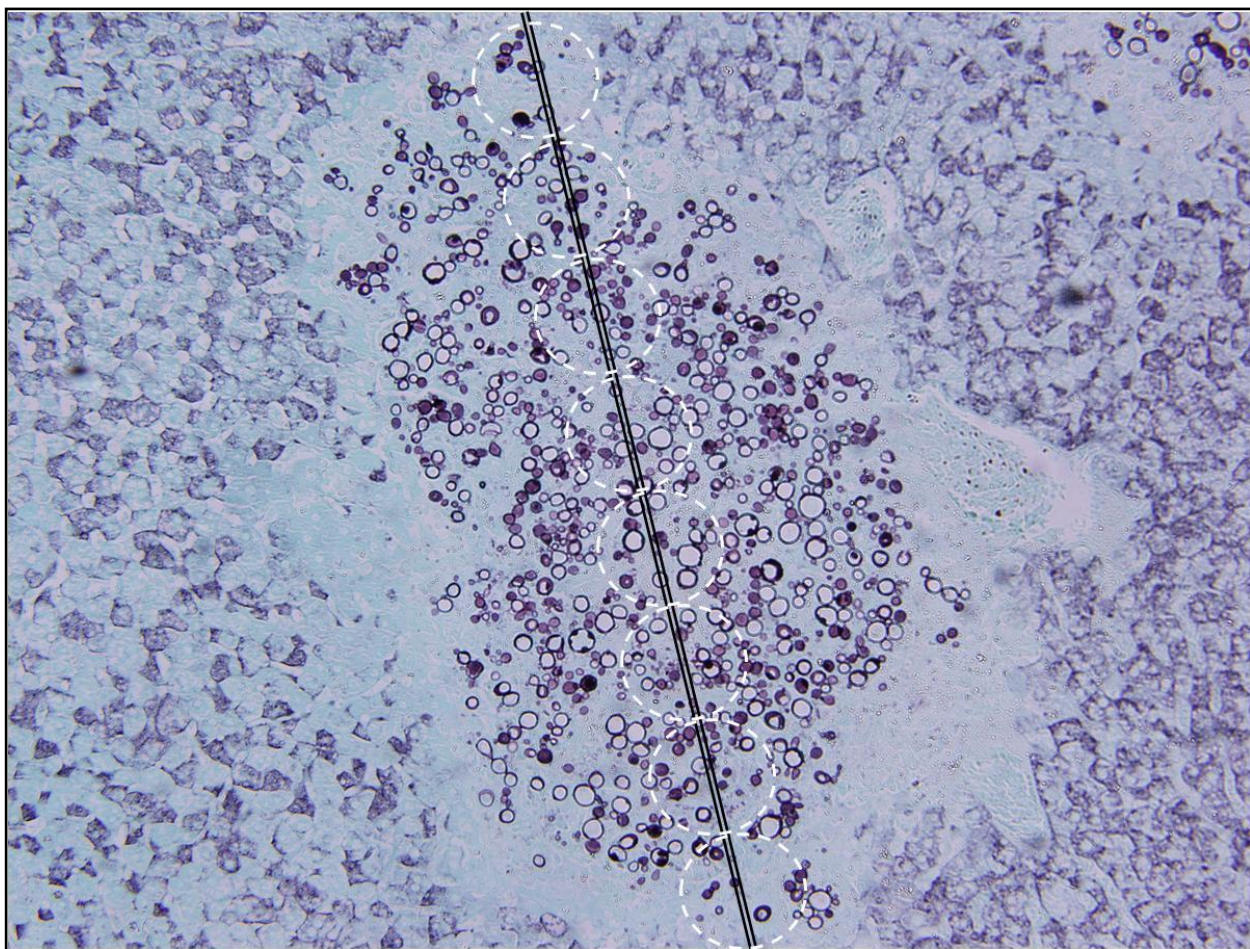


Figura 3. Diagrama representativo da metodologia de contagem dos fungos dentro dos granulomas encontrados nos tecidos.

As formas inviáveis foram identificadas a partir das seguintes características: leveduras com parede celular fragmentada, formas aberrantes tipo concha, granada, banana, lua crescente ou balonizadas, encolhidas e enrugadas (ÂNGULO-ORTEGA, 1972; RESTREPO, 2000)(Figura 4). As células apresentando exosporulação múltipla foram consideradas inviáveis sempre que a célula-mãe apresentava morfologia de célula inviável. Não obstante o reconhecimento de características de viabilidade nas gemulações a expressão da contagem dos fungos foi feita considerando a proporção de fungos viáveis e brotamentos por campo contado, nos diferentes órgãos, para cada grupo experimental testado, seguindo a cronologia proposta para o experimento.

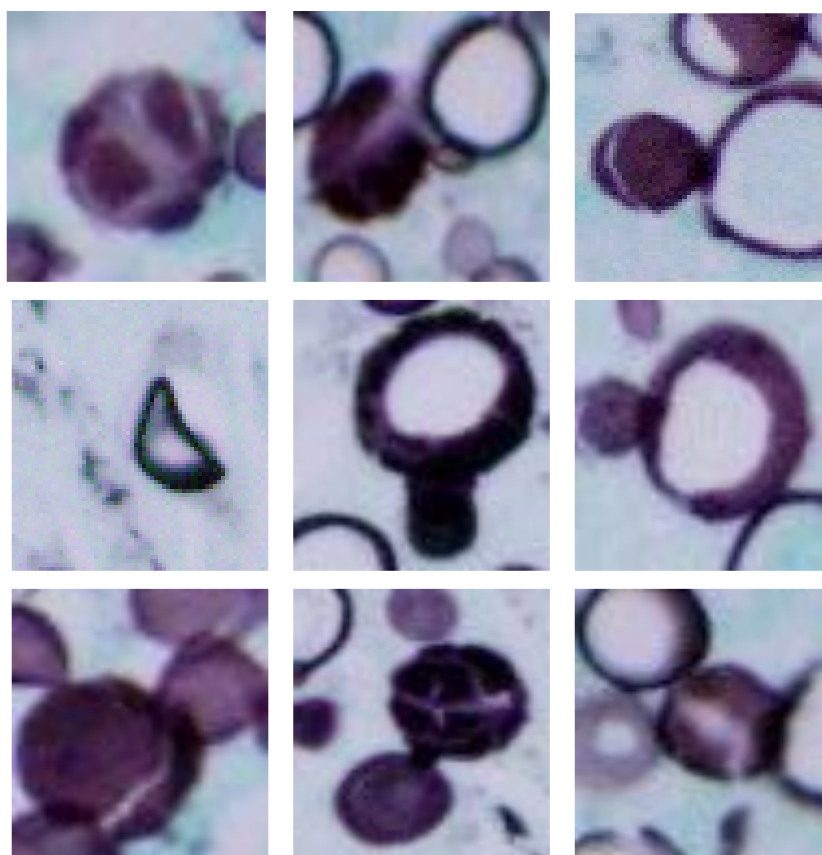


Figura 4. Aspectos micromorfológicos de formas inviáveis de *P. brasiliensis* na vida parasitária encontrada nos animais infectados experimentalmente. Coloração de Gomori-Grocott (Objetiva de 40x).

3.9 Normas de biossegurança e considerações éticas

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005), e também obedecendo os princípios éticos em pesquisa animal recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1996). Este estudo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo número 086/2008 (Anexo 1).

3.10 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados comparativamente entre os grupos estudados segundo a cronologia do experimento já determinado. Todos os resultados foram analisados intra e inter-grupos, procurando-se identificar diferenças nos valores obtidos entre as etapas do experimento e entre os grupos, em cada etapa proposta para o experimento. Para tanto, os valores obtidos foram avaliados estatisticamente segundo a sua normalidade e homocedasticidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk (SPIEGEL, 1979).

Para comparação dos valores dos índices ELISA (IE), ELISA Avidez, escores do processo inflamatório e dos valores de UFC foram realizados testes estatísticos segundo a distribuição amostral e a homocedasticidade dos dados, a saber: para dados normais utilizou-se análise de variância (ANOVA); para dados não normais foram empregados Kruskal-Wallis ou Friedman (SPIEGEL, 1979).

O teste de Spearman foi utilizado para se investigar correlação entre a proporção de fungos viáveis, de brotamentos e a área envolvida pelos granulomas nos órgãos estudados, ao longo do experimento.

Para a análise de mortalidade (sobrevida total) comparativa entre os grupos estudados, desenhou-se a curva de sobrevida total para cada grupo de animais no decorrer de 15 meses de acompanhamento (curva de sobrevida total Kaplan-Meier), comparadas pelo teste de log-rank. Toda a análise foi efetuada com o auxílio de programa estatístico *software GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Para todos os testes estatísticos desenvolveu-se o intervalo de confiança de 95%, rejeitando a hipótese de nulidade quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da mortalidade

Em relação à sobrevida observamos, ao longo de aproximadamente 15 meses (443 dias) de acompanhamento, que *Calomys callosus* morreram todos dentro de 118 dias pós inoculo (Figura 5), apresentando a análise estatística diferença significativa. Foi realizada necropsia em todos os animais que morreram neste período de observação, não sendo encontrados sinais da infecção sistêmica em nenhum dos camundongos A/Sn que foram a óbito, entretanto todos os camundongos B10.A e *C. callosus* evidenciaram comprometimento dos órgãos no momento em que morreram.

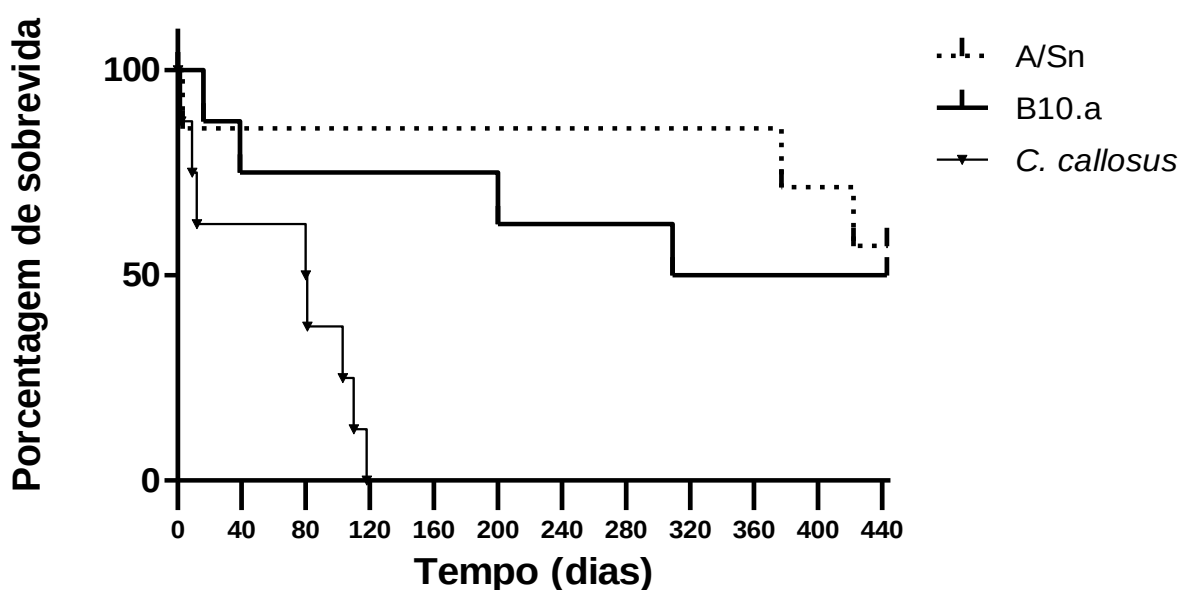


Figura 5. Curva de sobrevida para os grupos de animais estudados com $0,6 \times 10^5$ leveduras de *P. brasiliensis*, obtida ao longo de aproximadamente 15 meses de observação (Teste de Logrank, $p=0,0038$).

4.2 Avaliação da resposta humoral através da quantificação da IgG e IgM

Quanto aos níveis do anticorpo IgM houve uma tendência a elevação nos três grupos avaliados. Para *C. callosus*, seus valores foram significativamente mais elevados, a partir dos 90 d.p.i., em relação àqueles encontrados aos sete d.p.i.. No início do processo infeccioso, aos 7 d.p.i., comparando-se os três grupos em cada período cronológico, observou-se que os camundongos A/Sn apresentaram níveis de IgM significativamente mais elevados do que *C. callosus* (Figura 6).

Analisando os níveis do anticorpo IgG, os camundongos B10.A e *C. callosus* mostraram tendência a elevação dos níveis, observada durante o período experimental, ocorrendo de maneira mais expressiva neste último grupo. Não obstante, nestes dois animais detectou-se aumento estatisticamente significativo nos níveis de IgG a partir dos 60 d.p.i. Os camundongos A/Sn tiveram aumentos estatisticamente significantes nos níveis de IgG obtidos apenas aos 90 d.p.i, em relação aos níveis observados aos sete d.p.i. ($p < 0,05$). A comparação dos três grupos, para cada tempo experimental mostrou que *C. callosus* apresentou elevação dos níveis deste anticorpo de forma significativa em relação aos obtidos nos camundongos A/Sn aos 120 d.p.i ($p < 0,05$)(Figura 6).

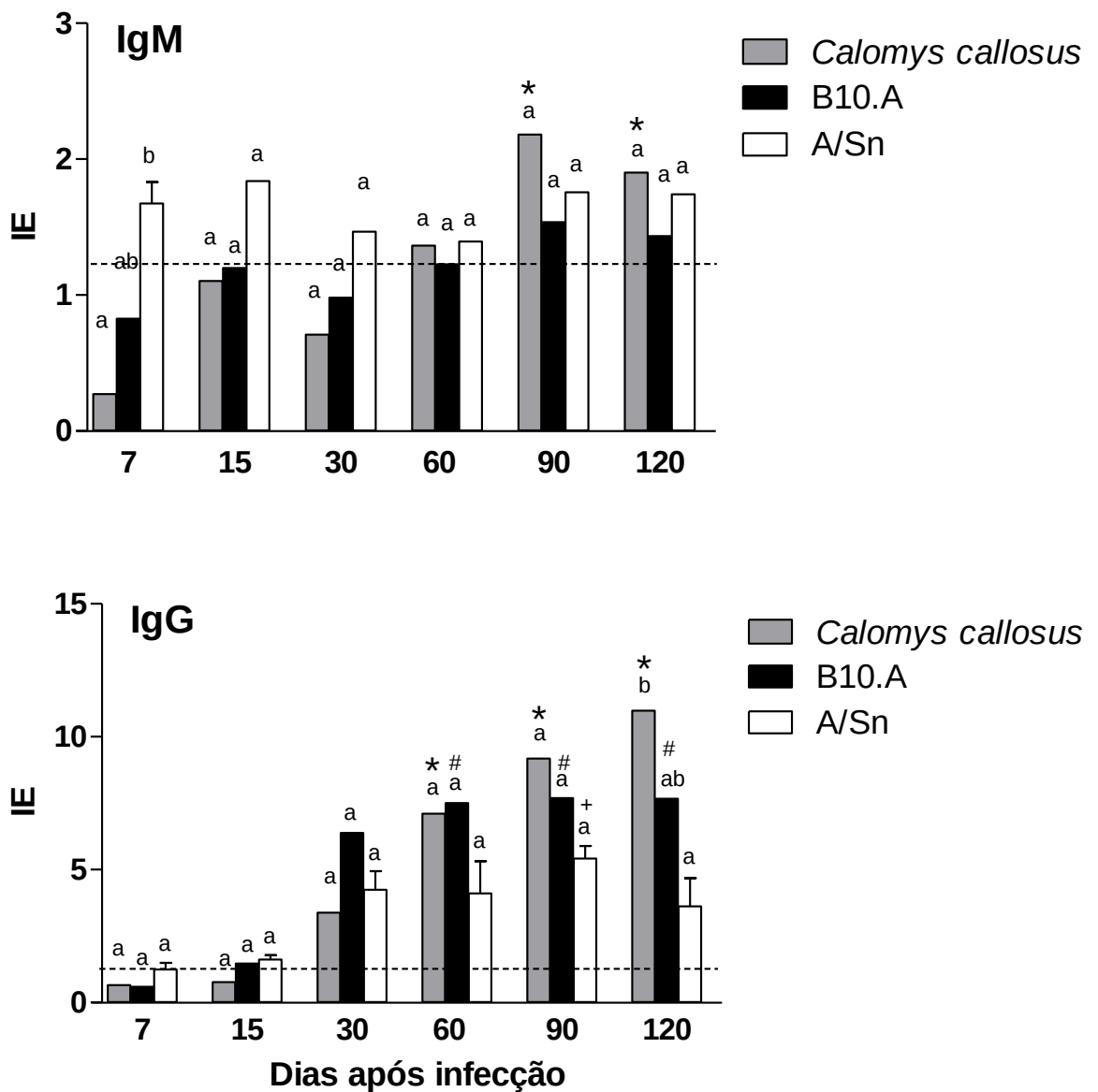


Figura 6. Níveis dos anticorpos IgM e IgG específicos para o *P. brasiliensis* expressos em Índice ELISA (IE). *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn foram infectados intraperitonealmente com $0,6 \times 10^5$ leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*. Amostras de soro foram coletadas aos 7, 15, 30, 60, 90 e 120 d.p.i.. Valores são indicados como média $\pm$ erro padrão da média. A linha pontilhada indica o valor para o *cut-off* da reação (IE > 1,2). Letras diferentes acima das barras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos dentro do mesmo período ($p < 0,05$). Os símbolos *, # e + indicam aumento estatisticamente significativo dos níveis de anticorpos, em relação aos 7 d.p.i., nos *C. callosus*, camundongos B10.A e A/Sn respectivamente ($p < 0,05$).

4.3 Análise histopatológica da infecção pela coloração de Hematoxilina e eosina (HE)

Camundongos A/Sn:

Os pulmões dos camundongos resistentes A/Sn, mesmo nas fases mais precoces, apresentaram pneumonite intersticial (com áreas granulomatosas e não granulomatosas), persistente ao longo do experimento, com a proporção da área afetada do órgão variando entre 30 a 60%. Pode-se notar que o infiltrado era composto por tipos variados de leucócitos, dispostos sem organização definida, marcado pela presença de macrófagos, linfócitos, plasmócitos, neutrófilos, formando ou não microabscessos, e eosinófilos. Macrófagos e linfócitos foram identificados como componentes constantes deste infiltrado, com sua presença observada entre 80 a 100% das secções histológicas avaliadas. Outras células foram vistas com menor frequência, a saber: plasmócitos, em 20% dos animais, apenas aos 60 d.p.i.; neutrófilos, em sete e 15 d.p.i., em 60 a 100% dos animais; e eosinófilos, compondo o infiltrado inflamatório em 20% dos animais, aos sete d.p.i..

No fígado, observou-se infiltrado granulomatoso unifocal, em geral subcapsular, envolvendo até 5% do parênquima hepático, numa proporção entre 20% e 40% dos animais até aos 60 d.p.i., a partir do qual não pode mais ser evidenciado. Morfologicamente os granulomas variaram em frouxos e compactos, sem predomínio aparente de um dos tipos. A partir dos 15 d.p.i. até os 60 d.p.i. pode-se perceber a presença de eosinófilos, plasmócitos e neutrófilos (delineando ou não microabscessos) em até 40% dos granulomas, não sendo mais identificados após esta data. Em todos os granulomas foram observados fungos, em pequeno número, a maioria dos quais com aspectos morfológicos identificáveis como inviáveis. Aos 90 e 120 d.p.i., observou-se infiltrado inflamatório misto, não granulomatoso, constituído por macrófagos, linfócitos, neutrófilos (com eventual formação de microabscessos), eosinófilos e plasmócitos. Em geral o infiltrado era multifocal, com dimensões variadas, alcançando a área máxima de até 5% do órgão, em 80% dos animais. As lesões foram observadas em diferentes regiões, a saber: subcapsular, no espaço porta, perifericamente à veia centrolobular ou no parênquima. Hiperplasia das células de Kupfer foi identificada em todos os animais estudados, em todos os períodos de observação.

Em relação ao baço, infiltrado inflamatório discreto, estava presente de maneira focal a partir de 60 d.p.i., persistindo até o final do experimento, sendo composto por mononucleares e chegando a afetar 60% dos animais A/Sn. Notou-se ainda a presença de

megacariócitos, espessamento e fibrose da cápsula esplênica. Granulomas foram identificados no peritônio visceral, agredindo a cápsula esplênica, sendo composto por macrófagos, células epitelióides, PMN por vezes formando microabscessos, invadindo e comprometendo o parênquima do baço, sendo observados entre 15 d.p.i. e 60d.p.i., afetando pequenas áreas, acometendo 20 a 40% dos camundongos A/Sn.

