



**Universidade Federal de Juiz de Fora**  
**Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de Concentração em Saúde Brasileira**  
**NÚCLEO DE PESQUISA EM IMUNOLOGIA**

**CAIO CÉSAR DE SOUZA ALVES**

**INFECÇÃO INTRATORÁCICA COM**  
***Paracoccidioides brasiliensis* EM MODELO**  
**EXPERIMENTAL MURINO**

**JUIZ DE FORA**  
**2007**

CAIO CÉSAR DE SOUZA ALVES

**INFECÇÃO INTRATORÁCICA COM  
*Paracoccidioides brasiliensis* EM MODELO  
EXPERIMENTAL MURINO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de Concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde Brasileira.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Ferreira

**JUIZ DE FORA  
2007**

## TERMO DE APROVAÇÃO

CAIO CÉSAR DE SOUZA ALVES

# INFECÇÃO INTRATORÁCICA COM *Paracoccidioides brasiliensis* EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de Concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde Brasileira pela seguinte banca examinadora:

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Ana Paula Ferreira, Doutorado em Imunologia (USP)  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, ICB – UFJF

Prof<sup>a</sup>. Maria Aparecida Souza, Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada  
(USP-FMRP) Instituto de Ciências Biomédicas - UFU

Prof. Henrique Couto Teixeira, Doutorado em Imunologia (USP)  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, ICB – UFJF

Juiz de Fora  
30 / 08 / 2007

Dedico este trabalho a todos  
aqueles que o tornaram possível.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais pelo seu apoio intenso e incondicional.

A Sabrina por sua compreensão e pelo seu otimismo.

Aos meus irmãos por seus estímulos.

A minha bisavó Maria pela sua alegria de viver.

A todos os familiares por sua torcida.

A Profa. Ana Paula Ferreira por acreditar em minha pessoa.

Aos amigos do laboratório por confiarem em mim.

Àqueles(as) cujos nomes involuntariamente omitimos.

ALVES, C.C.S. **Infecção intratorácica com *Paracoccidioides brasiliensis* em modelo experimental murino.** Juiz de Fora, 94 p., 2007.

### **Resumo**

A Paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica humana causada pelo fungo dimórfico, *Paracoccidioides brasiliensis*, que acomete, principalmente, indivíduos adultos do sexo masculino. O presente estudo propôs a padronização do modelo de infecção com *P. brasiliensis* pela via intratorácica em camundongos BALB/c. Este estudo foi monitorado pela detecção do *P. brasiliensis* através da contagem de unidades formadoras de colônia e pela presença de DNA do fungo nos pulmões dos animais infectados em diferentes pontos pós-infecção (2<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup>, 60<sup>o</sup> e 90<sup>o</sup> dias) e a taxa de sobrevivência dos camundongos. Além disto, foram avaliados alguns parâmetros imunológicos como a produção de óxido nítrico, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e IL-10 por células presentes no lavado intratorácico, contagem total e diferencial do número de células do lavado intratorácico, o estudo histopatológico dos pulmões e a detecção de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* nos pulmões e no soro. Os resultados mostram um aumento gradual do número de colônias e de DNA de *P. brasiliensis* nos pulmões. Até o 15<sup>o</sup> dia após a infecção pode ser observado um aumento na produção de óxido nítrico e IFN- $\gamma$  pelas células do lavado intratorácico, bem como um aumento do número total de células e da porcentagem de leucócitos mononucleares. A partir do 30<sup>o</sup> dia após a infecção observa-se um aumento de anticorpos específicos (IgG1) no soro e no pulmão, um aumento da produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  pelas células do lavado intratorácico e conseqüente diminuição da produção de IFN- $\gamma$  e óxido nítrico. Além disso, observa-se um aumento da porcentagem de células polimorfonucleares no lavado. No estudo histopatológico pode ser constatado um aumento gradual no tamanho e complexidade dos granulomas presentes nos cortes histológicos. Os camundongos utilizados no estudo de sobrevivência começaram a morrer no 60<sup>o</sup> dia após a infecção. Os resultados mostram uma resposta inicial do hospedeiro com um perfil Th1 mudando durante a infecção para uma resposta Th2 que leva ao óbito dos camundongos BALB/c.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, BALB/c, intratorácico, IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , granuloma.

ALVES, C.C.S. **Intrathoracic infection with *Paracoccidioides brasiliensis* in experimental murine model.** Juiz de Fora, 93 p., 2007.

### **Abstract**

Paracoccidioidomycosis or South American blastomycosis, is a chronic granulomatous human male infection caused by the *Paracoccidioides brasiliensis*. The present study it considered the standardization of the model of infection with *P. brasiliensis* for the intrathoracic route in BALB/c mice. This study was monitored by the detection of the *P. brasiliensis* through the counting of colony forming units and by the presence of DNA of fungi in the lungs of the infected animals in different points (2, 7, 15, 30, 45, 60 and 90 days) and the survival rate of the mice. Moreover, some immune parameters had been evaluated as the nitric oxide production, TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-10 for cells in the intrathoracic washed, total and distinguishing counting of cells of the intrathoracic washed, the lung histopathology and the detection of specific antibodies anti-*P. brasiliensis* in the lungs and serum. The results show a gradual increase of the number of colonies and *P. brasiliensis* DNA in the lungs. Until 15 day after the infection can be observed an increase in the nitric oxide production and IFN-gamma for the cells of the washed, as well as an increase of the total number of cells and the percentage of mononuclear. From 30 day after the infection observes an increase of specific antibodies (IgG1) in the serum and the lung, an increase of the production of IL-10 and TNF-alpha for the cells of the washed and consequent reduction of the IFN-gamma production and nitric oxide. Moreover, observed an increase of the percentage of cells polimorphonuclear in the washed. In the histopathology it can be evidenced a gradual increase in the size and complexity of granulomas in the cuts. The mice used in the survival study had started to die in 60 day after the infection. The results show an initial reply of the host with a Th1 profile moving during the infection for a Th2 reply that leads to the death of the BALB/c mice.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, BALB/c, intrathoracic, IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , granuloma

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Forma de levedura do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	3
Figura 2	Forma de micélio do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	4
Figura 3	Raio-X de tórax de paciente infectado com <i>P. brasiliensis</i> .	5
Figura 4	Lesão na mucosa nasal e oral.	5
Figura 5	Lesões na pele, mucosa nasal e mucosa oral.	6
Figura 6	Cinética da infecção intratorácica com <i>P. brasiliensis</i> através da contagem de unidades formadoras de colônia.	24
Figura 7	Produtos da PCR extraídos dos pulmões dos animais após os dias 2, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 da infecção com o <i>P. brasiliensis</i> .	24
Figura 8	Sobrevivência dos camundongos BALB/c após os dias 2, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 da infecção com o <i>P. brasiliensis</i> .	26
Figura 9	Contagem total e diferencial de células do lavado intratorácico dos animais após os dias 2, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 da infecção.	28
Figura 10	Produção de IFN- $\gamma$ por células do lavado intratorácico, após estímulo ou não com antígeno de <i>P. brasiliensis</i> , nos dias 2, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 após infecção com <i>P. brasiliensis</i> .	30
Figura 11	Produção de IL-10 por células do lavado intratorácico.	31
Figura 12	Produção de TNF- $\alpha$ por células do lavado intratorácico.	32
Figura 13	Detecção de IFN- $\gamma$ no sobrenadante do macerado de pulmão dos camundongos BALB/c nos dias 30, 45, 60 e 90 após infecção com <i>P. brasiliensis</i> .	33
Figura 14	Detecção de IL-10 no sobrenadante do macerado de pulmão.	34
Figura 15	Detecção de TNF- $\alpha$ no sobrenadante do macerado de pulmão.	35
Figura 16	Detecção de IFN- $\gamma$ no soro dos camundongos BALB/c nos dias 30, 45, 60 e 90 após infecção com <i>P. brasiliensis</i> .	36
Figura 17	Detecção de TNF- $\alpha$ no soro dos camundongos.	37
Figura 18	Corte histológico de pulmão de camundongo do grupo controle.	39
Figura 19	Histopatologia de pulmão de camundongos BALB/c infectados com <i>P. brasiliensis</i> cepa 69P. 2 <sup>o</sup> Dia após a infecção.	40
Figura 20	Histopatologia de pulmão de camundongos. 7 <sup>o</sup> Dia após a infecção.	41