Camundongos B10.A

Os pulmões dos camundongos susceptíveis B10.A mostraram pneumonite intersticial (granulomatosa ou não granulomatosa) em todos os períodos de estudo estabelecidos para o experimento em 100% dos animais. Entre sete e 15 d.p.i. o infiltrado inflamatório foi não granulomatoso, havendo predomínio de exsudato linfo-histiocitário, permeado por neutrófilos, sem a formação de microabscessos. A presença de neutrófilos, embora constantemente observados ao longo do experimento, foi variável em relação à proporção identificada em cada período, com 100% entre sete e 15 dias, declinando para 40% aos 90 d.p.i. e 120 d.p.i.; plasmócitos foram observados a partir dos 30 d.p.i. até 120 d.p.i. em 40% dos animais. O infiltrado granulomatoso (pneumonite granulomatosa) foi observado a partir dos 30 d.p.i. até os 120 d.p.i., em 20% dos animais, caracterizado como frouxo e multifocal, chegando a ocupar 15% da área dos fragmentos avaliados (120 d.p.i.). Sua composição era caracterizada pela presença de células gigantes multinucleadas (tipo Langhans), células epitelióides, neutrófilos e plasmócitos.

O estudo do fígado dos camundongos B10.A, susceptíveis à infecção pelo *P. brasiliensis*, mostrou: predominância de macrófagos, em 80 a 100% dos animais, seguido pelos linfócitos e neutrófilos em 60 a 100%, eosinófilos entre 20 e 100%, ao longo de todo o período de experimento; granulomas presentes em todas as etapas, sendo que o acometimento nos períodos iniciais (sete, 15 e 30 d.p.i.) foi de 40% dos animais, enquanto que nas fases finais 80% dos camundongos B10.A estavam acometidos. Estes granulomas eram isolados ou confluentes, ora compactos, ora frouxos, com a presença de células epitelióides e células de Langhans contendo fungos no seu interior. Outras células também puderam ser observadas: macrófagos e linfócitos (100% dos casos), neutrófilos (entre 20 e 80%, distribuídos ao longo de todos os períodos experimentais); eosinófilos, em 20 a 40% dos casos nos períodos de sete e 15 d.p.i., desaparecendo nos períodos subsequentes; e eventualmente necrose central (20 a 40%, nos períodos iniciais de sete e 30 dias, respectivamente).

No baço, infiltrado granulomatoso foi observado a partir dos 30 d.p.i. Os granulomas se caracterizaram como frouxos, multifocais, sendo evidenciados numa proporção

que variou entre 40 e 80% dos animais. Este padrão foi observado até o final do experimento. Sua composição foi caracterizada pela presença de células gigantes multinucleadas (Langhans), células epitelióides, macrófagos, neutrófilos, com e sem a formação de microabscessos. Estes granulomas acometiam, em média, 5% das superfícies de corte estudadas, chegando ocupar até 40% em um determinado animal aos 120 d.p.i..

Calomys callosus:

Nestes animais, pôde-se observar pneumonite intersticial não granulomatosa composta por macrófagos, linfócitos, neutrófilos e alguns eosinófilos, ocupando aos sete d.p.i., entre 60 e 90% das secções histológicas examinadas, sendo gradualmente substituída por pneumonite granulomatosa, que fora identificada a partir dos 15 d.p.i., com granulomas em geral frouxos, multifocais e coalescentes, numa proporção que variou entre 20% a 100% dos animais estudados, observados até no final do experimento. A ocupação do granuloma foi de menos de 10% nos períodos iniciais (15 d.p.i.), chegando a 100% em um animal aos 90 d.p.i., mostrando localização inicial no espaço peribronquiolar. Sua constituição foi caracterizada pela presença de células gigantes multinucleadas (tipo Langhans), macrófagos, células epitelióides, linfócitos, plasmócitos, neutrófilos (com e sem a formação de microabscessos) e eosinófilos. Observou-se necrose pôde ser observada nos granulomas desde os 30 dias até os 120 d.p.i. (Figura 7).

No fígado também predominou a presença de granulomas desde os sete dias de observação, ocupando em média 5% da área das secções histológicas examinadas, chegando a ocupar 40% da superfície do corte em um animal avaliado aos 120 d.p.i. Os granulomas, predominantemente frouxos e multifocais, apresentaram uma constituição celular caracterizada pela presença de células gigantes multinucleadas (tipo Langhans), células epitelióides, linfócitos, neutrófilos, plasmócitos e eosinófilos. Necrose, por outro lado, foi observada a partir dos 90 d.p.i. variando de 40 a 100% nos animais testados (Figura 8).

No baço, os granulomas foram observados a partir dos 15 d.p.i. permanecendo evidentes até o final do experimento (120 d.p.i.). Em geral frouxos, multifocais e coalescentes, compostos por células gigantes multinucleadas (tipo Langhans), células epitelióides, linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos (Tabela 3). A necrose foi identificada a partir dos 90 d.p.i. mantendo-se evidente até os 120 d.p.i. Estes granulomas ocuparam, em média, 25% da área das secções histológicas examinadas, chegando até 85% em um animal aos 120 d.p.i. (Figura 9).

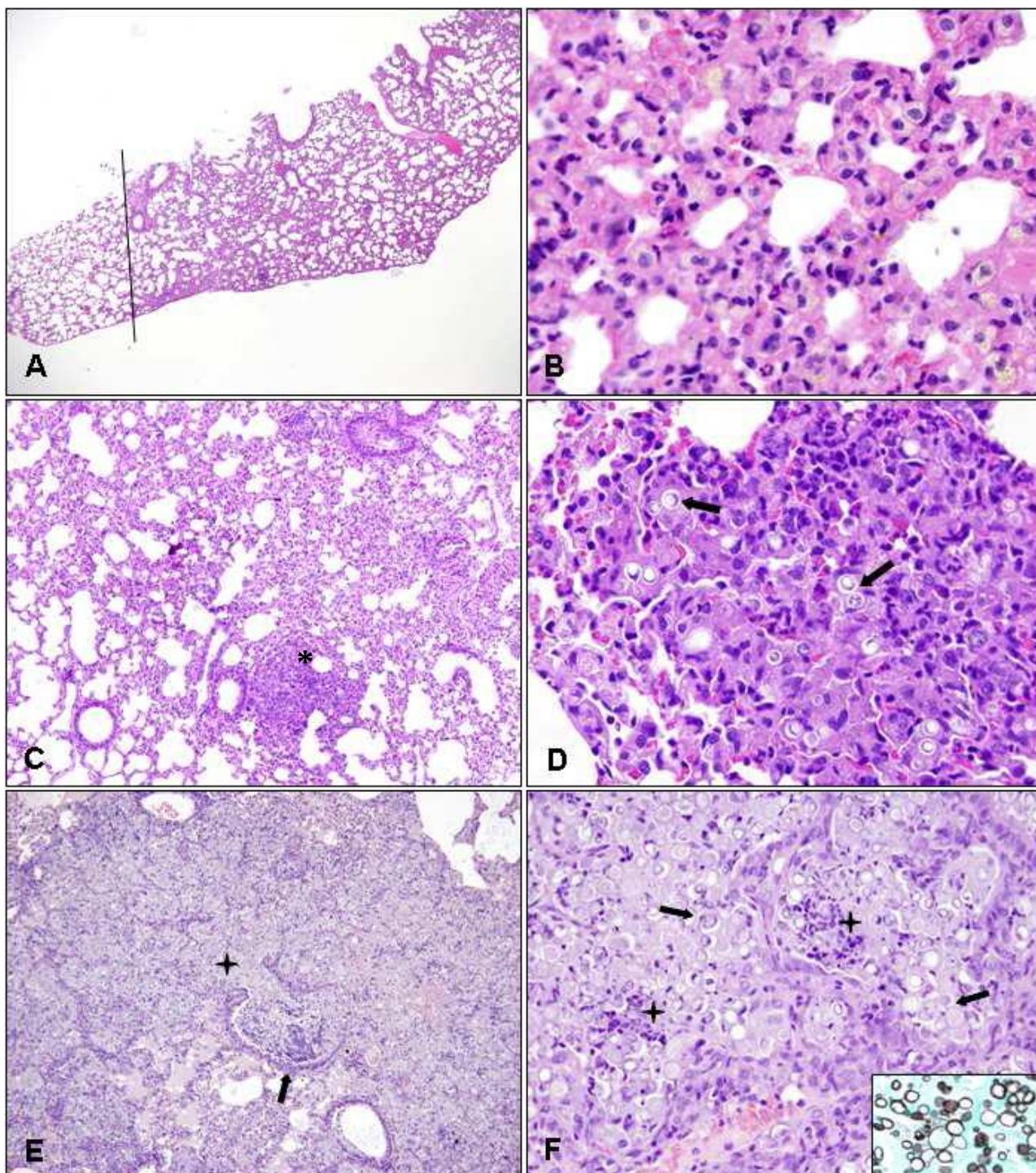


Figura 7. Aspecto histológico das lesões inflamatórias observadas no tecido pulmonar de *Calomys callosus*, conforme a cronologia do experimento. (A): aos sete d.p.i., a maior parte do parênquima pulmonar (*lado direito da linha*) foi difusamente permeado pelo exsudato (Objetiva: 4x, coloração HE). (B): detalhe do exsudato inflamatório mostrando histiócitos e neutrófilos permeando o tecido conectivo do septo interalveolar (Objetiva: 40x, coloração HE). (C): aos 30 d.p.i., lesão granulomatosa organizada(*) (Objetiva: 10x, coloração HE). (D): detalhe do granuloma com a presença de fungos visualizados dentro de células de Langhans (*seta*) (Objetiva: 40x, coloração HE). (E): aos 90 d.p.i., substituição de todo o parênquima pulmonar por massas coalescentes de inflamação granulomatosa (♦) invadindo e destruindo os bronquíolos (*seta*) (Objetiva: 10x, coloração HE). (F) mesmo período de tempo, mostrando inflamação granulomatosa com áreas de necrose (♦) e massas de *P. brasiliensis* (*seta*) (Objetiva: 20x, coloração HE). Inserção com maior detalhe: *P. brasiliensis* na sua forma morfológica característica (Objetiva: 40x, coloração Grocott).

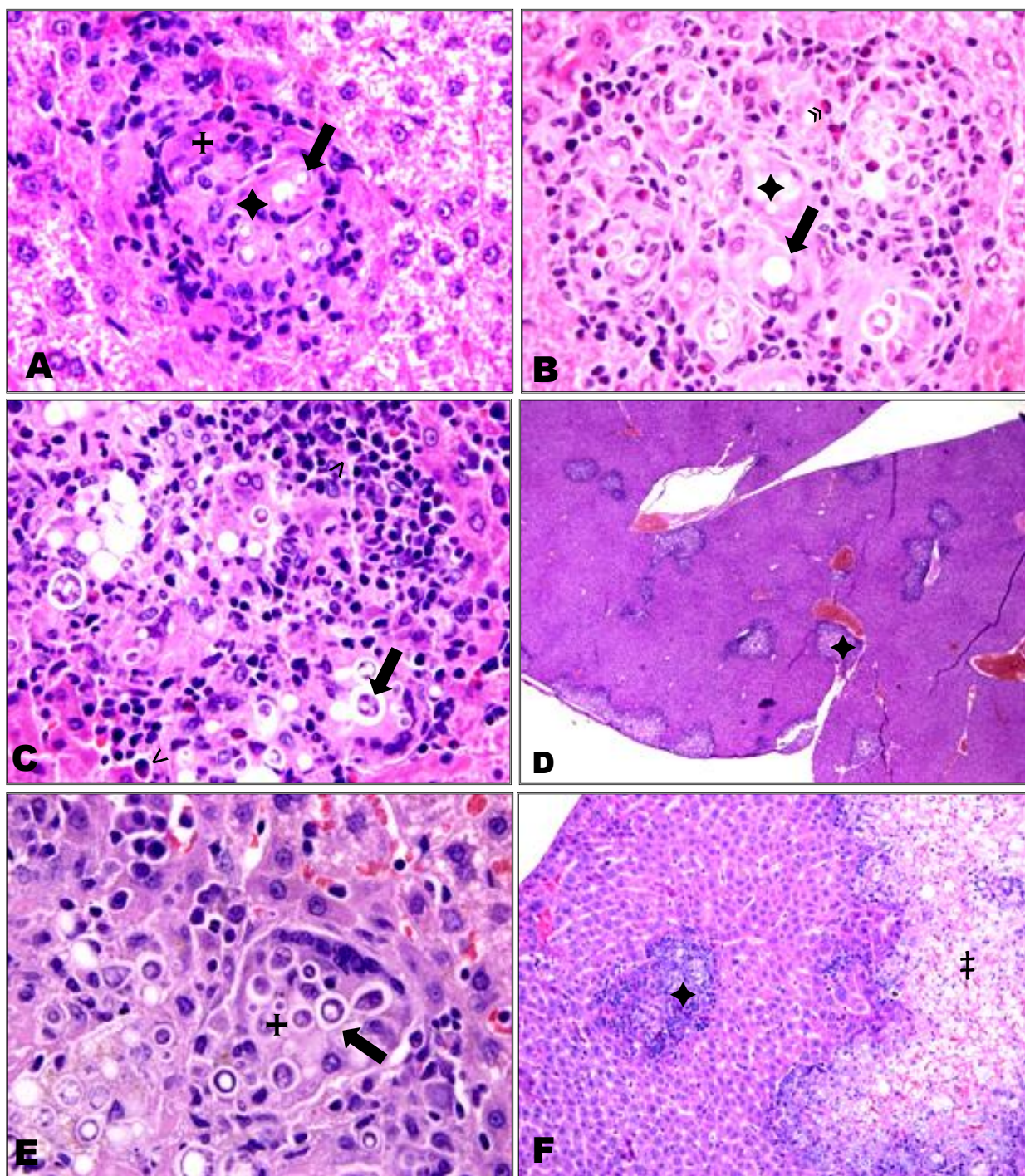


Figura 8. Aspecto histológico das lesões inflamatórias observadas no tecido hepático de *Calomys callosus*, conforme a cronologia do experimento. (A): aos sete d.p.i., presença de infiltração granulomatosa (◆) acometendo o parênquima hepático, células gigantes (+) com fungos em seu interior (seta) (Objetiva: 40x, coloração HE). (B): aos 15 d.p.i., inflamação granulomatosa bem organizada (◆) apresentando células gigantes com fungos em seu interior (seta), circundadas por macrófagos, plasmócitos, linfócitos, e eosinófilos («) (Objetiva: 40x, coloração HE). (C): aos 30 d.p.i., lesão granulomatosa organizada (◆), com células gigantes multinucleadas contendo maior número de fungos em seu interior (seta), neutrófilos, eosinófilos e plasmócitos presentes (<) (Objetiva: 40x, coloração HE). (D): aos 60 d.p.i., granulomas ocupando grandes áreas do parênquima hepático (◆) (Objetiva: 4x, coloração HE). (E): aos 90 d.p.i., inflamação granulomatosa (◆) mostrando detalhes das células gigantes com grande número de fungos em seu interior (seta) (Objetiva: 100x, coloração HE). (F) aos 120 d.p.i., mostrando inflamação granulomatosa (◆), além de área necrótica ocupando grande extensão do parênquima hepático (‡) (Objetiva: 20x, coloração HE).

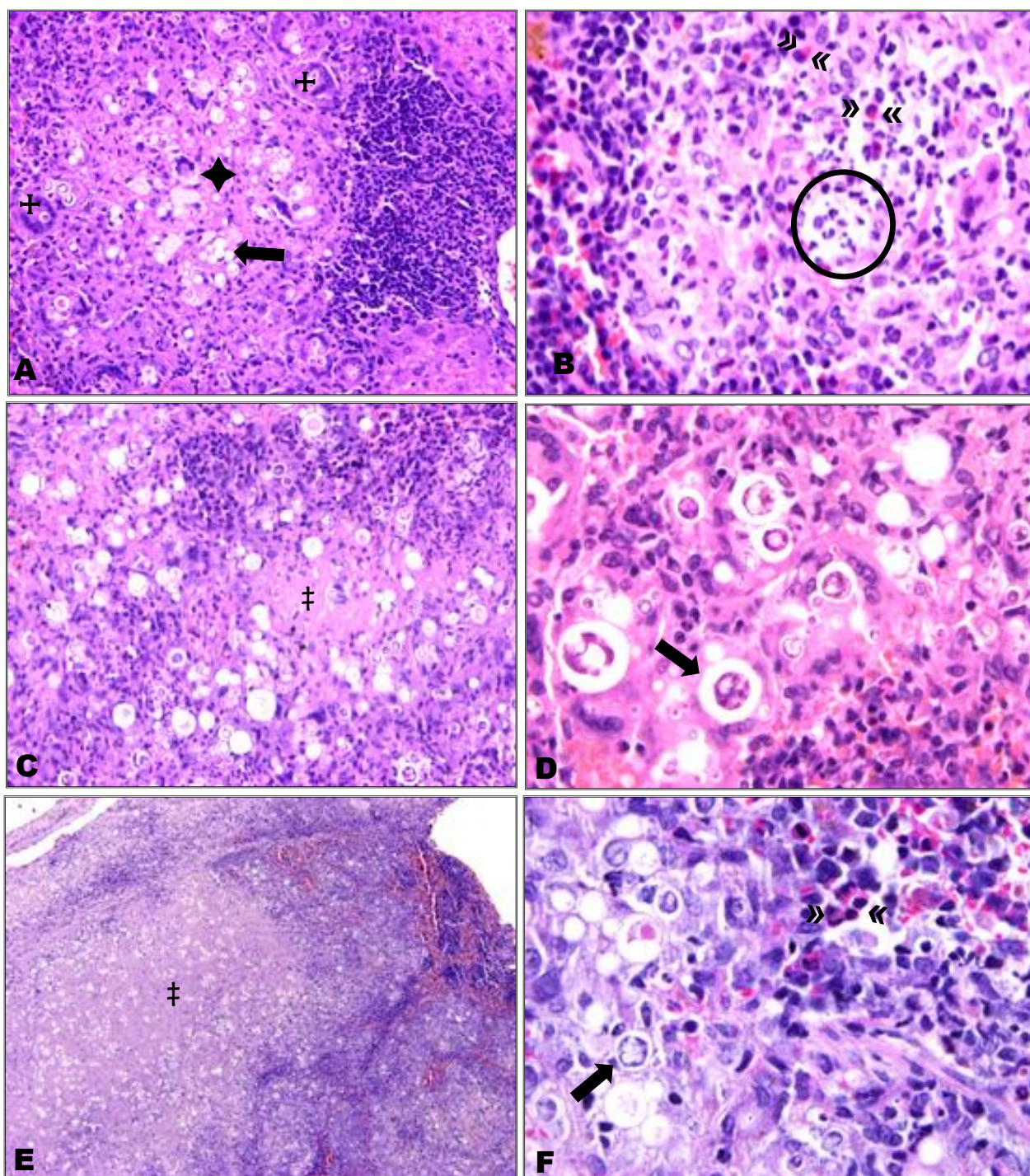


Figura 9. Aspecto histológico das lesões inflamatórias observadas no tecido esplênico de *Calomys callosus*, conforme a cronologia do experimento. (A): aos 30 d.p.i., tecido esplênico evidenciando a presença de granulomas (♦) contendo células gigantes (+) e mononucleares, com fungos em abundância (seta) (Objetiva: 10x, coloração HE). (B): aos 30 d.p.i., detalhes do granuloma mostrando neutrófilos formando microabscessos (circulo) (Objetiva: 100x, coloração HE). (C): aos 60 d.p.i., lesão granulomatosa com área de necrose central (‡). (Objetiva: 20x, coloração HE). (D): aos 60 d.p.i., granuloma composto de células gigantes contendo fungos em seu interior (seta), além de histiócitos, linfócitos, neutrófilos e plasmócitos (Objetiva: 100x, coloração HE). (E): aos 90 d.p.i., inflamação granulomatosa (♦) acometendo grande extensão do baço, com áreas de necrose (‡)(Objetiva: 4x, coloração HE). (F) aos 120 d.p.i., mostrando inflamação granulomatosa confluyente substituindo o parênquima esplênico, com a presença de eosinófilos («)(Objetiva: 40x, coloração HE).

Na Tabela 1, os granulomas observados na infecção experimental nos diferentes órgãos dos animais testados estão distribuídos segundo seus tipos mais freqüentes.

Tabela 1. Distribuição dos tipos de infiltrado granulomatoso predominantes nos animais testados em função de cada órgão examinado.

Órgãos	Animais	<i>Cronologia do experimento*</i>					
		7	15	30	60	90	120
Pulmões	A/Sn	-	-	-	-	2	-
	B10.A	-	-	2	-	2	2
	<i>C. callosus</i>	-	1	2	2	3	3
Fígado	A/Sn	1	1	3	2	-	-
	B10.A	2	2	2	3	2	2
	<i>C. callosus</i>	2	2	3	3	3	3
Baço	A/Sn	-	2	1	2	-	1
	B10.A	-	-	2	2	3	3
	<i>C. callosus</i>	-	2	2	-	3	3

* dias pós-infecção

1 – infiltrado inflamatório granulomatoso (granulomas) sem presença de plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos.