Figura 21	Histopatologia de pulmão de camundongos. 15 <sup>o</sup> Dia após a infecção.	42
Figura 22	Histopatologia de pulmão de camundongos. 30 <sup>o</sup> Dia após a infecção.	43
Figura 23	Histopatologia de pulmão de camundongos. 45 <sup>o</sup> Dia após a infecção.	44
Figura 24	Histopatologia de pulmão de camundongos. 60 <sup>o</sup> Dia após a infecção.	45
Figura 25	Histopatologia de pulmão de camundongos. 90 <sup>o</sup> Dia após a infecção.	46
Figura 26	Cavidade pleural de camundongo BALB/c infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	47
Figura 27	Detecção de IgG1 e IgG2a específicos anti- <i>P. brasiliensis</i> nos pulmões dos camundongos BALB/c nos dias 30, 45, 60 e 90 após infecção com <i>P. brasiliensis</i> .	49
Figura 28	Detecção de IgG1 e IgG2a específicos anti- <i>P. brasiliensis</i> no soro dos camundongos.	50
Figura 29	Produção de Óxido Nítrico por células do lavado intratorácico, após estímulo ou não com antígeno de <i>P. brasiliensis</i> , nos dias 2, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 após infecção com <i>P. brasiliensis</i> .	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>PCM</b>	Paracoccidioidomicose
<b>A/Sn</b>	Linhagem de camundongos resistentes à infecção
<b>B10-A</b>	Linhagem de camundongos susceptíveis à infecção
<b>BALB/c</b>	Linhagem de camundongos com susceptibilidade moderada à infecção
<b>C57BL/6</b>	Linhagem de camundongos com resistência moderada à infecção
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>Pb18</b>	Cepa virulenta do fungo
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>ITS-1 e OL-5</b>	Sondas específicas para o fungo
<b>gp43</b>	Glicoproteína de 43kilodaltons
<b>CBR</b>	Centro de Biologia da Reprodução
<b>69P</b>	Cepa estudada do fungo
<b>BHI</b>	Meio agar de cultura para o fungo
<b>i.tr.</b>	Intratorácica
<b>PBS</b>	Tampão salina fosfatada
<b>CFU</b>	Unidades formadoras de colônia
<b>RPMI</b>	Meio líquido para cultura de células
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>DO</b>	Densidade ótica
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
3. METODOLOGIA.....	11
3.1- Animais.....	12
3.2- Obtenção e manutenção da cepa infectante.....	12
3.3- Preparação do antígeno de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	12
3.4- Infecção intratorácica.....	13
3.5- Obtenção dos órgãos e células.....	13
3.6- Contagem de células formadoras de colônias (CFU).....	14
3.7- Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	14
3.8- Contagem total e diferencial de células.....	15
3.9- Cultura de células.....	15
3.10- ELISA (TNF-alpha, IFN-gama, IL-10).....	16
3.11- Dosagem de óxido nítrico.....	17
3.12- Avaliação histopatológica.....	17
3.13- Detecção de anticorpos específicos (IgG1 e IgG2a).....	18
3.14- Análise estatística.....	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1- Avaliação da cinética da infecção intratorácica.....	20
4.2- Taxa de sobrevivência.....	22
4.3- Perfil celular do lavado intratorácico.....	24
4.4- Perfil de citocinas durante a evolução da infecção.....	26
4.5- Análise histopatológica.....	35
4.6- Produção de IgG1 e IgG2a específica para o antígeno de Pb.....	37
4.7- Produção de Óxido Nítrico.....	40
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÕES.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
8. ARTIGO.....	68
9. ANEXO (Comprovante de submissão do artigo).....	76

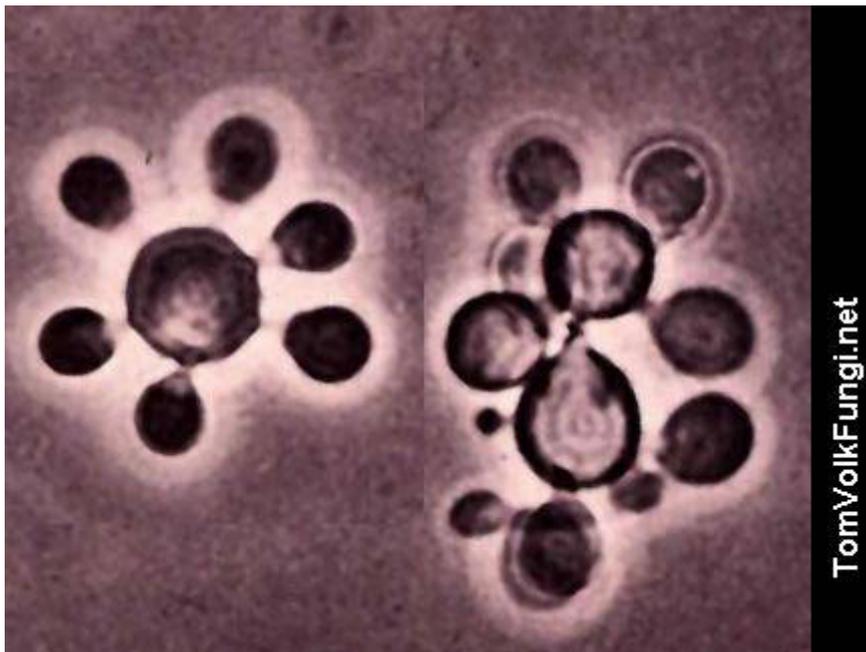
## **1. Introdução**

A paracoccidioomicose (PCM) é uma infecção crônica granulomatosa causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), um fungo dimórfico, conhecido apenas em sua forma assexuada ou imperfeita. O estudo desta micose é de suma importância, principalmente, devido à gravidade de suas formas clínicas e a endemicidade em muitas regiões do Brasil e na maioria dos países da América Latina (MARQUES *et al.*, 1983; BLOTTA *et al.*, 1999). A doença, também chamada blastomicose sul-americana ou blastomicose brasileira, foi descrita, inicialmente por Adolpho Lutz em 1908, que chamou atenção para lesões observadas na boca de pacientes. Alguns aspectos da história natural da infecção são ainda desconhecidos, devido ao fato do nicho ecológico natural não ser precisamente encontrado, o momento exato da infecção não pôde ainda ser documentado (FRANCO *et al.*, 1987). Micélios e conídeas, as formas infectantes, crescem no solo, água e em plantas à temperatura ambiente e no hospedeiro este parasito é evidenciado na forma leveduriforme (RESTREPO, 1985; McEWEN *et al.*, 1987).

Alfonso Splendore (1912) contribuiu para o estudo da morfobiologia deste fungo e em 1912 sugeriu a denominação de *Zymonema brasiliense* para designar o microorganismo causador dessa forma de micose profunda, amplamente difundida no Brasil. Floriano Paulo de Almeida (1930) revalidou e re-descreveu a espécie *brasiliense* de Splendore, dando ao referido microorganismo seu lugar em um novo gênero – *Paracoccidioides*. Em 1936, Ciferri e Redaelli colocaram esse gênero na família Paracoccidioidaceae, afastando-o, portanto, do gênero *Coccidioides*. Finalmente, em 1977 Ajello e Polonelli coloca-o na família Moniliaceae – fungos cujos conidióforos e conídios são hialinos e de cor brilhante.