2 – Infiltrado inflamatório granulomatoso (granulomas) com a presença de plasmócitos, neutrófilos (com ou sem microabscessos) e eosinófilos;

3 – Granulomas do tipo 2, acrescido de necrose por coagulação.

Na Figura 10 encontram-se distribuídos os percentuais de área ocupada pelos granulomas paracoccidioídicos nos diferentes grupos de animais testados e dos órgãos avaliados, seguindo a cronologia do experimento. Os achados aí demonstrados reforçam a maior extensão de comprometimento orgânico pela infecção experimental em *C. callosus* comparativamente aos outros animais infectados.

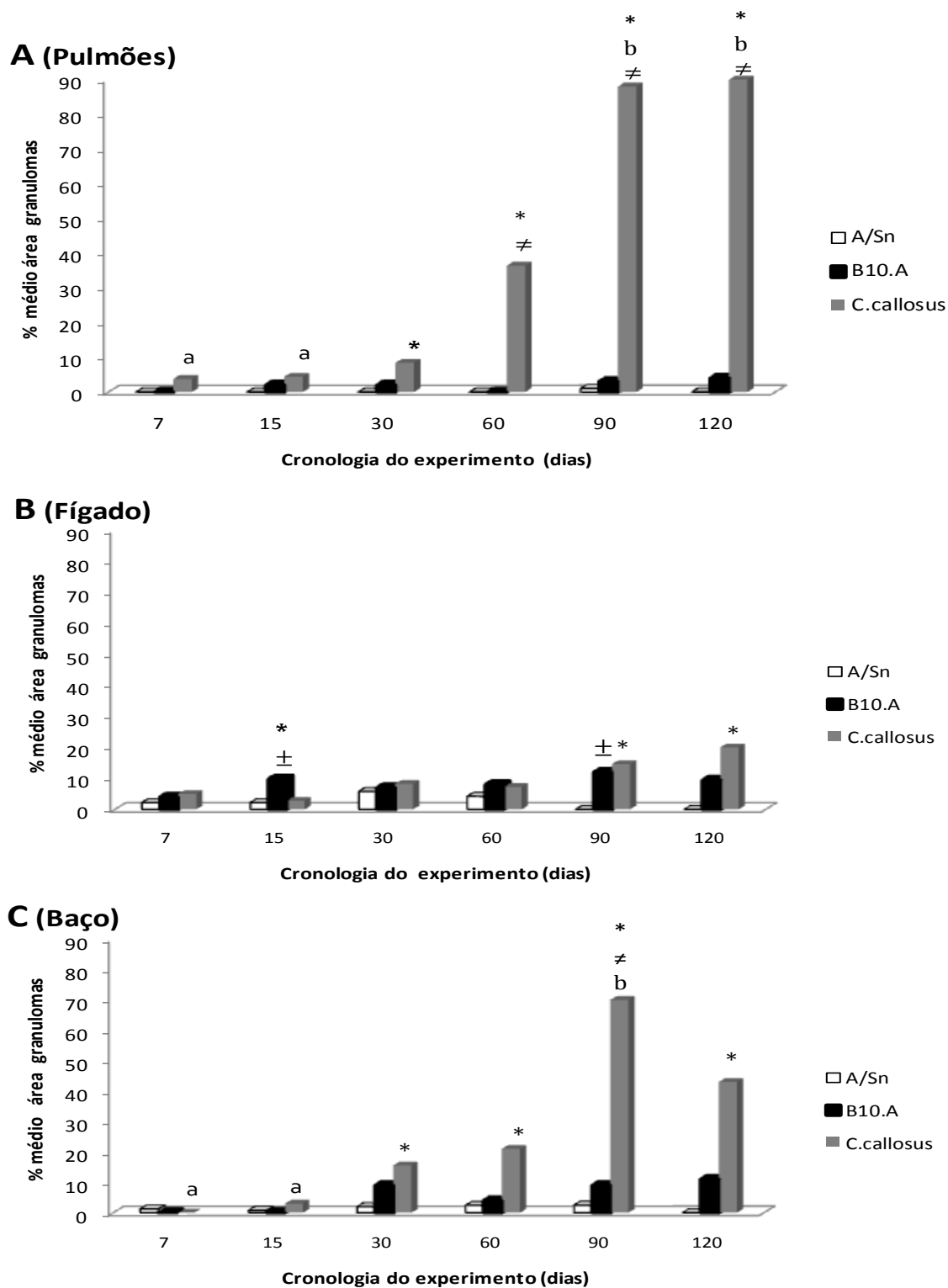


Figura 10. Percentuais médios de áreas acometidas pelos granulomas nos fragmentos de pulmões (A), fígado (B) e baço (C), provenientes dos diferentes animais estudados, seguindo a cronologia do experimento (em dias). Os símbolos * e ≠ demonstram haver diferença estatística entre o *C. callosus* e os camundongos A/Sn e B10.A, respectivamente. O símbolo ± demonstra haver diferença estatística entre o camundongo B10.A e o A/Sn. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos dentro do mesmo período ($p < 0,05$).

4.4. Avaliação da fibrose

As Figuras 11, 12 e 13 retratam a percepção da fibrose observada nos granulomas, considerando a presença e a semiquantificação do colágeno tipo III e tipo I, ao longo dos períodos de observação experimental. Na Figura 14, estas observações foram condensadas considerando os períodos inicial (7 a 30 d.p.i.) e final (60 a 120 d.p.i.). A avaliação semi-quantitativa, através da média obtida dos escores encontrados pela coloração de tricrômico de Masson para colágeno tipo I, mostrou, nos diferentes órgãos do camundongo resistente A/Sn, ausência na formação de colágeno tipo I nos pulmões. Deposição de colágeno tipo I aos 30 d.p.i., e principalmente 60 d.p.i., foram apreciadas no fígado, enquanto que no baço quantidade pequena e isolada foi vista somente aos 60 d.p.i. (Figura 11).

Os camundongos B10.A apresentaram no fígado e no baço maior produção de colágeno tipo I entre 15 e 120 d.p.i., sendo que no fígado isto ocorreu especialmente nas fases finais do experimento (Figura 12).

C. callosus evidenciaram menores quantidades de colágeno tipo I, observados no fígado, e nos pulmões. Nas fases mais iniciais do experimento, este colágeno foi produzido no baço (Figura 13).

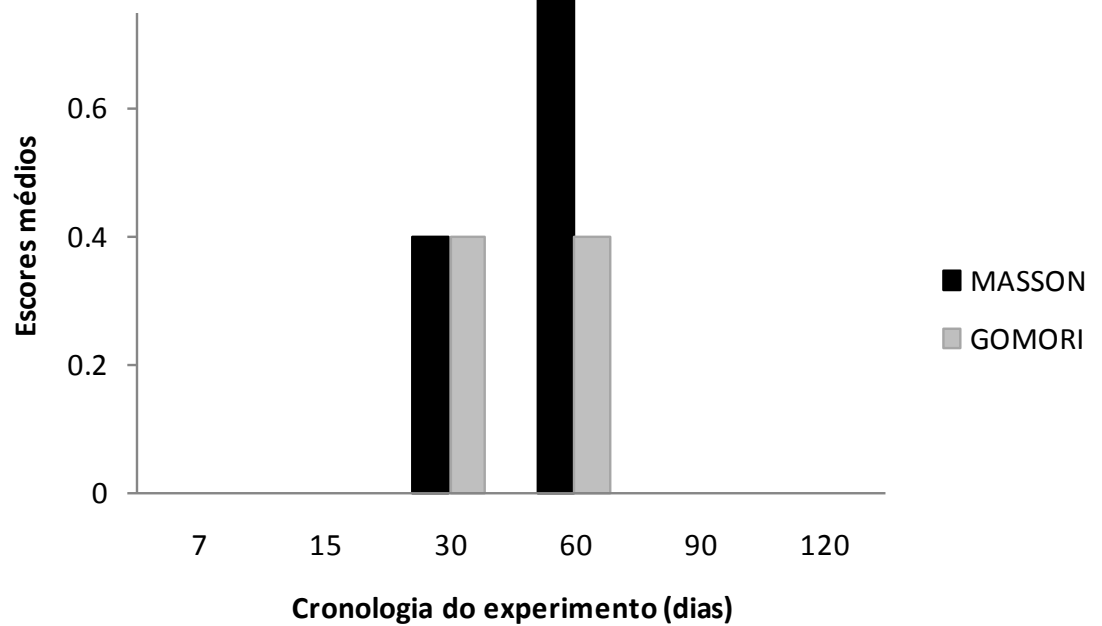
A análise dos fragmentos teciduais corados pela reticulina Gomori evidenciou, nos três órgãos estudados, quantidades de colágeno tipo III em *C. callosus* semelhantes às encontradas nos camundongos B10.A, sendo que os camundongos B10.A apresentaram colágeno tipo III presentes nos três órgãos estudados, especialmente nas fases mais tardias do experimento (Figura 14).

Nos camundongos resistentes A/Sn não foi evidenciada formação de colágeno tipo III nos pulmões, e pouco colágeno tipo III foi visto aos 30 e 60 d.p.i. no fígado; no baço, colágeno tipo III foi demonstrado em pequena quantidade dos 30 aos 90 d.p.i. (Figura 11).

Os camundongos B10.A, em contrapartida, expressaram no fígado maior deposição de colágeno tipo III, numa fase mais precoce do experimento, aos 30 dias (Figura 12).

Os animais *C. callosus* apresentaram acúmulo de colágeno tipo III, dos 15 aos 120 d.p.i., nos três órgãos estudados. Nos pulmões, houve maior produção, verificando-se entre os 15 e 120 d.p.i., tendência crescente conforme o processar dos tempos estudados (Figura 13). No baço a produção de colágeno tipo III foi semelhante em *C. callosus* e nos camundongos B10.A (Figura 14).

A
(fígado)



B
(baço)

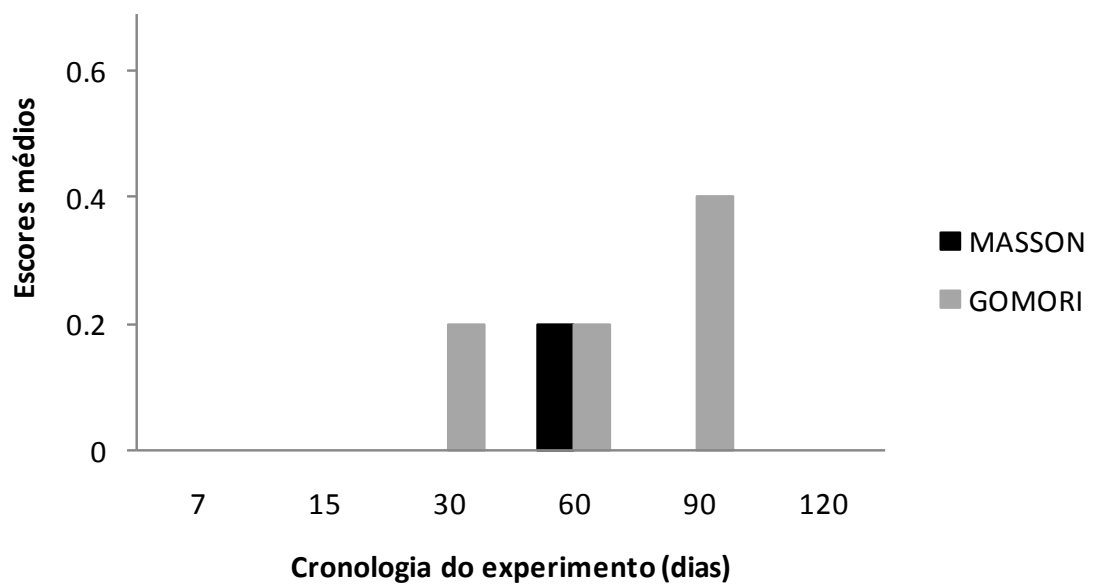


Figura 11. Comparativo entre a quantidade de colágenos tipos I e III nos camundongos A/Sn, seguindo a cronologia do experimento. (A) fígado, (B) baço.

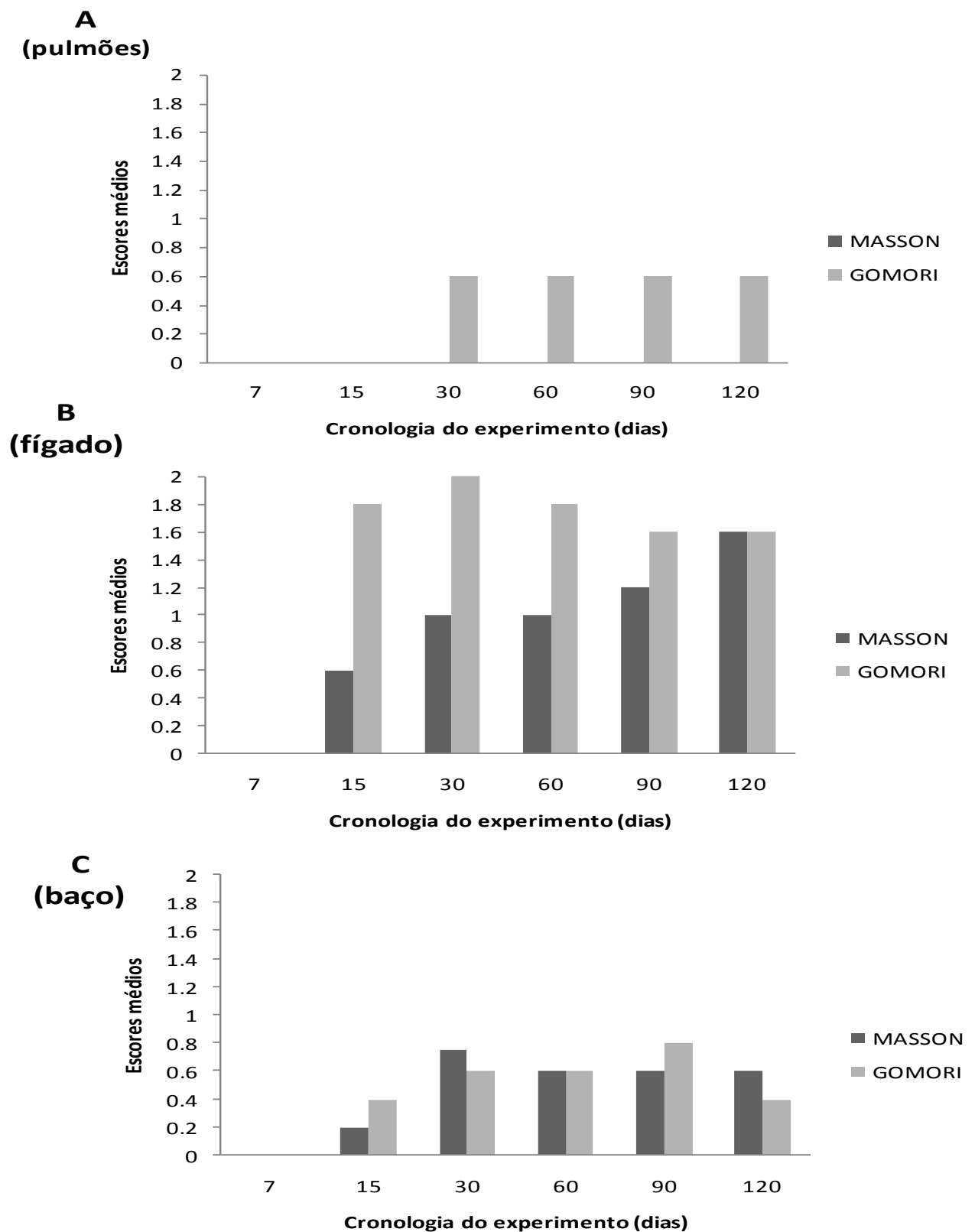


Figura 12. Comparativo entre a quantidade de colágenos tipos I e III nos camundongos B10.A, seguindo a cronologia do experimento. (A) pulmões, (B) fígado, (C) baço.

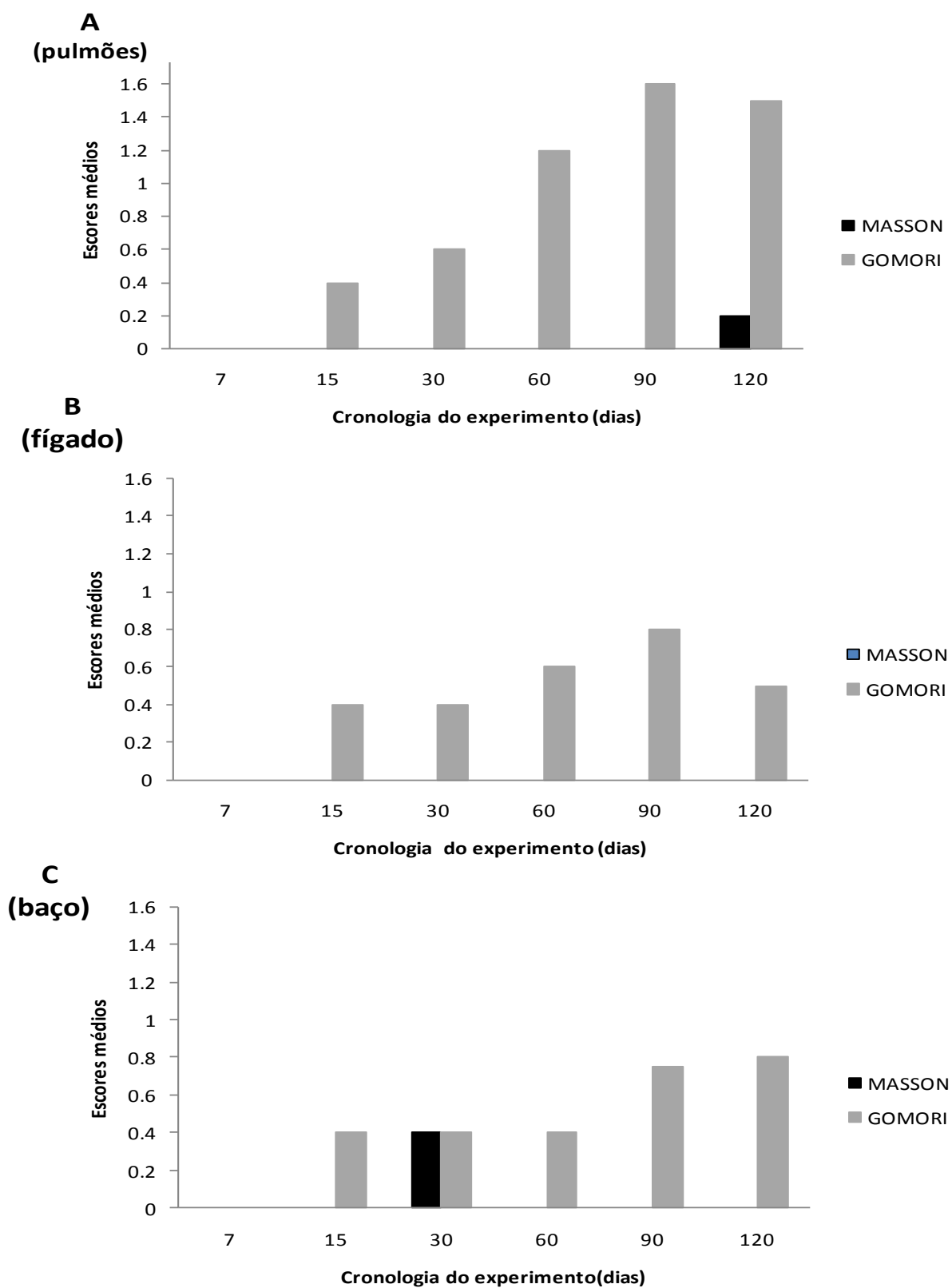


Figura 13. Comparativo entre a quantidade de colágenos tipos I e III em *C. callosus*, seguindo a cronologia do experimento. (A) pulmões, (B) fígado, (C) baço.