O Brasil é o país de maior incidência da PCM, possuindo como focos de ocorrência os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul. A doença é menos freqüente no nordeste do país, devido à aridez do clima (WANKE *et al.*, 1994). *P. brasiliensis* apresenta-se sob a forma de levedura à temperatura de

35° a 37°C (figura 1) e sob a forma de micélio (figura 2) às temperaturas próximas a 25°C (FRANCO *et al*, 1987). No hospedeiro, este parasito é evidenciado na forma leveduriforme. Em tecidos infectados e secreções purulentas contaminadas, a parede da levedura se encontra espessada e refringente com diâmetro variável entre 5 a 30µm, isoladas ou agrupadas; com brotamentos únicos ou múltiplos (figura 1). Os brotamentos se dispõem em torno da “levedura-mãe”, estando unidos a esta última por estreitas pontes celulares. Este brotamento múltiplo propicia a observação microscópica de imagens típicas do fungo em vida parasitária, das quais tem valor diagnóstico especial à organização em “roda de leme” (McEWEN *et al.*, 1987).

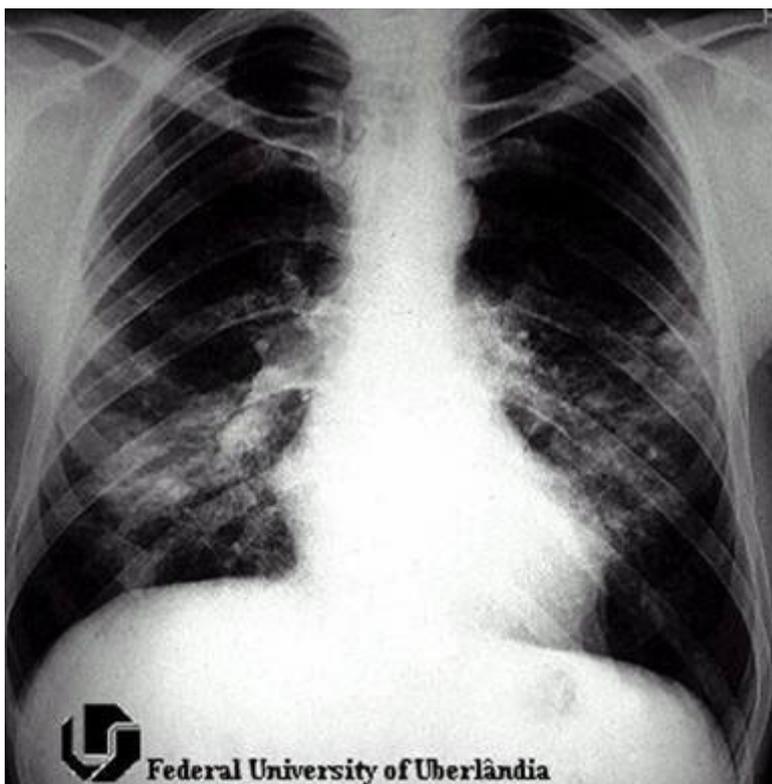


**Figura 1:** Forma de levedura do *Paracoccidioides brasiliensis* a temperatura de 37°C.



**Figura 2:** Forma de micélio do *Paracoccidioides brasiliensis* a temperatura de 25°C.

Na maioria dos casos *P. brasiliensis* penetra no organismo pelo trato respiratório levando a lesão pulmonar (figura 3), podendo ainda se localizar na pele (figura 4 e 5), mucosa anus-retal, mucosa nasal (figura 4 e 5) e conjuntiva, como resultado da disseminação linfática ou hematogênica (LONDERO, 1986). A importância da via inalatória na infecção é relacionada ao fato de o fungo já ter sido isolado de vegetais, cujos esporos contidos nestes vegetais se desprendem do micélio constituindo uma importante forma infecciosa quando inalados. (LOPEZ e RESTREPO, 1983).