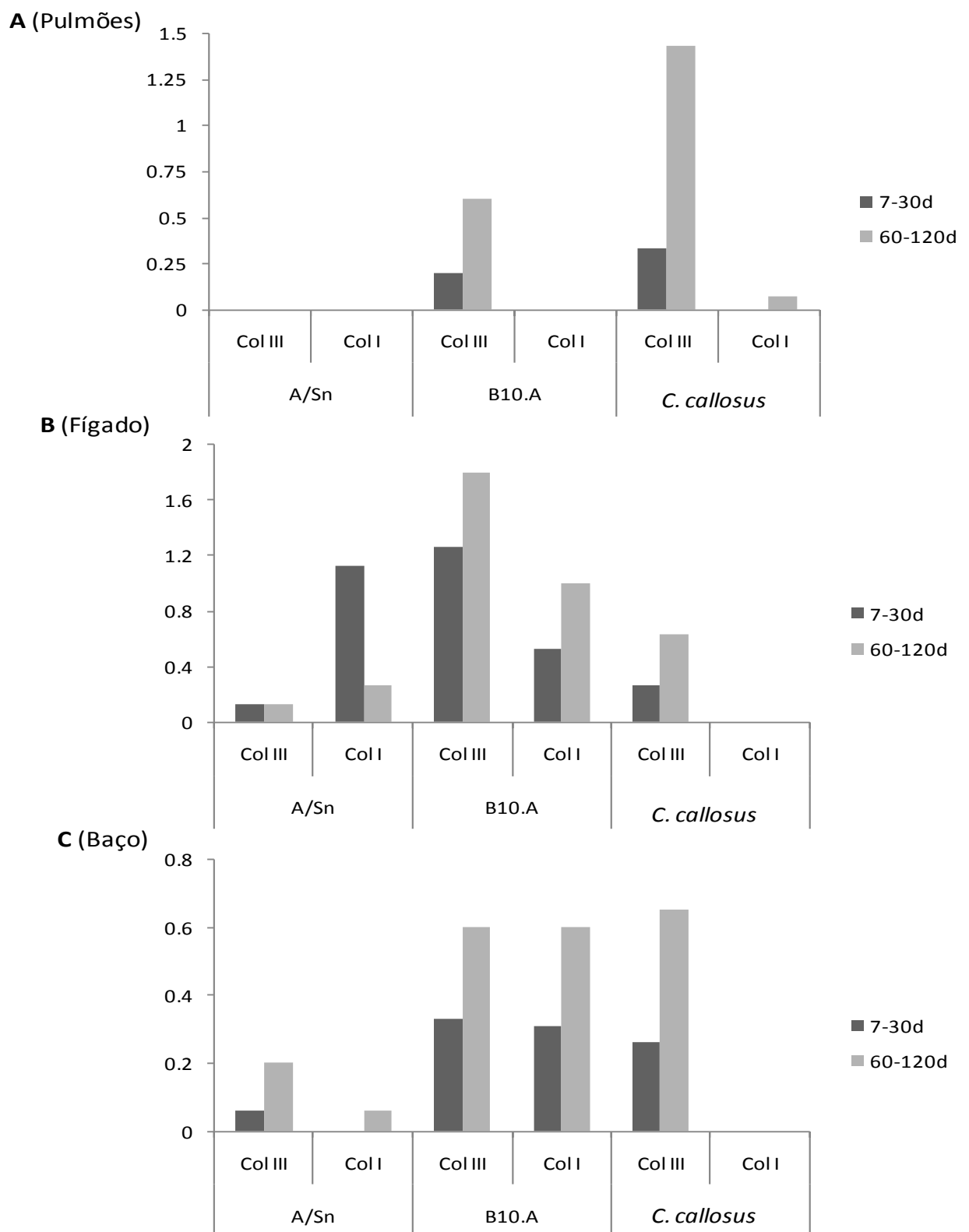


Figura 14. Análise das colorações de reticulina Gomori e tricrômico de Masson nos tecidos estudados, para quantificação e análise semiquantitativa dos colágenos III e I, respectivamente. Percentuais médios dos escores obtidos para os colágenos III e I nos granulomas nos fragmentos de pulmões (A), fígado (B) e baço (C), provenientes dos diferentes animais estudados, observados em dois períodos (inicial e final) do experimento (em dias).

4.5 Análise microbiológica

4.5.1 Pesquisa direta de fungos

Maior número de animais positivos para *P. brasiliensis* foi observado entre *C. callosus*, seguidos dos camundongos B10.A e A/Sn, independentemente do órgão analisado. Todavia, as maiores diferenças nos percentuais de positividade para pesquisa direta de fungo foram observadas nos pulmões, a partir de 30 d.p.i (Figuras 15 e 16).

Quando analisados os percentuais de positividade do exame micológico direto em cada grupo de animais estudados, considerando-se o conjunto dos órgãos, observou-se que estes valores foram expressivamente maiores em *C. callosus*, em todos os tempos estabelecidos para o experimento. Nos camundongos B10.A estes valores tornaram-se positivos a partir do sétimo dia alcançando valores percentuais maiores aos 15 e 30 dias do experimento, com posterior declínio até os 120 dias; nos camundongos A/Sn valores percentuais foram positivos ao longo de todo o experimento, com maior expressividade aos 60 dias, declinando aos 120 dias (Figura 15). Analisando-se separadamente os órgãos, observou-se nos pulmões valores percentuais maiores de positividade do exame micológico direto em *C. callosus*, seguidos pelos camundongos B10.A. Os pulmões dos camundongos A/Sn apresentaram sempre valores nulos ao longo de todo o experimento. Em relação ao fígado, foram observados valores percentuais de positividade ao exame micológico direto em *C. callosus*, ao longo de todo o experimento, enquanto que nos camundongos B10.A estes valores percentuais comportaram-se de maneira oscilante, sendo sempre inferiores àqueles encontrados no fígado de *C. callosus*. Valores percentuais positivos no fígado dos camundongos A/Sn foram encontrados somente aos 60 dias do experimento. Comparativamente, o baço de *C. callosus* foi o que obteve maior positividade, sobretudo aos 30 dias de observação; nos camundongos B10.A encontrou-se valores alternantes; os camundongos A/Sn tiveram valores percentuais sempre positivos, expressando maior positividade aos sete dias (Figura 15).

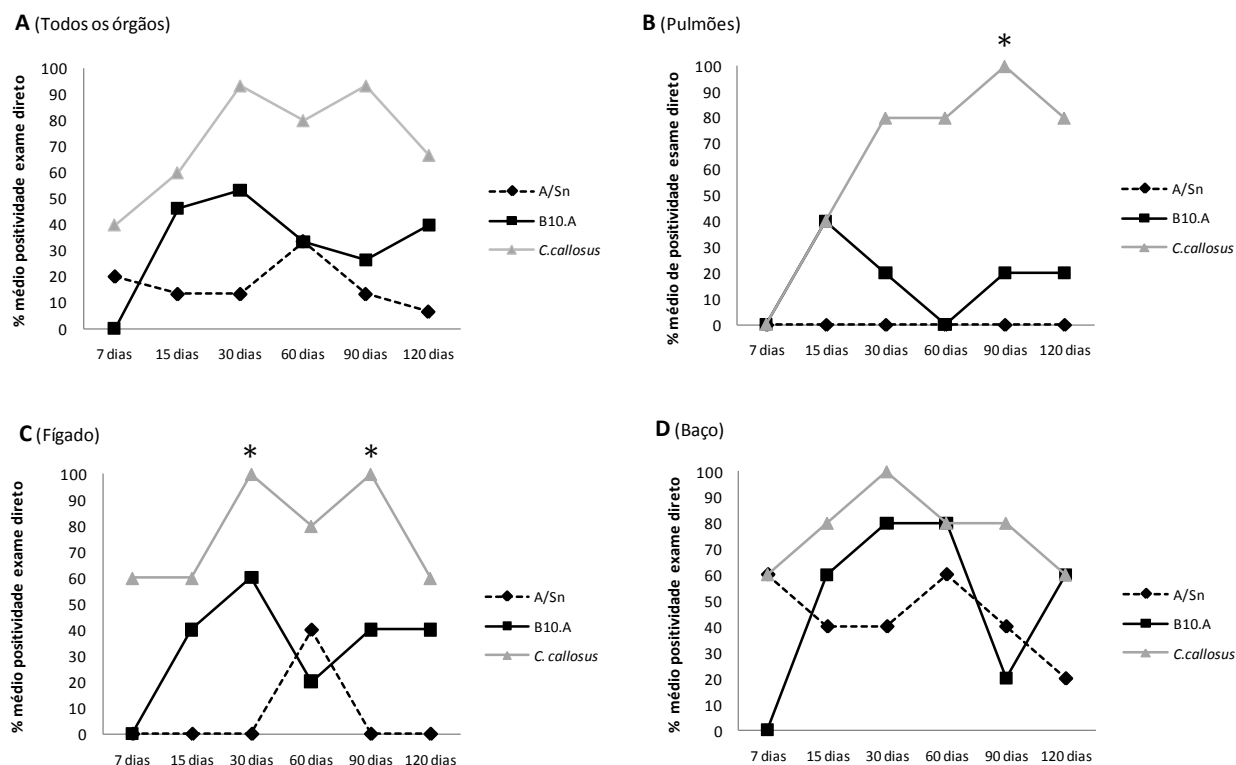


Figura 15. Valores percentuais de positividade para *P.brasiliensis*, cepa Pb18, obtidos por meio de exame micológico direto, para cada órgão estudado, distribuídos segundo os animais testados em seis períodos de observação distintos. (A) Todos os órgãos (total), (B) pulmões, (C) fígado, (D) baço. O símbolo * demonstra haver diferença estatística entre *C. callosus* e o camundongo A/Sn.

Em todos os órgãos estudados, tanto isolada como conjuntamente, os animais *C. callosus* evidenciaram valores percentuais maiores de positividade ao exame micológico direto, tanto no período inicial da infecção quanto no período final (Figura 16).

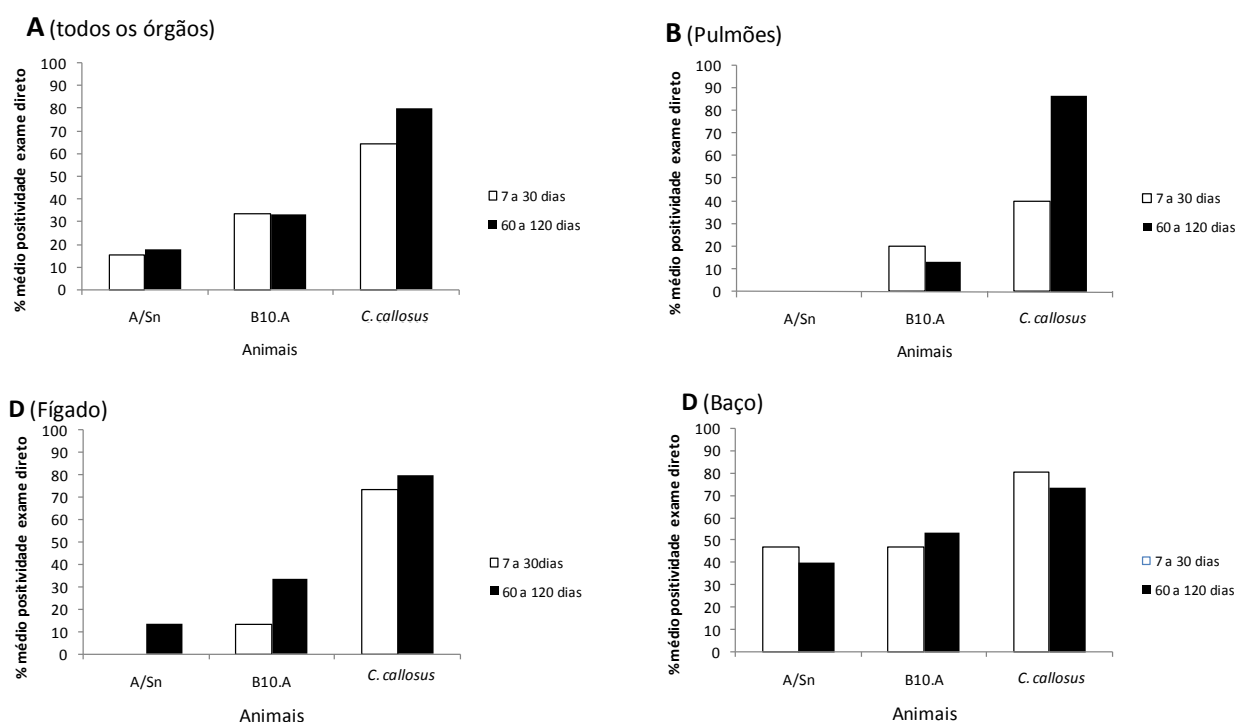


Figura 16. Valores percentuais de positividade para *P. brasiliensis*, cepa Pb18, obtidos por meio de exame micológico direto, para cada órgão estudado, distribuídos segundo os animais testados em dois períodos de observação distintos. (A) Todos os órgãos (total), (B) pulmões, (C) fígado, (D) baço.

4.5.2 Cultura para *P. brasiliensis*

A cultura de fungos em ágar Mycosel mostrou que em *C. callosus* o pulmão foi o órgão que apresentou maior percentual de positividade para *P. brasiliensis*, com positividade de 50%, seguido pelo baço com 30%. Nos camundongos A/Sn houve maior percentual de positividade no baço (23%), seguido dos pulmões (13%) (Figuras 17, 18 e 19). Já para os animais B10.A, positividade maior foi observada nos pulmões, seguida pelo baço e fígado com valores muito aproximados.

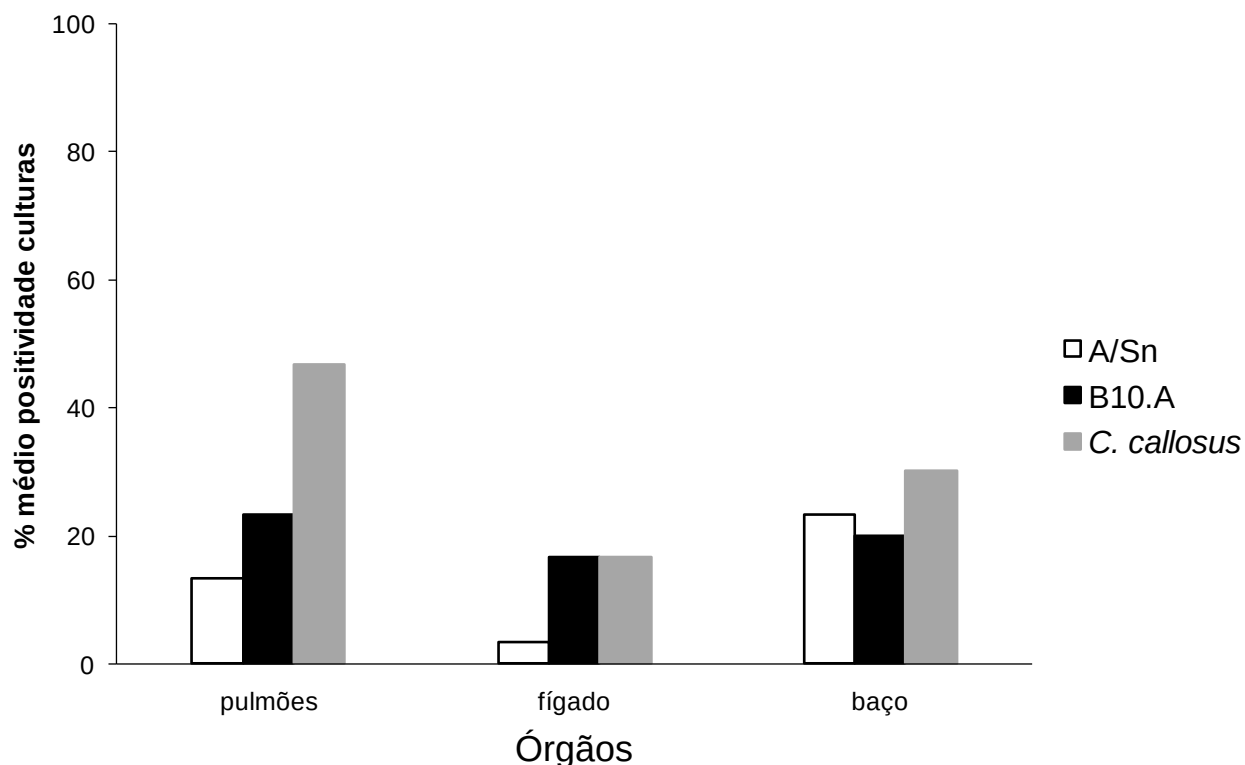
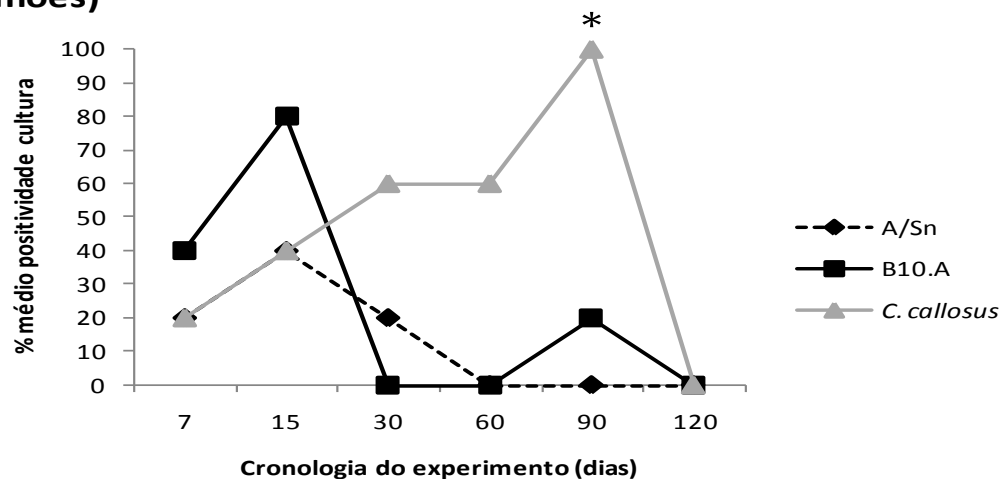


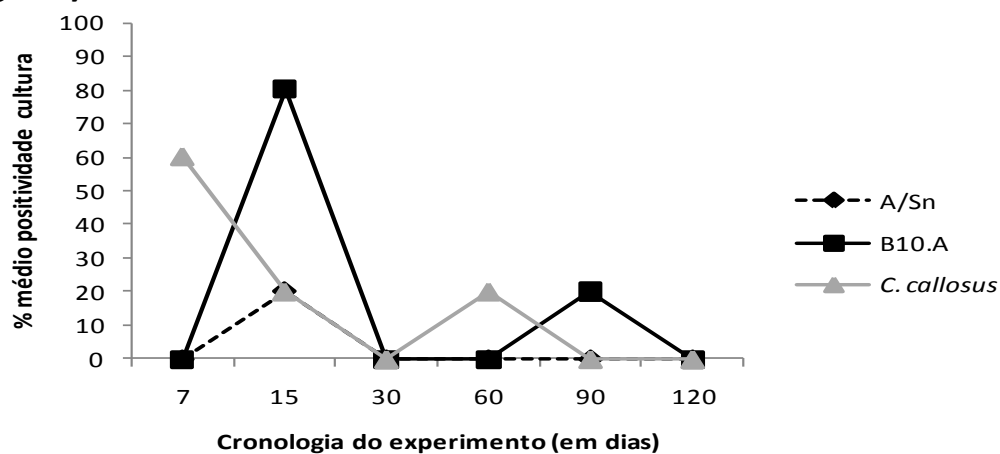
Figura 17. Proporção de culturas positivas para *P. brasiliensis*, cepa Pb18, expressas em valores percentuais, distribuídos segundo os órgãos avaliados nos diferentes grupos de animais testados.

Analisando os resultados cronologicamente, pode-se observar que nos camundongos resistentes (A/Sn) o baço mostrou uma positividade de 60% no sétimo e no 15º dias, declinando a zero a partir do 60º dia. Os pulmões tiveram 40% de positividade aos 15 dias pós-inóculo, declinando a zero a partir do 60º dia de observação. Houve comportamento paradoxal no grupo dos animais B10.A, em todos os três órgãos estudados, especialmente no período entre 30 e 60 dias do transcorrer do experimento, onde os valores percentuais de culturas positivas oscilaram de forma inconstante. Em *C. callosus* observou-se nos pulmões um percentual de positividade ascendente a partir do início do experimento, com um pico aos 90 d.p.i., quando então declinou a zero aos 120 dias. No baço e no fígado o percentual de culturas positivas foi maior no 15º dia (80%) e 7º dia (60%), respectivamente (Figura18).

A (Pulmões)



B (Fígado)



C (Baço)

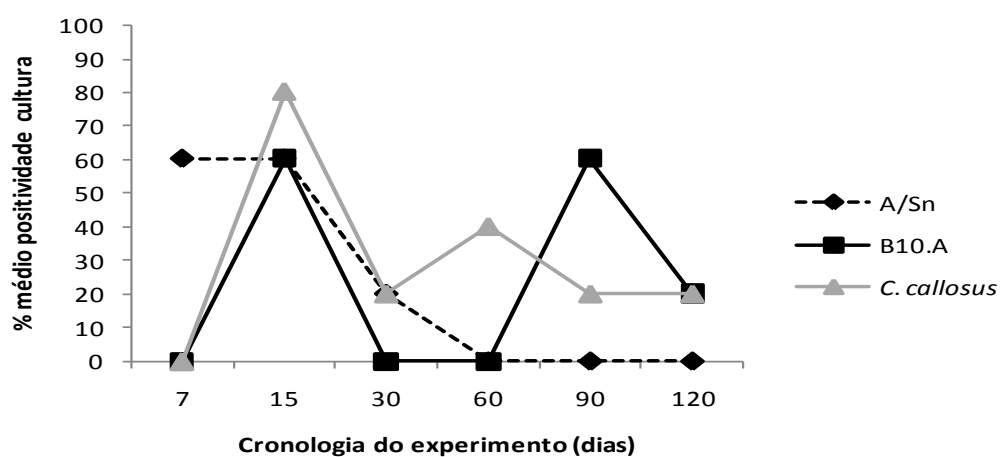


Figura 18. Proporção de culturas positivas para *P. brasiliensis*, cepa Pb18, expressas em valores percentuais, distribuídos segundo os órgãos avaliados nos diferentes grupos de animais testados: camundongos A/Sn, camundongos B10.A e *C. callosus*, nos seis períodos de análise (em dias), nos (A) pulmões, (B) fígado, (C) baço.

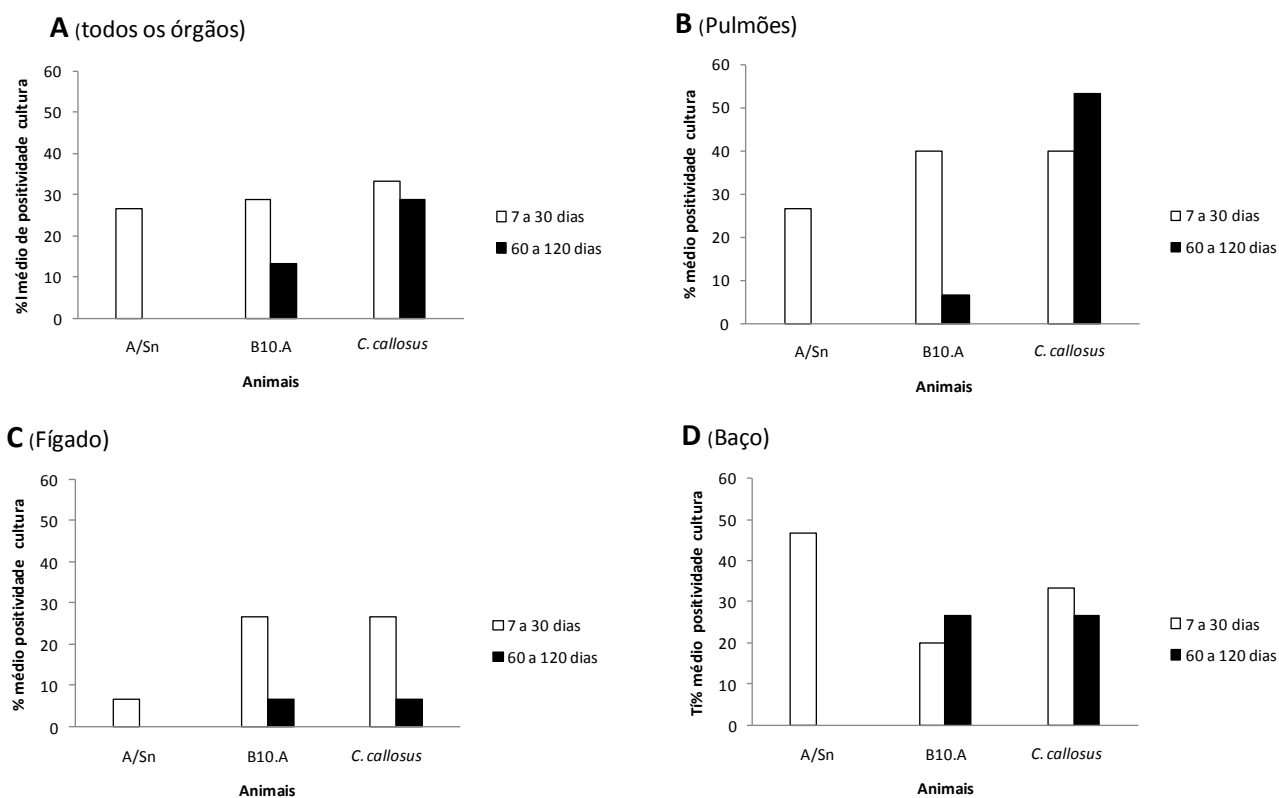


Figura 19. Percentuais de órgãos positivos para *P. brasiliensis*, cepa Pb18 por animais testados, em todos os órgãos conjuntamente (A), nos pulmões (B), no fígado (C) e no baço (D), obtidos por meio da cultura, distribuídos segundo dois períodos de observação (em dias) do experimento.

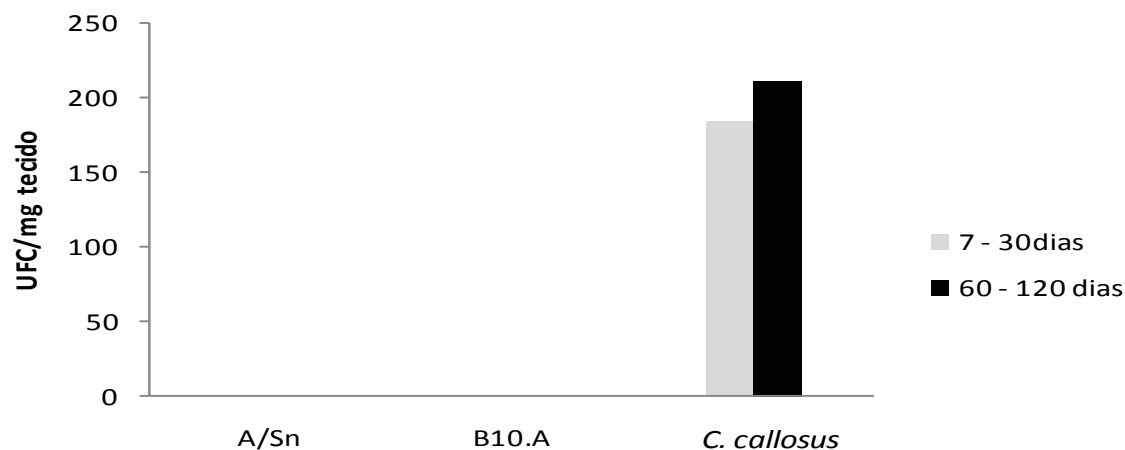
4.5.3 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias

O maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi encontrado nos pulmões de *C. callosus* a partir do 15º d.p.i. até o final do experimento, com valores mais altos que aqueles observados para os outros animais. A Tabela 4 e a Figura 20 mostram os mencionados dados, considerando sua distribuição em todos os períodos de observação e nas fases inicial e final do experimento, respectivamente.

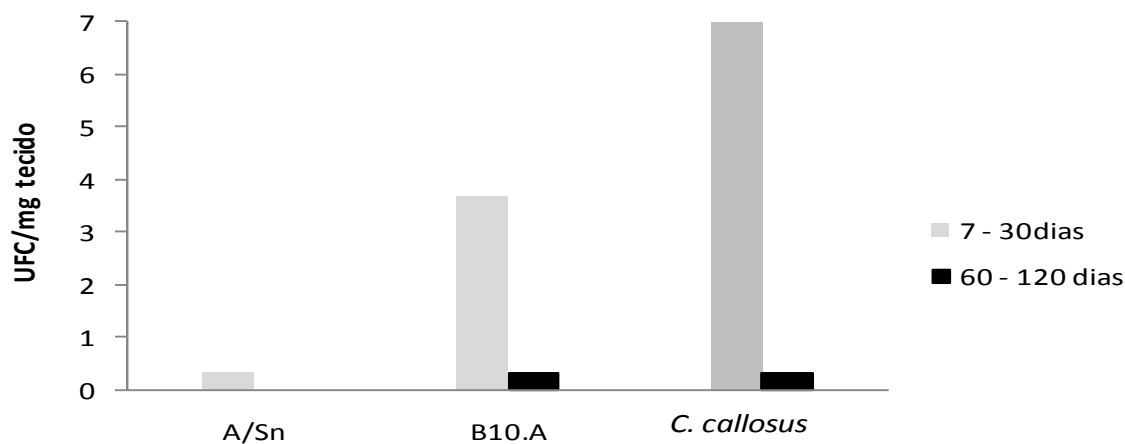
Tabela 2. Valores de UFC/mg de tecido obtidos em todos os órgãos conjuntamente, em cada grupo de animais estudados, conforme cronologia do experimento.

Órgãos	Animais	Cronologia do experimento					
		7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
Pulmões	A/Sn	1	6	1	0	0	0
	B10.A	5	6	0	0	1	0
	<i>C. callosus</i>	13	202	340	190	443	0
Fígado	A/Sn	0	1	0	0	0	0
	B10.A	0	11	0	0	1	0
	<i>C. callosus</i>	20	1	0	1	0	0
Baço	A/Sn	3	3	1	0	0	0
	B10.A	0	7	0	0	1	1
	<i>C. callosus</i>	1	38	2	7	8	1

A (Pulmões)



B (Fígado)



C (Baço)

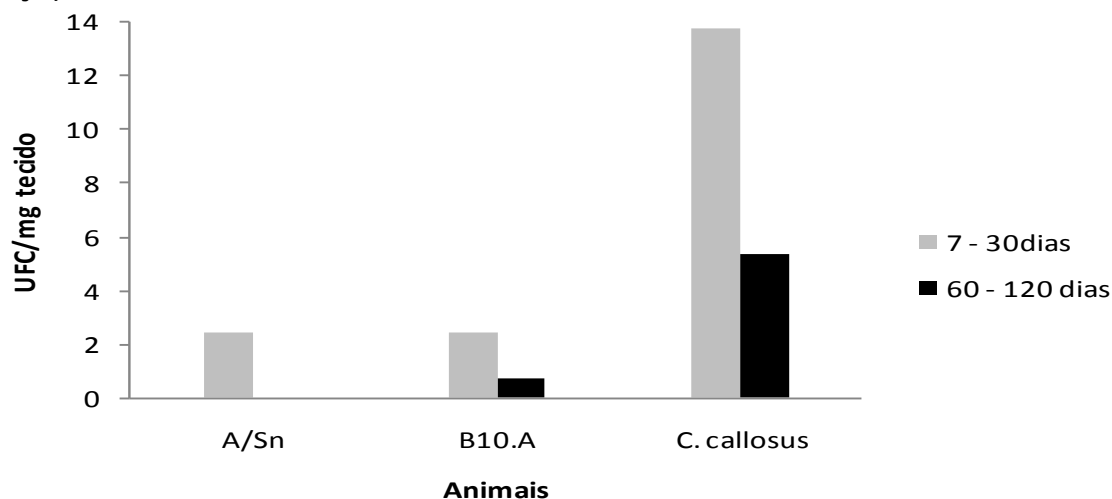


Figura 20. Contagem média de UFC/mg de tecido obtida nos períodos inicial (7 a 30 dias) e final (60 a 120 dias) do experimento. *C. callosus* mostrou número médio maior de UFC/mg de tecido, em todos os órgãos na primeira metade do experimento, exceto no fígado e no baço em que valores semelhantes foram encontrados, entretanto somente na metade final do experimento. Valores inexpressivos foram encontrados nos pulmões dos camundongos B10.A e A/Sn.

4.6 Avaliação semiquantitativa dos fungos nas secções teciduais

4.6.1 Fungos viáveis

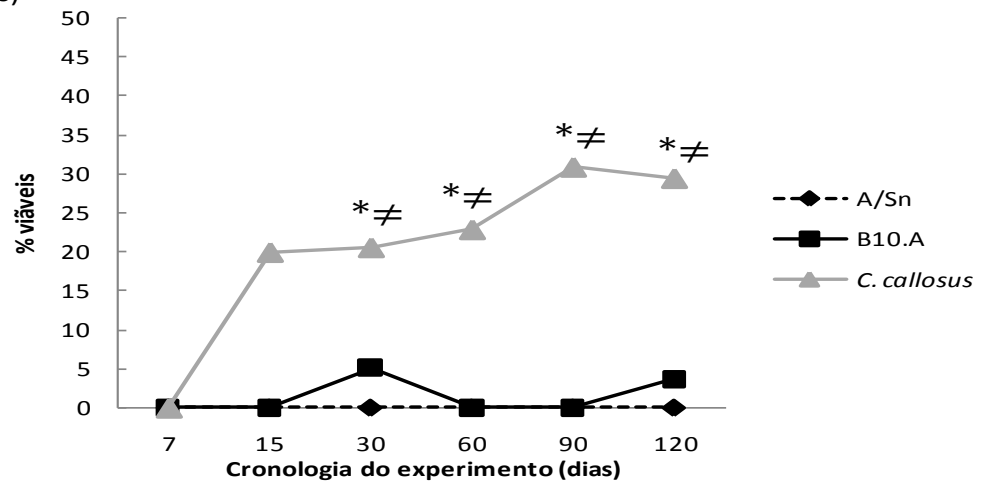
Para os animais A/Sn não foram identificados fungos viáveis nos pulmões e no baço, até os 30 d.p.i. No fígado, pode-se observar elevação aos 30 d.p.i., com pico de percentual aos 60 dias, e decréscimo gradativo até os 90 dias, quando não foi mais identificado.

Para os animais B.10A houve uma maior variação quanto ao percentual de fungos viáveis ao longo do experimento e nos diferentes órgãos examinados. Tanto no fígado como no baço, maiores percentuais de fungos viáveis foram identificados nas fases iniciais do experimento, com um pico aos 15 dias pós-infecção, sendo 34% no fígado e 12% no baço. Entretanto, nestes órgãos houve um acentuado decréscimo subsequente, chegando próximo de 10% no final do experimento. No fígado e no baço, o pico se deu aos 30 dias, num percentual menor do que aqueles encontrados para fígado e baço com 15 dias. Pode-se ainda identificar fungos viáveis ao final do experimento, cujos valores foram mais próximos daqueles obtidos no início do experimento.

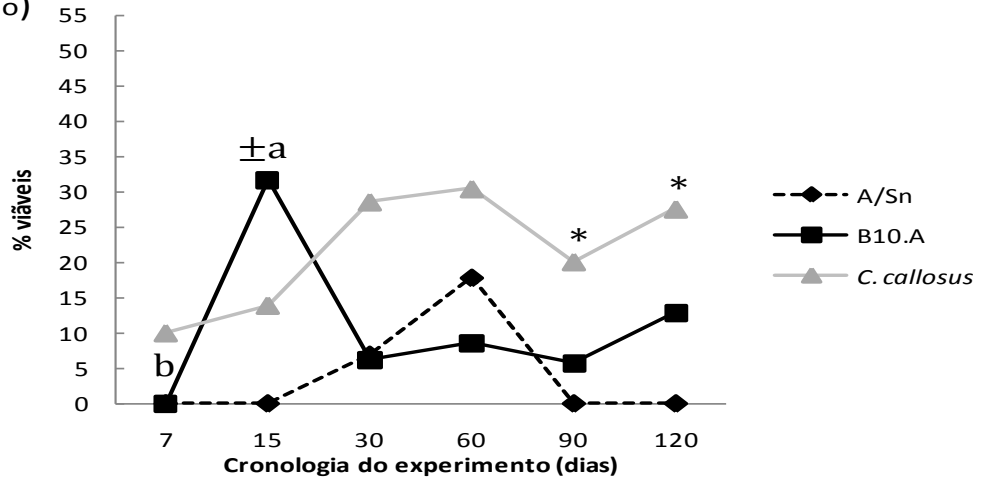
Para *C. callosus* fungos viáveis foram identificados desde o 7º d.p.i. no fígado e a partir do 15º dia pós-infecção nos pulmões, com picos aos 60 d.p.i. e 90 d.p.i., respectivamente. Já para o baço, o pico foi identificado, aos 30 dias pós-infecção. Em todos os órgãos, os percentuais de fungos viáveis encontrados para *C. callosus* na fase final do experimento foram maiores que aqueles observados para os outros animais.

Na Figura 21 pode-se observar os percentuais de fungos viáveis observados de forma comparativa entre os três grupos de animais testados, para cada órgão em particular.

A (Pulmões)



B (Fígado)



C (Baço)

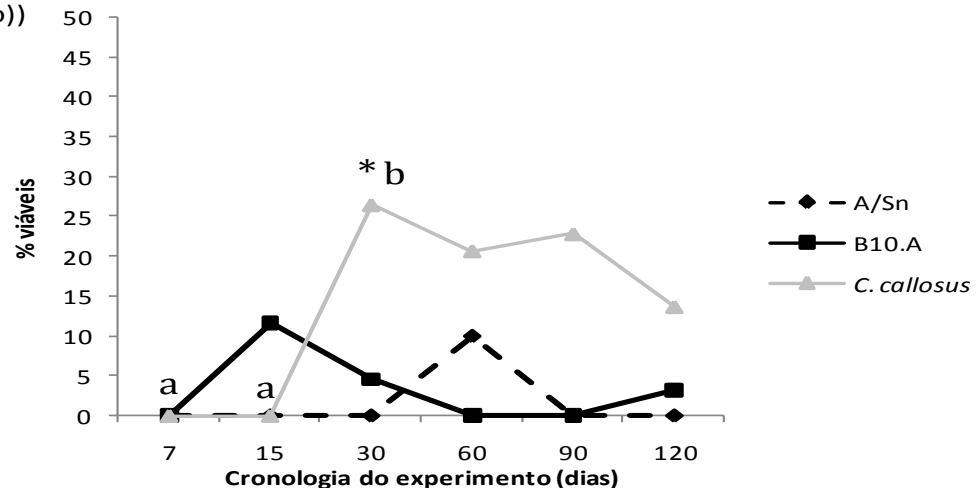


Figura 21. Percentual de fungos viáveis identificado nos órgãos avaliados dos diferentes grupos de animais testados, em função da cronologia do experimento. (A) pulmões, (B) fígado, (C) baço. Os símbolos * e ≠ demonstram haver diferença estatística entre *C. callosus* e os camundongos A/Sn e B10.A, respectivamente. O símbolo ± demonstra haver diferença estatística entre o camundongo B10.A e o A/Sn. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos dentro do mesmo período ($p < 0,05$).

4.6.2 Brotamentos fúngicos viáveis

Os resultados revelaram que em *C. callosus* houve um maior percentual de brotamentos identificados no fígado e nos pulmões, em relação aos percentuais encontrados para os camundongos A/Sn e B10.A. Esta diferença, aparentemente, revelou-se maior nos pulmões. No baço pode-se verificar um padrão de percentual de brotamentos semelhante entre os camundongos B10.A e *C. callosus*. Todavia, os picos de contagem para os camundongos B10.A se deram precocemente em relação aos resultados observados em *C. callosus*. Praticamente não foi possível identificar atividade proliferativa fúngica, dada pela identificação de brotamentos para os animais A/Sn, que foi evidenciada apenas no fígado, aos 30 dias pós-infecção. Na Figura 22 pode-se observar a distribuição dos percentuais ao longo do período de experimento nos órgãos avaliados, considerando os diferentes animais testados.

Encontrou-se a presença, ainda que esporádica e restrita, em *C. callosus*, de micélios em pequena quantidade, em 26,66% dos animais nos períodos de 30, 60 e 90 dias de experimento, nos três órgãos alvo deste estudo.

Apenas nos pulmões de *C. callosus* foi possível identificar uma correlação forte entre fungos viáveis e brotamentos, bem como entre brotamentos e áreas ocupadas pelos granulomas ($r_s=0.928$). Além disto, foi identificada correlação perfeita entre fungos viáveis e área ocupada pelos granulomas ($r_s=1$).