**Figura 3:** Raio-X de tórax de paciente infectado com *P. brasiliensis*, apresentando nódulos granulomatosos.



**Figura 4:** Lesão na mucosa nasal e oral características da progressão da paracoccidioomicose doença.



**Figura 5:** Lesões na pele, mucosa nasal e mucosa oral características da progressão da paracoccidioidomicose doença.

A maioria dos indivíduos exposta ao parasito desenvolve somente PCM assintomática ou subclínica, podendo ser detectados nódulos nos pulmões, que são característicos da PCM infecção (figura 3). Apenas uma minoria apresenta PCM doença, que é caracterizada por apresentar uma evolução crônica com lesões teciduais granulomatosas e alteração progressiva do estado geral dos pacientes, acometendo principalmente, indivíduos adultos do sexo masculino (figuras 4 e 5). Os baixos índices desta doença na população feminina são atribuídos ao efeito inibitório do 17- $\beta$ -estradiol na transformação micélio-levedura, que é um fator chave no processo de invasão do hospedeiro (BRUMMER *et al.*, 1993; SANO *et al.*, 1999; ARISTIZABAL *et al.*, 2002.). Além disso, outros fatores relacionados à expressão da PCM doença podem estar associados ao alcoolismo, à desnutrição, à imunossupressão induzida em transplantados renais, às neoplasias ou à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. (LEÃO e MENDES, 1980; MONTENEGRO, 1986; FRANCO e MONTENEGRO, 1987; CLEMONS e STEVENS, 1990; FIGUEIREDO *et al.*, 1992;

MARTINEZ e MOYA, 1992). A grande maioria dos casos apresenta uma involução total dos fungos ou a formação de focos quiescentes, no qual o microorganismo persiste na forma latente por até 60 anos (ÂNGULO ORTEGA, 1972). O surgimento da PCM doença estaria então relacionado com a reativação da lesão promovida pela diminuição na resposta imunológica do indivíduo (MARQUES *et al.*, 1983).

Uma vez diagnosticada a PCM, o tratamento deve ser efetivado imediatamente. As sulfas e o cetoconazol têm apresentado resultados considerados satisfatórios (SILVA *et al.*, 1994). No entanto, o itraconazol e principalmente a anfotericina B são as drogas de escolha para o tratamento da PCM, proporcionando uma terapia bastante eficaz nas formas graves. Entretanto, deve-se ressaltar que as recidivas são freqüentes podendo a doença, deixar sérias seqüelas e até mesmo levar à morte. (BRUMMER *et al.*, 1993).

Inúmeros estudos da atividade imunológica do hospedeiro infectado têm contribuído para aumentar a compreensão da dinâmica das interações parasito-hospedeiro na PCM (CASTAÑEDA *et al.*, 1988a; SINGER-VERMES *et al.*, 1993). Uma vez que a PCM induz uma forte ativação do sistema imune parece que diferentes mecanismos imunoregulatórios estão presentes durante a infecção (MUSATTI *et al.*, 1976; PERAÇOLLI *et al.*, 1982; CASTAÑEDA *et al.*, 1988b; KASHINO *et al.*, 1996; MAMONI *et al.*, 2002; ARRUDA *et al.*, 2004). A resposta imunológica celular ocupa papel de destaque na defesa do hospedeiro ao *P. brasiliensis*, determinando a severidade da micose e o espectro de suas formas clínicas. A complexidade dessa resposta sustenta diferentes hipóteses sobre a participação e o grau de envolvimento dos diferentes tipos celulares nela envolvidos (CALICH *et al.*, 1998; CANO *et al.*, 2000; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2003).

Vários estudos na infecção com *P. brasiliensis* procuram comparar a resposta imune, utilizando-se linhagens de camundongos resistentes (A/Sn) e susceptíveis (B10-A) à infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis* (CANO *et al.*, 1995). Camundongos da

linhagem resistente, quando infectados através da via intraperitoneal (i.p.), com a cepa virulenta de *P. brasiliensis* (Pb18) apresentam eficiente ativação de macrófagos, com altos níveis de IFN- $\gamma$ , uma das mais importantes citocinas que atuam na ativação de macrófagos, mostrando tendência de resolução do processo infeccioso, por meio de resposta mediada por clones T “helper” 1 (Th1), apresentando por outro lado baixos níveis de anticorpos específicos IgG1 e IgG2b, característicos do perfil de linfócitos Th2 (CALICH *et al.*, 1998; KURITA *et al.*, 1999; SOUTO *et al.*, 2000).