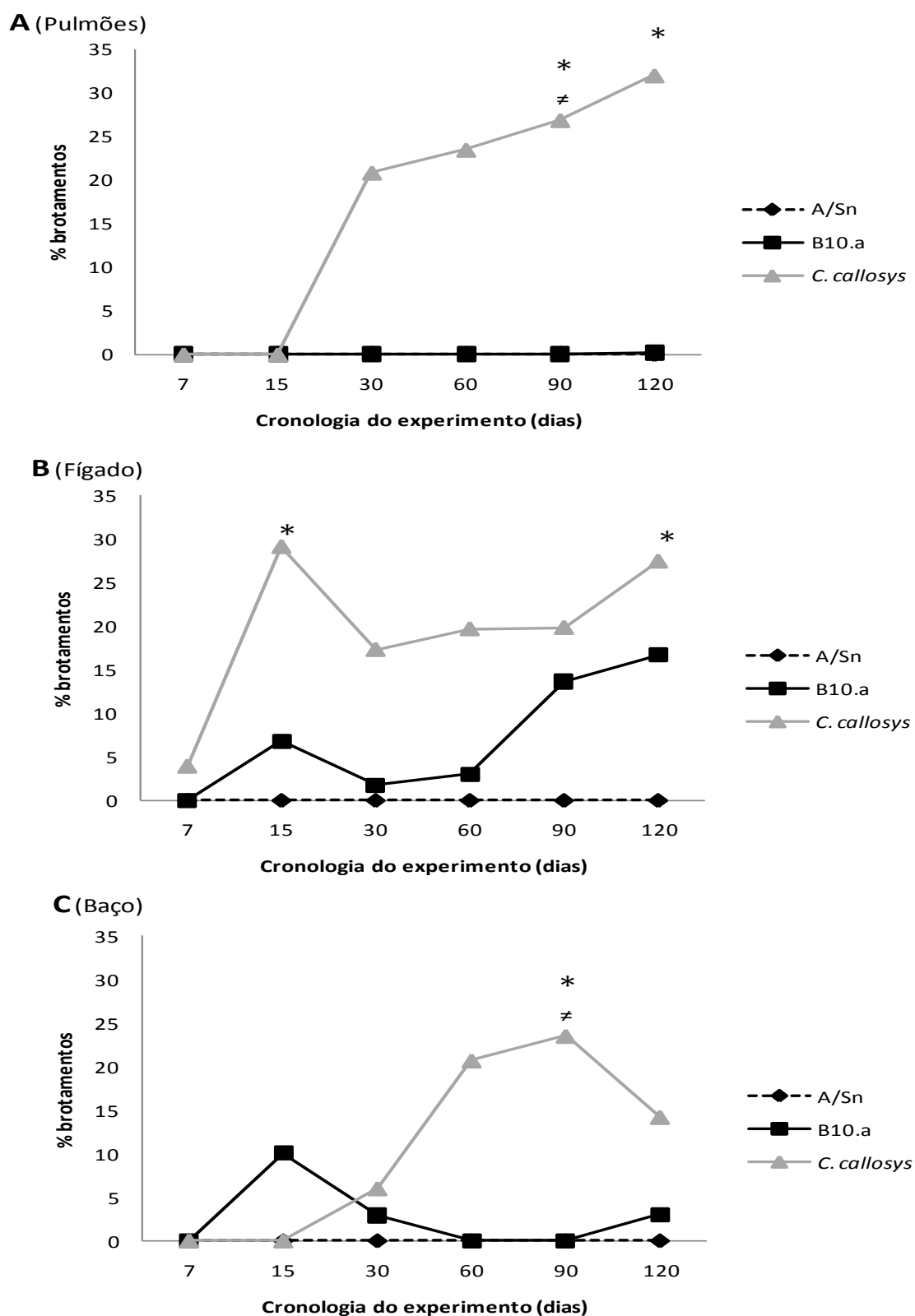


Figura 22. Proporção de brotamentos entre os fungos viáveis. Os símbolos * e ≠ demonstram haver diferença estatística entre *C. callosus* e os camundongos A/Sn e B10.A, respectivamente ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou significativa patogenicidade de *P. brasiliensis* cepa Pb18 em *C. callosus*, traduzida, na infecção i.p. experimentalmente induzida, pela gravidade da expressão da doença nestes animais, maior que a observada nos camundongos classicamente reconhecidos como susceptíveis à infecção por *P. brasiliensis*. Da mesma forma, os resultados apontaram que a cepa Pb18 mostrou-se altamente virulenta, levando a mortalidade precoce em *C. callosus*, comparativamente aos outros animais estudados. Todos *C. callosus* inoculados morreram aos 118 d.p.i.

Com a dose de inóculo utilizada ($0,6 \times 10^5$), 50% de *C. callosus* morreram até os 80 d.p.i. (Figura 6). Este achado ganha relevância tendo em vista que a dose letal média (LD_{50}), determinada em camundongos B10.A infectados i.p. com 5×10^6 do Pb18, foi de 160 d.p.i. Estes parâmetros fundamentaram a classificação destes animais como susceptíveis a infecção (CALICH et al., 1985). Em contrapartida, estes autores observaram que, sob as mesmas condições experimentais, os camundongos A/Sn foram categorizados como resistentes a infecção, em função da sua alta sobrevida, não tendo sido possível observar nenhuma morte durante período de observação de aproximadamente 600 d.p.i..

Cano e colaboradores (1995), inoculando 10^6 leveduras do isolado Pb18 via i.t., obtiveram tempos médios de sobrevida de 181 e 393 dias, respectivamente, para os camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn), tendo sido encontrado nos grupos-controle (não infectados) 95% de sobrevida, durante 400 dias de observação. Estes resultados mostram que a utilização de camundongos A/Sn e B10.A se adequam aos objetivos da presente pesquisa, para avaliação do comportamento de *C. callosus* frente a infecção por *P. brasiliensis*. Independentemente da via de inoculação, estes animais se comportam, respectivamente, como resistentes e susceptíveis a infecção (ARRUDA et al., 2007).

No presente trabalho, estendeu-se a cronologia de observação do “grupo de sobrevida pós-infecção” (Materiais e Métodos) para aproximadamente 15 meses (443 d.p.i.). Neste período, os animais A/Sn apresentaram maior sobrevida que os B10.A, destacando-se o fato de que nenhum dos animais A/Sn apresentou doença, traduzida pela presença de lesões nos órgãos examinados. Diferentemente, todos os animais B10.A sobreviventes mostraram lesões orgânicas (dados não descritos).

Um dado marcante nesta discussão é a dose do inóculo de $0,6 \times 10^5$, aproximadamente 83 vezes menor que o tradicionalmente utilizado nos modelos de infecção já estabelecidos (5×10^6), (CALICH et al, 1985; CALICH; KASHINO, 1998) sendo

discriminante quanto à susceptibilidade diferenciada entre *C. callosus* e os camundongos B10.A.

A infecção experimental por *P. brasiliensis*, cepa Pb18 evoluiu com a formação de lesões granulomatosas nos três órgãos analisados dos três grupos de animais testados, sendo de forma mais exuberante em *C. callosus*, principalmente nos pulmões. Este padrão notadamente distinto encontrado em *C. callosus*, comparado aos outros dois animais testados neste experimento, traduziu-se pelo maior número de granulomas frouxos ocupando maiores áreas, por vezes chegando a coalescerem, tendo eventualmente a presença de necrose central, e por ainda demonstrarem carga fúngica bastante expressiva. Este padrão foi acompanhado da baixa densidade de fibras colágenas, predominando as do tipo III. Maior proporção de fungos e de brotamentos viáveis foi encontrada nos granulomas de *C. callosus*, tendendo a aumentar conforme o transcurso da infecção, em especial até 90 d.p.i, diferenciando-se, marcadamente, dos achados nos camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn). Além disso, os níveis de anticorpos específicos isotipo IgG *anti-P. brasiliensis* foram mais altos, comparativamente aos outros animais, elevando-se gradativamente até o final do período de observação. Todos estes dados respaldam a maior susceptibilidade de *C. callosus* à infecção fúngica, traduzida pela maior mortalidade já discutida.

Estudos recentes sobre infecção experimental de *P. brasiliensis* em *C. callosus* têm apontado estes animais como alternativa viável ao desenvolvimento de PCM experimental, em especial pelas características de susceptibilidade à infecção neles observadas. Neste sentido, o presente trabalho procurou identificar evidências microbiológicas e histopatológicas da infecção que corroborassem esta percepção, desenvolvendo-se com o cuidado de comparar a evolução da infecção em animais classicamente identificados como modelos de resistência e susceptibilidade ao *P. brasiliensis*.

Outro aspecto da paracoccidiodomicose, que também tem sido considerado na literatura, diz respeito à sua disseminação. É classicamente conhecido que a maior parte das infecções/doenças é iniciada pela presença de leveduras do *P. brasiliensis* aspirado nos pulmões. Não obstante, algumas investigações têm mostrado a presença de fungos em animais naturalmente infectados e em produtos manufaturados, utilizados na alimentação de animais domésticos (FERREIRA et al., 1990). Esta preocupação é pertinente, tendo em vista que fungos viáveis ou seus produtos poderiam entrar em contato direto com outros animais ou o ser humano, caso habitem partilhando de ecossistema em comum. É possível, embora ainda não provado, que inoculações traumáticas do fungo ou de seus constituintes, possam de um lado

favorecer a infecção e, de outro, produzir sensibilização, concorrendo para modificação do padrão de resposta à infecção.

Estudo prévio (BERBERT et al., 2007) mostraram que diferentes doses da cepa Pb18 de *P. brasiliensis* (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8) inoculadas pela via i.p., podem produzir infecções devastadoras em *C. callosus*, nos quais a extensão das lesões e a mortalidade dos animais são diretamente proporcionais à dose do inóculo. Mesmo os inóculos considerados inferiores ($0,6 \times 10^5$) aos já testados em outros modelos murinos, continuaram mostrando resposta infecciosa desfavorável neste animal, comparativamente aos modelos classicamente descritos de resistência (camundongos A/Sn) e, em especial, de susceptibilidade (camundongo B10.A) (CALICH et al., 1985). Estes modelos têm sido utilizados no estudo da paracoccidiodomicose, e provido grande volume de informações referentes à resposta humoral e celular, achados histopatológicos micológicos, e sobre a modulação da resposta imune.

O Genero *Calomys* é composto por roedores da família *Cricetidae*, amplamente encontrados nas Américas Central e do Sul, em diferentes tipos de biomas como em floresta tropical, savana, caatinga, pastagem e área urbana (MELLO, 1984). A biologia desses animais, bem como sua adaptação às condições laboratoriais foram estudadas por diversos autores (JUSTINES; JOHNSON, 1970; MELLO, 1984). Petter e de KARIMI (1967) introduziram *C. callosus* mantidos em laboratório, demonstrando o fácil manuseio destes animais, e sua alta taxa de fertilidade, durante todo o ano (JUSTINES; JOHNSON, 1970; MELLO, 1969, 1977, 1978). O biotério da Universidade Federal de Uberlândia, tem reproduzido e mantido, de forma controlada, uma mesma linhagem deste cricetídeo, adotando este animal em diversas linhas de pesquisa, há mais de 10 anos (FERRO et al., 1999; LIMINGI; FERRO, 2003), o que nos garante a isogenicidade dos animais utilizados.

C. callosus são considerados importantes animais em relação à Saúde Pública, participando da epidemiologia de algumas zoonoses, atuando como reservatório natural de *Trypanosoma cruzi* (RIBEIRO, 1973; OLIVEIRA et al., 1997), e como agente transmissor da febre hemorrágica argentina (JUSTINES; JOHNSON, 1970). Também este cricetídeo tem-se mostrado bastante susceptível a doenças tais como a esquistossomose (LENZI et al., 1998), toxoplasmose (FAVORETO-JÚNIOR et al., 1998), demonstrando características eletroforéticas das imunoglobulinas e proteínas séricas totais similares às de outros roedores, tais como ratos, coelhos e camundongos (FAVORETO-JÚNIOR et al., 1998). Entretanto são ainda poucos os relatos na literatura mundial, enfocando a infecção experimental destes

animais por *P. brasiliensis* (BERBERT et al., 2007; FARIA, 2009; FORTES; KIPNIS; JUNQUEIRA-KIPNIS, 2009).

Pelo fato de serem estes roedores naturais do bioma cerrado, habitantes de uma área reconhecidamente endêmica de paracoccidioidomicose humana, é válido pensar que estes animais possam ter muito a informar sobre a relação parasita-hospedeiro na paracoccidioidomicose experimental, já que estes animais partilham o mesmo ecossistema gerador de formas infectantes de *P. brasiliensis*.

Conexões entre a multiplicação rápida e intensa de roedores e doenças emergentes na América do Sul têm sido relatadas desde 1552. Mais de 63 relatos bem documentados na literatura, mencionando eclosão e invasão de roedores foram identificados em diversas partes da América do Sul, conhecidas na língua portuguesa e na espanhola como “ratadas”. Este evento correlaciona-se ao período de florescência de bambus, produzindo aglomerados de sementes, e também ao período de chuvas intensas, atribuídas ao fenômeno “el niño”. Alguns relatos mencionam “ratadas” envolvendo *C. callosus* (JAKSIC; LIMA, 2003). Já foram identificados *C. callosus* vivendo em ambientes domiciliares, praticamente coabitando com humanos (MARES; OJEDA; KOSKO, 1981). A presença de cricetídeos infectados pelo vírus Machupo (família *Arenaviridae*) foi relacionada à febre hemorrágica humana na Bolívia (KILGORE et al., 1995). Isolados de *P. brasiliensis* em tatus provenientes de áreas endêmicas da PCM, e a demonstração que estes animais podem apresentar PCM-doença confirmam o papel deste animal na eco-epidemiologia do fungo (SILVA-VERGARA et al., 2000; NEVES et al., 2006). Em vista disto, investigações sobre seu papel na paracoccidioidomicose poderiam ser realizadas no sentido de verificar seu potencial papel como reservatório natural de *P. brasiliensis*, como observado em outros animais, ou ainda sua participação na disseminação, a partir da presença do fungo em suas secreções. A propósito, observações não sistemáticas pelo exame micológico direto das fezes de *C. callosus*, realizadas na vigência da presente investigação, mostraram positividade para *P. brasiliensis*.

Diferenças na disseminação e susceptibilidade ao *P. brasiliensis* e à PCM entre diferentes espécies são bem conhecidas. Alguns fatores têm sido identificados, vinculados ao grau de susceptibilidade à infecção de determinada espécie, tais como dose e via do inóculo, virulência do fungo, idade, sexo e cepa dos animais. Várias vias de inoculação têm sido estudadas com eficácias variáveis: intratesticular, intratraqueal, instilação nasal, lingual, subcutânea, mucosa retal, lúmen do cólon, intracardíaca e intravenosa, entretanto devido à facilidade técnica de execução e boa reprodutibilidade, a via i.p. tem sido também empregada

nestes estudos, sendo considerada interessante não só por reproduzir a infecção humana natural, como também pela efetividade na produção da infecção experimental por *P. brasiliensis* (CALICH et al., 1985; CALICH et al., 1987; COELHO et al., 1994; CANO et al., 1995; CALICH; VAZ; BURGER, 1998; ARRUDA et al., 1997). Baseado na nossa observação anterior, quando menores quantidades de leveduras de Pb18 em relação às usualmente empregadas ($0,6 \times 10^5$ leveduras) foram inoculadas pela via intraperitoneal, promovendo a doença em *C. callosus* (BERBERT et al., 2007; FARIA, 2009), foi mantida, no presente trabalho, esta mesma quantidade de inóculo, tendo as leveduras 80% de viabilidade. Além disto, a caracterização dos modelos de resistência e susceptibilidade nos camundongos A/Sn e B10.A, respectivamente, com padrões próprios de resposta imune, patogenia e microbiologia, foi obtida a partir da utilização de inóculos i.p. reforçando a necessidade de sua utilização neste estudo estudo (CALICH et al., 1985; CALICH; VAZ; BURGER, 1998; CALICH; KASHINO, 1985; KASHINO et al., 1998; CALICH et al., 1994; CALICH et al., 2008).

O controle do crescimento fúngico depende da organização dos granulomas. Camundongos resistentes apresentam granulomas usualmente mais compactos, com maior habilidade de controlar a infecção. Este padrão tem sido observado em animais resistentes à infecção, evidenciando resposta imune do tipo Th1, com produção aumentada de IFN- γ e concentrações ótimas de óxido nítrico (NO). Este padrão de resposta tende à cura da infecção. Granulomas inicialmente bem organizados podem tornar-se gradualmente frouxos, desorganizados, perdendo sua delimitação e albergando quantidades crescentes de fungos, demonstrando mudança na resposta para o perfil Th2. Esta progressão da infecção reflete-se pela diminuição da produção de INF- γ , com níveis aumentados de NO, acompanhados de aumento nos níveis de IL-10. Padrão semelhante tem sido observado na formação de granulomas identificados em animais atímicos (LENZI et al., 1994). Também tem sido observado que pacientes com paracoccidiodomicose progressiva, não controlada (“severa”) exibem granulomas difusos, frouxos, coalescentes, como tradução da supressão das células T (ALVES et al., 2009).

A propósito, tem sido verificado que a modulação da resposta imune na PCM em animais B10.A, classicamente identificados com susceptibilidade à infecção, está associada ao perfil Th2 de resposta imune, caracterizado pela presença de altos níveis de IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10, TGF- β e depressão da resposta celular protetora (SOUTO et al., 2000; CALICH; KASHINO, 1998; MELLO; SILVA-VERGARA; RODRIGUES JÚNIOR, 2001).

No presente experimento encontrou-se, em *C. callosus*, altos níveis de IgM específica *anti-P. brasiliensis*, associados a altos e crescentes níveis de anticorpos IgG específicos. Estes níveis foram proporcionalmente maiores que aqueles observados nos camundongos B10.A, ao longo de todo o experimento, confirmando a observação de que níveis de IgG aumentam conforme a severidade na doença clínica (FRANCO, 1986; BAGLIONI et al., 1984; CALICH et al., 2008). Estes dados também sugerem que os camundongos B10.A tiveram resposta imune humoral menos intensa do que *C. callosus*, mostrada pelos níveis de IgG, entretanto ainda mantendo padrões de susceptibilidade. Os animais resistentes apresentaram inicialmente até 30 d.p.i. níveis maiores de IgM, e também em relação a IgG, contrariando dados da literatura que mostram formas benignas da doença apresentando títulos de anticorpos mais baixos (BAGLIONI et al., 1984; CALICH et al., 2008). Calich e colaboradores (1985) demonstraram que cepas de camundongos resistentes à doença (A/Sn) desenvolveram anticorpos *anti-P. brasiliensis* mais tardiamente do que os camundongos susceptíveis (B10.A). Da mesma forma Cano e colaboradores (1995) descreveram animais infectados com 10^6 leveduras, obtendo a produção de anticorpos atingindo seu pico após quatro semanas em animais susceptíveis B10.A, contrariamente aos camundongos resistentes A/Sn, que evidenciaram elevados níveis de anticorpos somente após oito semanas de infecção, superando os encontrados nos camundongos B 10.A. Estas diferenças podem estar relacionadas com a quantidade de leveduras inoculadas e, possivelmente, inóculos altos estimulem precocemente resposta imune potente nos hospedeiros resistentes.

Segundo Vaz e colaboradores (1992), a resposta imune humoral produzida nos camundongos susceptíveis (B10.A) é similar ao perfil de resposta imune observado na doença humana disseminada. No presente experimento, o perfil sorológico de *C. callosus* mostrou-se semelhante ao de camundongos susceptíveis B10.A, com elevados níveis anticórpicos, presença de granulomas ocupando grandes áreas, retratando grande susceptibilidade à infecção. Estes achados reproduziram também a observação anterior envolvendo *C. callosus* infectados i.p. com *P. brasiliensis*, Pb18, na dose de $0,6 \times 10^5$ leveduras, nos quais foram identificados altos níveis de IgG, mensurados por ELISA, semelhantes em *C. callosus* e nos camundongos B10.A (BERBERT et al., 2007), reforçados pelos achados de FARIA (2009), que encontrou altos níveis de IgG1 específicos para *P. brasiliensis*, próximos àqueles observados para os camundongos A/Sn e B10.A. Todavia, *C. callosus* mostraram níveis bastante reduzidos de anticorpos IgG2a específicos. De maneira semelhante ao observado em outros modelos animais de susceptibilidade, os altos níveis de anticorpos específicos encontrados no soro

podem não ter papel protetor na evolução da infecção por *P. brasiliensis* (BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

A análise histopatológica evidenciou, no presente estudo, processo inflamatório identificado nas lesões da paracoccidioidomicose, com composição celular e organização diversificadas. Particularmente em *C. callosus* observou-se infiltrado granulomatoso em maior número, mesmo nas fases mais precoces do experimento, precedidos por infiltração neutrofílica e eventual formação de microabscessos. Com a evolução do experimento a extensão dos infiltrados granulomatosos gradativamente aumentou, tornando-se coalescentes e desorganizados, tendo halo linfocítico pobre, associados à presença de neutrófilos e extensas áreas de necrose, sendo demonstrado maior concentração de fungos, sobretudo viáveis, acompanhados de maior número de brotamentos, também viáveis. Este achado foi particularmente notável nas lesões pulmonares. No outro extremo, as lesões nos camundongos resistentes A/Sn caracterizaram-se pelo menor número, sendo em geral unifocais, pequenas, bem circunscritas. Houve predomínio de infiltrado linfo-histiocitário, com eventual presença de neutrófilos, plasmócitos e menos frequentemente eosinófilos. A necrose foi raramente vista, mais frequente no fígado, mostrando-se eventualmente permeada por fungos. Já os camundongos B10.A apresentaram padrão de composição celular e de organização do infiltrado inflamatório intermediário (Tabela 3 e Figura 10). Estes achados sustentam um padrão de resposta classicamente observado nos camundongos resistentes e susceptíveis, previamente descrito na literatura, independente da via de inoculação, quando os animais são desafiados com a cepa Pb18. Mais ainda, mesmo na presença de um inóculo menor, as respostas se mantiveram semelhantes às aquelas classicamente descritas (CALICH et al., 1985; CANO et al., 1995). Os achados do presente trabalho confirmam aqueles previamente observados (BERBERT et al., 2007), possibilitando mais ainda a visualização de que a extensão da lesão é progressiva com o tempo, não sendo satisfatória para conter a proliferação fúngica. Mais ainda, evidenciou-se maior susceptibilidade de *C. callosus*, comparativamente aos animais B.10A.