Outros estudos mostraram que camundongos susceptíveis são precocemente imunossuprimidos quando analisados após infecção com o isolado patogênico Pb 18 deste fungo (i.p.). Esta imunossupressão pode ser verificada por: 1) incapacidade dos animais B10A desenvolverem resposta humoral a antígenos heterólogos (TEIXEIRA *et al.*, 1987); 2) incapacidade de estes animais apresentarem reação de hipersensibilidade tardia após serem desafiados com os antígenos específicos (TEIXEIRA, 1987; FAZIOLI, 1990); 3) baixa atividade funcional dos macrófagos avaliada pela técnica de espraiamento de macrófagos sobre o vidro (KASHINO, 1990). A imunossupressão observada parece resultar de uma resposta imune mediada por clones de linfócitos Th2. Estudos onde é induzida a imunomodulação Th1-Th2 da resposta murina contra *P. brasiliensis* demonstram que o aumento de isótipos do tipo Th1 (IgG2a) contribui para a sobrevivência dos camundongos (AMARAL *et al.*, 2005), além disso, camundongos nocaute para IL-4 mostraram-se mais resistentes a progressão da infecção (PINA *et al.*, 2004) e camundongos geneticamente alterados são capazes de eliminar *P. brasiliensis*, quando tem a produção de IL-4 inibida (PINTO *et al.*, 2006). Foi observado também, que camundongos da linhagem BALB/c apresentam resposta imune intermediária entre a susceptibilidade e a resistência (CALICH *et al.*, 1985).

A análise de cortes histológicos permite a caracterização de células presentes na resposta imune em diferentes tecidos, como a pele das patas (BELONE *et al.*, 2001) e os pulmões (SOUTO *et al.*, 2000) de camundongos BALB/c infectados, facilitando a visualização dos infiltrados inflamatórios, bem como de *P. brasiliensis* sendo circundados por essas células nestes tecidos.

A utilização de modelos experimentais através de diferentes vias de infecção permite a diversificação nas abordagens dos estudos de resposta imune em vários tipos de infecções. Outras rotas de infecção com *P. brasiliensis* utilizam tanto o modelo de intraperitoneal (CALICH e KASHINO, 1998), como o intratraqueal/intranasal (pulmonar) (CANO *et al.*, 1995). A infecção por via intratorácica permite o estudo de mediadores químicos e citocinas envolvidos no desenvolvimento do processo inflamatório, viabilizando uma abordagem direta nas células presentes no foco inflamatório para avaliação do estado de ativação e sinalização celular (PEAO *et al.*, 1992; MOHAMMED *et al.*, 1999; CUZZOCREA *et al.*, 2004).

Estudos indicam que os macrófagos residentes na cavidade pleural (intratorácica) apresentam papel crucial na caracterização da perturbação naquele microambiente e orquestramento subsequente da infiltração de outras células (CAILHIER, *et al.* 2005). Além disso, a injeção intratorácica de *Mycobacterium bovis* - BCG, em camundongos C57BL/6, induz uma intensa reação inflamatória, caracterizada pelo acúmulo, principalmente, de eosinófilos (MENEZES DE LIMA Jr. *et al.*, 1997). Diferentes mecanismos podem estar relacionados com o influxo de diferentes tipos celulares para a cavidade pleural, como as quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e MCP-1 envolvidas na migração celular induzida pelo BCG (MENEZES DE LIMA Jr. e HENRIQUES, 1997; MOURA *et al.*, 1999).

A biologia molecular aparece nos últimos tempos como uma forte aliada no estudo de patógenos, tanto para sua caracterização (banco de genes), como para seu diagnóstico preciso e rápido. Dentre as técnicas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem obtido destaque na

detecção da PCM, pois esta utiliza seqüências genéticas específicas do fungo (ITS-1 e OL-5), garantindo assim sua elevada sensibilidade, especificidade e praticidade de realização. Para pesquisa de *Paracoccidioides brasiliensis* os métodos moleculares, são aplicados na determinação das áreas de infecção (RESTREPO *et al.*, 2001), através de rastreamento do solo detectando a gp43 (VILELA *et al.*, 2005), na determinação de isolamento geográfico do fungo (DIEZ *et al.*, 1999; NINO-VEGA *et al.*, 2000), diferenciação de cepas (MOTTA *et al.*, 2002), na formação de banco de dados, no diagnóstico de casos clínicos (TRAVASSOS *et al.*, 1995; ORTIZ *et al.*, 1998) e no avanço experimental da compreensão da infecção. (LACAZ *et al.*, 1997; NAKAGAWA ITANO *et al.*, 2002).