Muito embora a atividade neutrofílica seja apontada como um dos mecanismos fundamentais na destruição de *P. brasiliensis* nas fases precoces da doença (PINA et al., 2006), o granuloma representa o modelo predominante de resposta inflamatória observado na infecção. Ele traduz o padrão de modulação da resposta imune, sendo a expressão tecidual dos fenômenos celulares e humorais observada na adaptação do hospedeiro frente à infecção por *P. brasiliensis*. Usualmente o granuloma é caracterizado pela presença de macrófagos e seus

derivados, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, neutrófilos e um componente fibroso circunscrevendo-o perifericamente, abrigando no seu interior células parasitárias em diferentes estágios de viabilidade, com ou sem presença de necrose. Diferenças na modulação da resposta imune celular influenciam o seu desenvolvimento, sua morfogênese e eficiência no controle da infecção (CAMARGO; FRANCO, 2007; ALVES et al., 2009; DA SILVA et al., 2009).

Achados baseados em modelos experimentais murinos susceptíveis mostram que o número, o tamanho, a confluência e a extensão dos granulomas aumentam concomitantemente com a gravidade do processo infeccioso. Extensas áreas de necrose e maior densidade fúngica são características da infecção descontrolada, com formas disseminadas anérgicas (FRANCO; MONTENEGRO, 1984; CALICH et al., 1985; DEL NEGRO et al., 1994; CALICH et al., 2008). A presença da necrose tem sido atribuída à desnaturação, não só das proteínas estruturais, como também das proteínas enzimáticas, sendo consequência da interrupção da circulação do sangue em áreas limitadas dos órgãos envolvidos pelo granuloma.

Nesta pesquisa, os achados ossos achados mostraram que os granulomas observados em *C. callosus* eram do tipo frouxo, semelhantes àqueles encontrados nos camundongos B10.A e em animais atímicos (LENZI et al., 1994), e compatíveis com a resposta identificada nas formas clínicas agressivas da infecção humana. Alves e colaboradores (2009) também mostraram uma evolução desfavorável da infecção quando desenvolvida a partir da inoculação intratorácica com cepa altamente virulenta (69P). Neste estudo, os granulomas inicialmente compactos, bem organizados, modificaram-se com a progressão da infecção, tornando-se gradualmente maiores e de composição mais complexa, associando-se a 30% de mortes aos 70 d.p.i. Aos 90 d.p.i. os granulomas foram incapazes em conter a multiplicação fúngica, com muitas formas sendo identificadas fora do granuloma. Os autores consideram que a diminuição dos neutrófilos poderia estar associado a este padrão de resposta. No presente trabalho não se objetivou avaliar a resposta neutrofílica particularmente, mas foi evidente a presença destas células nos granulomas nas fases mais tardias, percebendo-se maiores dimensões das lesões ocupando o parênquima. É provável que a presença dos neutrófilos seja vinculada a maior presença de fatores quimiotáticos resultantes da lesão tecidual e também a maior riqueza antigênica, vinculada à sua redução de sua ativação.

Calich e colaboradores (1985), entre outros (CALICH; VAZ; BURGER, 1998; CALICH; KASHINO, 1998) relataram diferentes padrões de granulomas observados em camundongos isogênicos machos, com idades entre seis a oito semanas, após inoculação intraperitoneal de 5×10^6 leveduras de *P. brasiliensis*, quando documentaram que o número e a

disseminação dos granulomas aumentaram com a evolução do processo infeccioso, sendo mais numerosos e maiores nos animais susceptíveis (camundongos B10.A), e sendo o baço e o fígado os órgãos mais afetados. O atual trabalho evidenciou nos pulmões de *C. callosus* correlação forte entre fungos viáveis e brotamentos, e entre brotamentos e áreas ocupadas pelos granulomas ($rs=0.928$), e ainda foi identificada correlação altamente positiva entre fungos viáveis e área ocupada pelos granulomas ($rs=1$), o que retrata a grande afinidade pulmonar pela infecção pelo Pb18 neste animal, provavelmente refletindo maior dificuldade na inibição do crescimento fúngico, de forma semelhante ao que ocorre nos animais susceptíveis (COELHO et al., 1994; FRANCO et al., 1998).

Provavelmente a progressão da doença em *C. callosus* apresente imunopatogenia semelhante a dos camundongos susceptíveis, tais como camundongos B10.A e atímicos, mostrando maior agressividade na progressão da infecção que os animais BALB/c, de susceptibilidade intermediária (CALICH et al., 1985). Todavia, a constatação destas evidências está fora do escopo deste trabalho e outras abordagens seriam necessárias para avaliar estes aspectos da infecção experimental em *C. callosus*.

Dois tipos de granulomas têm sido identificados na PCM: a) granulomas frouxos, desorganizados e mal delimitados, individualizados pela deposição de colágeno tipo III, necrose, e maior número de fungos identificados, com evolução progressiva e agressiva da infecção, disseminação da doença e anergia; b) granulomas compactos, organizados e bem delimitados, encapsulados principalmente com colágeno tipo I, composto predominantemente por macrófagos de diferentes tipos, com a presença de neutrófilos, relacionados à resistência e ao controle da doença com sua cura (XIDIEH et al., 1999). Granulomas compactos são capazes de dominar a multiplicação fúngica; por outro lado, nos granulomas frouxos, a função protetora deixa de operar e leveduras aumentam em número, perpetuando a resposta inflamatória tecidual gerando fibrose. Portanto a ocorrência de granulomas recentes, predominando colágeno tipo III, concomitantemente a antigos, predominando colágeno tipo I, denota a incapacidade do granuloma em eliminar o fungo e limitar sua multiplicação (KERR et al. 1988b).

Usualmente, a fibrose parece ter início simultaneamente com o processo inflamatório e a presença de infiltrado leucocitário mononuclear, progredindo paralelamente à formação do granuloma, sendo a presença dos macrófagos determinante para esta deposição de colágeno (FIGUEIREIDO; SILVA; ROSSI, 1986; FRANCO et al., 1998; KERR; OLIVEIRA; LENZI, 1988a; KERR et al., 1988b; NISHIKAKU; BURGER 2003). Macrófagos ativados

produzem citocinas estimulantes para proliferação de fibroblastos tais como: TNF- γ , TGF- β , IFN- γ , IL-1 e IL-6 (FRIEDMAN, 1993; HUNNINGHAKE; KALICA, 1995). O TNF- α desempenha papel central na defesa imune inata contra múltiplos organismos intercelulares, tendo também atividade mitogênica para fibroblastos (VILCEK et al., 1987). Variações nos seus níveis podem tanto aumentar a atividade pró-fibrótica, levando a maiores expressões de TGF- β (LUNDBLAD et al., 2005), como ter ação antifibrótica, diminuindo a síntese de colágeno, e inibindo a sinalização do TGF- β (LI et al., 2002).

A origem e intensidade da resposta inflamatória parecem estar diretamente relacionadas à presença de elementos da parede celular e/ou derivados do fungo. A regressão do parasitismo e da inflamação está simultaneamente relacionada com a regressão da fibrose (FIGUEIREIDO; SILVA; ROSSI, 1986; ANDRADE, 2009).

Neste trabalho, utilizando animais resistentes, foi possível observar número reduzido de lesões granulomatosas associadas a infiltrados celulares mais organizados e bem delimitados, todavia sem evidenciar quantidades apreciáveis de deposição de tecido conjuntivo fibrótico. Observaram-se variações na presença de colágeno, dependendo do tipo e do órgão considerado ao longo do experimento, mas em menor quantidade do que aquela observada nos outros animais. Nos camundongos A/Sn, a quantificação de colágenos tipos I e III nos pulmões não identificou fibrose claramente definida nos granulomas. Estes animais infectados por isolado virulento Pb18, na concentração de 5×10^6 leveduras viáveis, demonstraram granulomas, eventualmente presentes nas fases mais precoces da infecção, acompanhados de fibrose, com predomínio do colágeno I (XIDIEH et al., 1999; NISHIKAKU; BURGER, 2003). Este padrão de deposição não foi reproduzido no presente experimento. Uma possibilidade de explicação estaria associada ao fato de que, neste experimento, utilizou-se dose de inóculo bem menor do que a citada anteriormente. Assim, é possível que, neste estudo tenha ocorrido uma resposta mais efetiva dos animais A/Sn contra *P. brasiliensis*, constatada pela identificação de fungos apenas nas fases iniciais do experimento. Neste sentido, é plausível também admitir que a rápida involução da resposta inflamatória crônica granulomatosa possa explicar a reduzida presença de mediadores indutores de fibrose mais intensa.

Por outro lado, na presente pesquisa, identificou-se deposição de colágenos tipos III e I nos animais B10.A, em níveis aproximadamente equiparados, com ligeira predominância do colágeno III. Este fato nos induz a pensar no desenvolvimento de maturação do tecido conjuntivo no granuloma, representado pela substituição gradativa do colágeno tipo III pelo tipo I. No curso da infecção nestes animais, este balanço parece não estar sendo

satisfatoriamente modulado, tendo em vista que, embora o colágeno tipo I tenha aumentado durante o experimento, não foi observada uma inversão radical dos níveis de colágeno tipo III para tipo I. Estes achados, a priori, contrastam com aqueles identificados para os animais B10.A verificados por outros autores (XIDIEH et al., 1999; NISHIKAKU; BURGER, 2003). Possivelmente a redução no inóculo possa também ter modificado o padrão de resposta dos animais susceptíveis, produzindo menor depressão da resposta celular, sem, entretanto, resultar em maior eficácia da resposta antifúngica. Provavelmente, estes níveis produziram maior extensão do processo inflamatório, estabelecendo outro patamar de equilíbrio na relação parasita-hospedeiro, justificando então a maior fibrose observada. A utilização de animais de susceptibilidade intermediária para *P. brasiliensis* tem produzido resposta associada à presença de numerosas células fúngicas permeando a matriz colagênica, constituída por ambos colágenos tipos III e I (FRANCO et al., 1998). Este padrão de deposição de fibras colágenas foi também documentado em camundongos BALB/c atímicos (nu/nu) por Lenzi et al. (1994). Os autores inocularam i.p. 5×10^6 leveduras de Pb18, produzindo granulomas com predominância de fibras colágenas III sobre as fibras colágenas I, demonstrando que quando a proliferação fúngica é controlada, a matriz extracelular torna-se madura, predominando a presença de colágeno tipo I. Os autores ainda sugerem que os fungos possam participar na modulação da deposição de fibras reticulares (colágeno tipo III). Cock e colaboradores (2000) também observaram este padrão de comportamento em animais BALB/c quando inoculados por conídeos, por instilação nasal, na concentração fúngica de 4×10^6 , evidenciando fibrose progressiva caracterizada pela presença de colágenos tipos I e III, a partir da quarta semana de infecção. Desta forma, nas condições do atual experimento, os animais B10.A se comportaram como aqueles definidos como de susceptibilidade intermediária.

Já para *C. callosus*, os achados foram totalmente distintos. Nestes animais, um extenso infiltrado inflamatório acompanhado de maior presença de necrose, variabilidade na composição celular, incluindo a presença de focos de microabscessos compondo granulomas mal delimitados foi acompanhado de deposição quase que exclusivamente de colágeno tipo III. Nenhuma evidência de maturação do granuloma foi observada. Apenas traços de colágeno tipo I foram observados focalmente em pulmão e baço. Estes achados reforçam a susceptibilidade do animal, vinculada, provavelmente, a uma depressão acentuada da resposta celular, tanto CD4 quanto CD8, imitando aquela observada nos animais B10.A quando inoculados com quantidades maiores de fungo (CALICH et al., 1985; CANO et al., 1998; XIDIEH et al., 1999), em que apenas quantidades detectáveis de colágeno III têm sido observadas.

Depósitos precoces de colágeno em *C. callosus* provavelmente estão relacionados com intensa produção de citocinas fibrogênicas pelos macrófagos ativados (EICKELBERG et al., 1999). Pela evolução dos granulomas, parece que este padrão de mediação mantém-se inalterado também nas fases mais tardias do processo. Este padrão de remodelação do colágeno pode estar associado a fatores genéticos próprios do animal, ou também associado ao tipo de microorganismo indutor da resposta, juntamente com a sua viabilidade e densidade tecidual (ROJKIND; DUNN, 1979; GRIMAUD et al., 1980). Andrade e Grimaud (1988) e Andrade e Peixoto (1992), estudando a regressão da fibrose esquistossomótica nos granulomas presentes no fígado de *C. callosus*, demonstraram padrão de resistência, com a presença de ambos os tipos I e III de colágenos desaparecendo gradual e simultaneamente, conforme a doença foi sendo controlada.

Apesar destes resultados, o papel desempenhado pelos diferentes tipos de inóculos sobre a resposta imune, está longe de ser elucidado. Especula-se que a fibrose, ao menos em parte, possa estar relacionada a estímulo direto do fungo, sugerindo a possibilidade de que o fungo possa, por si só, induzir a produção de elementos da matriz extracelular. (TUDER et al., 1985).

A progressão da infecção pelo *P. brasiliensis* determinada pela análise histopatológica e contagem de UFC tem sido considerada como parâmetro confiável na discriminação entre susceptibilidade e resistência em modelos murinos (OLIVEIRA et al., 2008; CANO et al., 1998; BORGES-WALMSLEY et al., 2002), ambos conjuntamente refletindo a progressão da doença (ALVES et al., 2009). Aspecto relevante do presente trabalho diz respeito à presença fúngica na evolução da infecção. Conforme já citado na literatura, os animais A/Sn apresentam evolução da infecção associada à redução da carga fúngica durante o processo infeccioso, não sendo possível sua evidenciação nos períodos finais do experimento. Estes achados divergiram dos animais B10.A que, juntamente com *C. callosus*, mostraram maior densidade fúngica. Neste sentido, o presente experimento mostrou maior positividade da pesquisa direta de *P. brasiliensis* em *C. callosus*, predominando em todos os períodos estudados, independentemente do órgão analisado. As maiores diferenças nos percentuais de positividade para pesquisa direta de fungo foram observadas nos pulmões, a partir do 30 d.p.i.. Este dado foi confirmado pela positividade da cultura para fungos, pela quantificação de UFC e pela contagem de fungos viáveis e em brotamento no tecido, quando se observou em *C. callosus* que o pulmão foi o principal órgão alvo da infecção fúngica. Estes dados apresentaram uma correlação alta e significativa, como mencionado anteriormente. Em

conjunto, estes achados reforçam a característica de susceptibilidade própria do *C. callosus* ao *P. brasiliensis* (RESTREPO, 2000).

Vale ressaltar que, aos 120 d.p.i., verificou-se queda brusca na positividade da pesquisa direta de *P. brasiliensis*, confirmada pela diminuição no número de culturas positivas, de UFC, e na proporção de fungos viáveis nos órgãos de *C. callosus*. Fatores como adversidade do meio ambiente, causada pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, alterações de pH nos tecidos infectados, além da alta concentração de microorganismos encontrados nos tecidos podem ser relacionadas como possíveis causas deste estado. As células em divisão são mais sensíveis a agentes agressores. Assim sendo, a formação de múltiplos brotamentos nas células fúngicas, canalizaria reservas celulares para o processo de reprodução, provocando redução na virulência fúngica, tornando-os mais susceptíveis à ação do sistema imune. Este estado facilitaria a morte celular, explicando a queda no número de fungos.

Achado interessante, observado neste estudo, foi a presença de hifas em alguns animais do grupo de *C. callosus*, em diferentes períodos da infecção. Este achado não foi reproduzido nos camundongos A/Sn e B10.A. Londero e colaboradores (1980) reportaram pela primeira vez a ocorrência de hifas do fungo em tecidos humanos, observações estas que foram também referidas por Kerr e colaboradores (1988c) e Svidzinski (1999). Nos tecidos, o processo de transformação da fase M para L do *P. brasiliensis* é decisiva para o desenvolvimento da doença, ocorrendo nas primeiras 96h pós inóculo, havendo regressão da infecção caso isto não ocorra (ARISTIZABAL et al., 1998). Kerr e colaboradores (1988c) encontraram a presença de hifas de *P. brasiliensis* em camundongos atímicos (nu/nu) inoculados, não atribuindo este achado a efeitos pós-morte, desde que as hifas foram identificadas em camundongos cuja necropsia foi realizada imediatamente após eutanásia. Hifas anormais e bizarras encontradas em tecidos de pacientes imunocomprometidos sugerem o possível papel da imunodepressão na determinação da morfologia do fungo no tecido (KERR et al., 1988c). Ademais, outras possibilidades têm sido levantadas para explicar estes achados: alterações de temperatura, nutricionais e respiratórios do animal (LONDERO; SEVERO; RAMOS, 1980). Provavelmente, estes animais seriam mais susceptíveis na desregulação da temperatura corporal durante a resposta ineficaz ao fungo, trazendo também modificações da tensão de oxigênio pela deficiência respiratória advinda do intenso comprometimento inflamatório dos pulmões. Por outro lado, estas alterações podem ter contribuído para um estado de prostração, decorrente de deficiências nutricionais ocorridas durante o processo

infeccioso. Estas observações devem ser consideradas apenas como conjecturas, desde que não foi possível avaliar objetivamente estes dados, no presente experimento.

Dentro dos objetivos traçados para este trabalho, observou-se que *C. callosus* apresentou alta vulnerabilidade à infecção pelo Pb18, com a presença de granulomas coalescentes e frouxos, ricos em fungos, produção de anticorpos da classe IgG, grande número de fungos detectados pelo exame micológico direto, em cultura e pela contagem fúngica tecidual, coincidente com sua maior disseminação, mortalidade precoce, diante de inóculo menor do que aquele usualmente identificado na literatura. Esta análise foi sempre comparativa com outros animais, camundongos B10.A e A/Sn, que participaram deste estudo. Novos estudos, são necessários para identificar quais seriam os parâmetros da resposta imune e do comportamento fúngico no hospedeiro, que justifiquem este padrão de susceptibilidade.

6 CONCLUSÕES:

1. A infecção experimental produzida pela inoculação intraperitoneal de $0,6 \times 10^5$ leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, cepa virulenta Pb18, produziu a doença em *C. callosus*, que sob o ponto de vista clínico-patológico foi mais grave e disseminada do que a observada nos modelos murinos de susceptibilidade e de resistência, sobretudo nos pulmões.
2. A expressão desta diferença confirmou-se pelo comportamento sorológico de *C. callosus* comparativamente aos camundongos B10.A e A/Sn, obtido pelo ELISA, pela dosagem de IgM e IgG nos diferentes momentos da cronologia do experimento.
3. *Calomys callosus* apresentou maior carga fúngica, observada de maneira crescente com maior número de fungos viáveis e brotamentos conforme o evoluir da infecção.
4. *Calomys callosus* pode ser considerado como potencial modelo animal alternativo no estudo da paracoccidioidomicose infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.O. The granulomatous inflammatory response. A review. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v.84, n.1, p.164-92, 1976.

ALBORNOZ, M. B. Paracoccidioidomycosis infección. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; FIORINO, A. M. (Ed.). **Paracoccidioidomycose: blastomycose Sul Americana**. São Paulo: Xarvier: Edusp, 1982. p. 91-96.

ALVES, C. C. S.; AZEVEDO, A. L. S.; RODRIGUES, M. F.; MACHADO, R. P.; SOUZA, M. A.; MACHADO, M. A.; TEIXEIRA, H. C.; FERREIRA, A. P. Cellular and humoral immune responses during intrathoracic paracoccidioidomycosis in BALB/c mice. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 513-525, 2009.

ANDRADE, Z.A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunology**, Oxford, v.31,n.1, p. 656-663, 2009.

ANDRADE, Z.A.; GRIMAUD, J. Morphology of chronic collagen resorption: a study on the later stages of schistosomal granuloma involution. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v.132,n.2,p .389-399, 1988.

ANDRADE, Z.; PEIXOTO, E. Pathology of periportal fibrosis involution in human schistosomiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.34,n.4,p.263-272, 1992.

ANGULO-ORTEGA, A. Calcifications in paracoccidioidomycosis: are they the morphological manifestation of subclinical infections? In: PAN AMERICAN SYMPOSIUM IN PARACOCCIDOIDOMYCOSIS, 1., Medellin, 1971. **Proceedings...** Wahshington: PAHO Sci Public, 1972. p. 129-133.

ARISTIZABAL, 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, Washington**, Washington, v. 66, p. 5587-5591, 1998.

ARRUDA, C.; KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; CALICH, V.L. A primary subcutaneous infection with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to immunoprotection or exacerbated disease depending on the route of challenge. **Microbes and Infection**, New York, v. 9,n. 3, p. 308-316,2007.

BAGLIONI, L.; SOUZA, M. J.; CHAMMA, L. G.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; MOTA, N. G. S.; FRANCO, M. Serology os paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 78, 617-621, 1984.

BERBERT, A.LC.V.; FARIA, G.G.; GENNARI-CARDOSO, M.L.; SILVA, M.M.M.D.; MINEO, J.R.; LOYOLA, A. Histological and serological evidence of experimental paracoccidioidomycosis in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **International Joournal of Experimental Pathology**, v. 88, n.1,p.55–62, 2007.

BETHLEM, N. M.; LEMLE, A.; BETHLEM, E.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis. **Seminars in Respiratory Medicine**, New York, v. 12, p. 81, 1991.

BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMESLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **TRENDS in Microbiology**, Cambridge, v.10, n.2, p. 80-87, 2002.

BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 140, p. 2786-2789, 1988.

BURGER, E.; SINGER-VERMES, L.M.; CALICH, V.L. The role of C5 in experimental murine paracoccidioidomycosis. **Journal of Infectious Disease**, v.152, n.2, p.425, 1985.

CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 615–623, 1998. Review.

CALICH, V.L.G.; PURCHIO, A.; PAULA, C.R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 66, n. 3, p. 175-177, 1978.

CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Research in Immunology**, Paris, v. 149, p. 407-416, 1998.

CALICH, V. L. G.; COSTA, T. A.; FELONATO, M.; ARRUDA, C.; BERNARDINO, S.; LOURES, F. V.; RIBEIRO, L. R. R.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; PINA, A. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 165, p. 223-236, 2008.

CALICH, V. L. G.; KIPNIS, T. L.; MARIANO, M.; FAVA NETO, C.; DIAS, W. D. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. **Clinical Immunology and Immunopathology**, New York, v. 12, p. 20-30, 1979.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; RUSSO, M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E. Immunogenetics in paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 151-173.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 66, p. 585-594, 1985.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 17, p. 41-48, 2000.

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, v. 66, n. 2, p. 800-806, 1998.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; RUSSO, M.; CALISH, 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**, Washington, v. 63, n. 5, p. 1.777-1.783, 1995.

COELHO, K. I. R.; DAFAVERI, 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.

COCK, A.M.; CANO, L.E.; VÉLEZ, D.; ARISTIZÁBAL, B.H.; TRUBILLO, J.; RESTREPO, A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.42,n.2,p. 49-66, 2000.

DA SILVA, F. C.; SVIDIZINSKI, T. I. E.; PATUSSI, E. V.; CARDOSO, C. P.; DALALIO, M. M. O.; HERNANDES, L. Morphologic organizationo pulmonary granuloma in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, McLean, v. 80, n. 5, p. 798-804, 2009.

DE SOUZA, R. R.; VASCONCELOS, D. C.; MAIFRINO, L. B. M.; LIBERTI, E. A. Effects of chronic chagasic infection on the number and size of cardiac neurons of the rodend *Calomys callosus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 5, p. 663-665, 1999.

DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; ZAMITH, V. A.; SIQUEIRA, A. M. General clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in childhood. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G.: **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 87-106.

DIAS, M. F.; FIGUEIRA, A. L.; DE SOUZA, W. A morphological and cytochemical study of the interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and neutrophils. **Microscopy Microanalysis Microstructures**, Ivry-sur-Seine, v. 10, p. 215–223, 2004.

EICKELBERG, O.; KÖHLER, E.; REICHENBERGER, F.; WOODTLI, B.S.; PERRUCHOUD, AP.; ROTH,M. Extracellular matrix deposition by primary lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3. **American Journal of physiology Physiology**, Washington, v.276, n.5, p. 814-824, 1999.

ENDO, S.; KOMORI, T.; RICCI, G.; SANO, A. Detection of *gp43* of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 234, n. 1, p. 93-97, 2004.

FARIA, G. G. **Avaliação da resposta humoral e antígenos imunodominantes em *Calomys callosus* infectados experimentalmente com *Paracoccidioides brasiliensis*.** 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicados, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

FAVORETO-JUNIOR, S.; FERRO, E. A. V.; CLEMENTE, D.; SILVA, D. A. O.; MINEO, A. O. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 1, p. 103-107, 1998.

FERREIRA, M. S.; FREITAS, L. H.; LACAZ, C. S.; DEL NEGRO, G. M. B; MELO, N. T.; GARCIA, N. M.; ASSIS, C. M.; SALEBIAN, A.; HEINS-VACCARI, E. M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brasil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 28, p. 253-256, 1990.

FERREIRA, S. F.; ALMEIDA, S. R. Immunization of susceptible mice with gp-43-pulsed dendritic cell induce an increase of pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 103, p. 121-126, 2006.

FERRO, E. A.; BEVILACQUA, E.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A.; MORTARA, R. A. ; MINEO, J. R. *Calomys callosus* (Rodentia : Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. **Parasitology Research**, Berlin, v. 85, n. 8/9, p. 647-654, 1999.

FIGUEIREIDO, F.; SILVA, C. L. M.; ROSSI, M. A. Participation of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and polysaccharides in the evolution of granulomas. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 19, p. 651-653, 1986.

FORTES, R. M.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. *Paracoccidioides brasiliensis* pancreatic destruction in *Calomys callosus* experimentally infected. **BMC Microbiology**, London, v. 9, p. 84-95, 2009.

FRANCO, L.; NAJVAR, L.; GOMEZ, B. L.; RESTREPO, S.; GRAYBILL, J. R.; RESTREPO, A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, McLean, v. 58, p. 424-430, 1998.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 25, p. 5-18, 1986.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R. Anatomia patológica. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; FIORILLO, A. M. (Ed.). **Paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana)**. São Paulo: Savier: Edusp, 1984. p. 97-117.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SACAPOLIO, S.; LACAZ, C.S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 185-191, 2000.

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

FRIEDMAN, S. L. The cellular basis of hepatic fibrosis. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 328, p. 1.828-1.835, 1993.

GOIHMAN-YAHR, M.; ESSENFELD-YAHR, E.; ALBORNOZ, M. C.; YARZÁBAL, L.; GIMENEZ, M. H.; SAN-MARTIN, B.; OCANTO, A.; GIL, F.; CONVIT, J. Defect of in vitro digestive ability of polymorphonuclear leucocytes in paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 28, p. 557-566, 1980.

GRIMAUD, J.A; DRUGUET, M.; PEYROL.; CHEVALIER, O.; HERBAGE, D.; EL BADRAWY, N. Collagen immunotyping in human liver: light and electron microscope study. **Journal of histochemistry and cytochemistry**, New York, v.28, n.11, p. 1145-1156, 1980.

GROSSO, D. M.; ALMEIDA, S. R.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies em *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, p. 6.534-6.542, 2003.
HUNNINGHAKE, G. W.; KALICA, A. R. Approaches to the treatment of pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S.l.], v. 151, p. 915-918, 1995.

JAKSIC, F. M.; LIMA, M. Myths and facts on ratadas: bamboo bloms, rainfall peaks and rodend outbreaks in South América. **Austral Ecology**, Carlton, v. 28, p. 237-251, 2003.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. (Ed.).
Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JUSTINES, G.; JOHNSON, K. M. Observatons of the laboratory breeding of the cricetine rodent *Calomys callosus*. **Laboratory Animal Care**, Joliet, v. 20, p. 57-60, 1970
KAMINAGAKURA, E.; BONAN, P. R. F.; JORGE, J.; ALMEIDA, O. P.; SCULLY, C. Characterization of inflammatory cells in oral paracoccidioidomycosis. **Oral Diseases**, Hampshire, v. 13, p. 434-439, 2007.

KASHINO, S. S. **Produção de citocinas por camundongos resistentes e susceptíveis à infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis***. 1997. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

KASHINO, S. S.; CALISCH, V. L. G.; BURGER, E.; SINGER-HERMES, L. M. *In vivo* and *in vitro* characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 92, p. 173-178, 1985.

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

KERR, I. B.; MENDES DA SILVA, A. M; DROUHET, E.; DA COSTA, C. G. Paracoccidioidomycosis in nude mice: presence of filamentous forms of the fungus. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 103, p. 3-11, 1988c.

KERR, I. B.; OLIVEIRA, P. C.; LENZI, H. L. Connective matrix organization in chronic granulomas of experimental paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 103, p. 11-20, 1988a.

KILGORE, P. E.; PETERS, C. J.; MILLS, J. N.; ROLLIN, P. E.; ARMSTRONG, L.; KHAN, A. S.; KSIAZEK, T. G. Prospects for the control of bolivian hemorrhagic feber. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 1, p. 97-100, 1995.

KURITA, N.; BISWAS, S. K.; ORADA, M.; SANO, A.; NISHIMURA, K.; KUTI, H. O. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 144, p. 131-133, 1999.

LACERDA, G. B.; ARCE-GOMEZ, B.; TELLES FILHO, Q. Increase frequency of HLA-B40 in patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 26, p. 253-256, 1988.

LENZI, J.A.; PELAJO-MACHADO, M.;MOTA, E. M.; OLIVEIRA, D. N.; MÔNICA, S.; PANASCO, M. S.; ANDRADE, Z. A.; LENZI, H. L. Effects of schistosomal mansonii infection on *Calomys callosus* coelom-associated lymphomyeloid tissue (milky spots). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 13-23, 1998. Supplement 1.

LENZI, H. L.; CALICH, V. L. G.; MIYAJI, M.; SANO, A.; NISHIMURA, K.; BURGER, E. Fibrosis patterns of lesions developed by athymic and euthymic mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 27, p. 2.301-2.308, 1994.

LI, Y. Y.; FENG, Y. Q.; KADOKAMI, T.; McTIERNAN, C. F.; DRAVIAM, R.; OLIVEIRA, S. L.; MAMONI, R. L.; MUSATTI, C. C.; PAPAIODARNAU, P. M.; BLOTTA, M. H. S. L. Cytokines profile and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, p. 139-144, 2002.

LIMINGI, J. E.; FERRO, E. A. V. Barreira placentária de *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, p. 89-94, 2003.

LONDERO, A. T.; SEVERO, L. C.; RAMOS, C. D. Small forms and hyphae of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 72, p. 17-19, 1980.

LUNDBLAD, L. K.; THOMPSON-FIGUERO, A. J.; LECLAIR, T.; SULLIVAN, M. J.; POYNTER, M. E.; IRVIN, G.; BATES, J. H. T. Tumor necrosis factor-alpha overexpression in lung disease: a single cause behind a complex phenotype. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S.l.], v. 171, n. 12, p. 1.363-1.370, 2005.

MAGALHAES-SANTOS, I.F.; LIMA, E.S.; ANDRADE, S.G. Fibrogenesis and collagen resorption in the heart and skeletal muscle of *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: immunohistochemical identification of extracellular matrix components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97,n.5,p.703-10, 2002.

MAMONI, R. L.; NOUÉR, S. A.; OLIVEIRA, S. J.; MUSSATTI, C. C.; ROSSI, C. L.; CAMARGOS, Z. P.; BLOTTA, M. H. S. L. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, Oxford, v. 40, p. 153-159, 2002.

MARES, MA.A.; OJEDA, E.A.; KOSKO, M.P. Observations on the distribution and ecology of the mammals of Salta Province, Argentina. **Annals of the Carnegie Museum**, Pittsburgh, v..50, p. 151-206, 1981.

MARIANO, M. The experimental granulomas. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 37, p. 167-176, 1995.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis. In: SIDIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. (Ed.). **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. p. 204-221.

MELLO, D. A. Biology of *Calomys callosus* (Renger, 1830) under laboratory conditions (Rodentia, Cricetinae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 38, p. 807-811, 1978.

MELLO, D. A. *Calomys callosus* Rengger, 1830 (Rodentia-Cricetidae): its characterization, distribution, biology, breeding and management of a laboratory strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 1, p. 37-43, 1984.

MELLO, D. A. Observações preliminares sobre a ecologia de algumas espécies de roedores do cerrado, município de Formosa, Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, São Paulo, v. 10, p. 39-44, 1977.

MELLO, D. A. Roedores silvestres de alguns municípios do Estado de Pernambuco e suas regiões naturais. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, São Paulo, v. 2, p. 360-362, 1969.

MELLO, D. A.; TEIXEIRA, M. L. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia Cricetidae) with *Leishmania donovani chagasi* (Laison, 1982). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 18, p. 333-341, 1984.

MELLO, L. M.; SILVA-VERGARA, M. L.; RODRIGUES JR., V. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high interleukin-4 and interleukin-5 production. **Human Immunology**, New York, v. 63, p. 149-154, 2001.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1980.

MICHALANY, J.; MICHALANY, N. S. A new morphological concept and classification of granulomatous inflammation: the polar granulomas. **Annales de Pathologie**, Paris, v. 4, n. 2, p. 85-95, 1984.

MIGAKI, G.; SCHMIDT, R. E.; TOFT II, J. D.; KAUFMANN, A. F. Mycotic infections of the alimentary tract of nonhuman primates: a review. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 19, p. 93-103, 1982.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEA, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: Edufu, 2005.

MOLLER, D. R. Cells and cytokines involved in the pathogenesis of sarcoidosis. **Sarcoidosis, Vasculitis and Diffuse Lung Disease**, [S.l.], v. 16, p. 24-31, 1999.

MONTENEGRO, J. Acerca da inoculabilidade da blastomicose no Brasil. **Brasil Medicina**, São Paulo, v. 41, p. 808-912, 1927.

MONTENEGRO, M. R. Cartas ao editor: formas clínicas da paracoccidioidomicose. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 28, p. 203-204, 1986.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology . In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RETREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 131-150.

MOREIRA, A. P.; CAMPANELLI, A. P.; CAVASSANI, K. A.; SOUTO, J. T.; FERREIRA, B. R.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Intercellular adhesion molecule-1 is required for the early formation of granulomas and participates in the resistance of mice to the infection with the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 169, p. 1.270-1.281, 2006.

MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M. F. Paracoccidioidomicose experimental do camundongo II – Infecção intraperitoneal após sensibilização prévia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 204-211, 1981.

MURPHY, J. W.; WU-HSIEH, B. A.; SINGER-VERMES, L. M.; FERRANTE, A.; MOSER, S.; RUSSO, M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G.; KOWANKO, I. C.; RATHJEN, D. A.; MARTIN, A. J.; BUCY, R. P.; CHEN, Q. Cytokines in the host response to mycotic agents. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 32, p. 203-210, 1994.

NASCIMENTO, M.P.P.; SOARES, A.M.V.C.; DIAS-MECÍLIO, L.A.; PARISE-FORTES, M.R.; MARTINS, R.A.R.; NAKAIRA, E.T.; PERAÇOLI, M.T.S. Fungicidal activity of human monocyte-derived multinucleated giant cells induced in vitro by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 166, p. 25–33, 2008.

NEGRONI, R. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lutz's mycosis). **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 32, n. 12, p. 847-859, 1993.

NEVES, S.L.; PETRONI, T.F.; FEDATTO, P.F.; ONO, M.A. Paracoccidioidomycosis in wild and domestic animals. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v 27, n. 3, p. 481-488, 2006.

NISHIKAKU, A. S.; BURGER, E. Immunohistochemical demonstration of TGF-beta and decorin in paracoccidioid granulomas. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 8, p. 1073-1078, 2003.

NISHIKAKU, A.S.; MOLINA, R.F.; RIBEIRO, L.C.; SCAVONE, R.; ALBE, B.P.; CUNHA, C.S.; BURGER, E. Nitric oxide participation in granulomatous response induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Medical Microbiology Immunology**, New York, v.1 98, n.2, p.123-135, 2009.

NOGUEIRA, M. E. S.; MENDES, R .P.; MARQUES, S. A.; FRANCO, M. Detection of antibodies in paracoccidioidomycosis by the technique of complement-mediated lysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 19, p. 241-247, 1986.

OLIVEIRA, L. C.; BORGES, M. M.; LEAL, R. C.; ASSREUY, J.; KLOETZEL, J. K. Nitric oxide involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in *Calomys callosus* and Swiss mice. **Parasitology Research**, Berlin, v. 83, p. 762-770, 1997.

OLIVEIRA, L.L.; COLTRI, K.C.; CARDOSO, C.R.B.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; PANUNTO-CASTELO, A. T helper 1-inducing adjuvant protects against experimental paracoccidioidomycosis. **PLOs Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v.2, n.3, p.e 183, 2008.

PARISE-FORTES, M. R; MARQUES, S. A.; KUROKAWA, C. S.; MARQUES, M. E. A.; PERACOLI, M. T. S. Cytokines release from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethopim-sulfamethoxazole treatment. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 154, p. 643-650, 2006.

PETTER F, DE KARIMI ALMEIDA CR. A new laboratory rodent, Cricetida *Calomys callosus*. **Comptes rendus heddomadaires des séances de I'Académie des Sciences**, Paris, v.265, n.25, p. 1974-1976, 1967.

PINA, A.; SALDIVA, H. N.; RESTREPO, L. E. C.; CALICH, V. L. G. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 79, p. 1.202-1.213, 2006.

RAMOS-E-SILVA, M.; SARAIVA, L.E.S. Paracoccidioidomycosis. **Dermatologic Clinics**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 257-269, 2008.

RESTREPO, A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 317-322, 2000.

RESTREPO, S; TOBON, A.; TRUJILLO, J.; RESTREPO, A. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 30, p. 173-184, 1992.

RIBEIRO, R. D. New reservoirs of *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, p. 429-437, 1973.

ROJKIND, M.; DUNN, M.A. Hepatic fibrosis. **Gastroenterology**, Baltimore, v.76, n.4, p. 849-863, 1979.

SCHAFFNER, A.; DAVIS, E. E.; SHCAFFNER, T.; MARKET, M.; DOUGLAS, H.; BLAUDE, A. I. *In vitro* susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 78, p. 511, 1986.

SCOTT, J. R. A review of in-vitro assays for IgG and IgG4 antibodies: concept and potential applications. **New England and Regional Allergy Proceedings**, [S.l.], v. 8, n. 6, p. 385-388, Nov./Dec. 1987.

SILVA, A.A.; ROFFÊ, E.; LANNES-VIEIRA, J. Expression of extracellular matrix components and their receptors in the central nervous system during experimental *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, n.5, p.593-600, 1999.

SILVA, D. A.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W.; PAJUABA NETO, A. A.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 107, p. 181-195, 2002.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z. P.; MALTA, C. M.; CHADU, J. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novencinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 193-199, 2000.

SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; CALICH, L. G.; MODESTO-XAVIER, L. H.; SAKAMOTO, T. N.; SUGIZAKI, M. F.; MEIRA, D. A.; MENDES, R. P. Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in an experimental murine model. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 97, p. 113-119, 1994.

SINGER-VERMES, L. M.; BURGESS, E.; FRANCO, M. F.; MOSCARDI-BACCHI, M.; MENDES-GIANNINI, S. J. S.; CALLICH, V. L. G. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 27, p. 71-82, 1989.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F.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.

SOUTO, J. T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 156, p. 1.811-1.820, 2000.

SPIEGEL, M. R. **Estatística**. 13. reimp. São Paulo: McGraw-Hill, 1979.

SPLENDRE, A. Blastomycoses americanas. **Brasil Medicina**, São Paulo, v. 24, p. 153, 1910.

SVIDZINSKI, T. I. E. **Variabilidade microbiológica de isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* obtidos de pacientes com diferentes formas clínicas.** 1999. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1999.

TUDER, R. M.; EL IBRAHIM, R.; GODOY, C. E.; DE BRITO, T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 92, p. 179-188, 1985.

VAZ, C. A. C.; MACKENZIE, W. R.; HEARN, V. M.; CAMARGO, Z. P.; SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 88, p. 119-123, 1992.

VILCEK, J.; TSUJIMOTO, M.; PALOMBELLA, V. J.; KOHASE M, L. E. J. Tumor necrosis factor: receptor binding and mitogenic action in fibroblasts. **Journal of Cell Physiology**. Supplement, Philadelphia, v. 5, p. 57-61, 1987.

WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 10, p. 80–87, 2002.

XIDIEH, C. F.; LENZI, H. L.; CALICH, V. L.; BURGER, E. Influence of the genetic background on the pattern of lesions developed by resistant and susceptible mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 188, n. 1, p. 41-49, 1999.

ANEXO 1. Protocolo de aprovação do projeto de pesquisa emitido pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Uberlândia.



**Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)**

Campus Santa Mônica, Bloco 1J

www.comissoes.propp.ufu.br

Telefone: 3239.4531

Uberlândia, 23 de março de 2009

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o Comitê de Ética na Utilização de Animais, CEUA, iniciou seus trabalhos de avaliação e monitoração de pesquisas em janeiro de 2008. Portanto, o projeto intitulado “Desenvolvimento de modelo experimental para paracoccidiodomicose em Cricetídeos: estudo comparativo com a infecção em camundongos resistentes e susceptíveis à doença”, cujo responsável é o Dr. Adriano Mota Loyola, quando iniciado, em 2006, não possuía um comitê para analisá-lo. Contudo, após avaliação do projeto, o CEUA informa que o protocolo encontra-se aprovado segundo seu regimento.

Por ser verdade, firmo à presente.

Alcino Eduardo Bonella
Coordenador do CEUA