Goldani e Sugar (1998) mostraram que com apenas 10 pg de DNA de *P. brasiliensis* extraído do soro de animais infectados é possível detectar a presença do fungo por PCR, sendo que os tempos desta detecção estão correlacionados com a contagem do número de unidades formadoras de colônias no pulmão destes animais. Além disto, foi feita a amplificação das seqüências ribossomais 5,8S e 28S da cepa Pb01 de *P. brasiliensis* utilizando-se as sondas ITS-1, ITS-4 e OL-5 e OL-3 e verificou-se que apenas as sondas ITS-1 e OL-5 amplificam especificamente o DNA das amostras de *P. brasiliensis* e não de outros fungos testados (MOTOYAMA *et al.*, 2000). Já foi determinada também, a alta especificidade da técnica de PCR quando comparados a fungos com grande proximidade filogenética, como o *Histoplasma capsulatum* (BIALEK *et al.*, 2000) ou outras infecções micóticas ou bacterianas (ORTIZ *et al.*, 1998), bem como a capacidade de identificar cepas mais ou menos virulentas (BORBA *et al.*, 2005).

Baseado no exposto acima, para entender como os mecanismos imunes operam durante as infecções, é importante estabelecer os padrões de resistência e caracterizar a resposta imune associada a modelos experimentais que buscam mimetizar a forma natural da doença. Considerando-se que a Paracoccidioidomicose é iniciada no trato respiratório, o objetivo do

presente estudo foi a padronização da infecção intratorácica com *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos da linhagem BALB/c, monitorando a detecção do fungo através da contagem das unidades formadoras de colônia e presença de DNA por PCR, além da avaliação da resposta imune dos camundongos contra o *P. brasiliensis*.

## **2. Objetivos**

## 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil da resposta imune frente à infecção intratorácica com *P. brasiliensis* em camundongos BALB/c.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar a cinética da infecção intratorácica com *P. brasiliensis*, através da contagem de unidades formadoras de colônias e PCR do DNA do fungo obtido do pulmão dos animais infectados;

- Avaliar os níveis de citocinas IFN-gama, IL-10, TNF-alfa e do óxido nítrico produzidas pelas células do lavado intratorácico antes e após estímulo *in vitro* com Ag solúvel de *P. brasiliensis* nos dias 2, 7, 14, 30, 45, 60 e 90 após a infecção com *P. brasiliensis*;

- Avaliar os níveis de citocinas IFN-gama, IL-10, TNF-alfa presentes nos sobrenadantes dos macerados dos pulmões nos dias 2, 7, 14, 30, 45, 60 e 90 após a infecção com *P. brasiliensis*;

- Avaliar os níveis de citocinas IFN-gama, IL-10, TNF-alfa presentes no soro dos animais nos dias 2, 7, 14, 30, 45, 60 e 90 após a infecção com *P. brasiliensis*;

- Avaliar o perfil histopatológico dos pulmões durante o curso da infecção;

- Quantificar os anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para o antígeno de *P. brasiliensis*, nos soros e no sobrenadante dos macerados dos pulmões dos animais infectados durante o curso da infecção.

### **3. Metodologia**

### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c normais, machos, de seis a oito semanas, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos na sala de manutenção animal do laboratório de Imunologia em micro-isoladores na estante climatizada com água e ração apropriados.

O presente estudo contou com a aprovação do comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, registrado no PROTOCOLO 11/2003-CEA.

### **3.2 Obtenção e manutenção da cepa infectante**

A cepa infectante foi obtida de uma paciente infectada do sexo feminino. Esta cepa foi descrita e caracterizada segundo Burgos e colaboradores (1985), denominada de cepa 69P e doada pelo Hospital Universitário da UFJF para utilização neste estudo. Para manutenção da cepa no laboratório, a amostra foi repicada a cada 20 dias em tubos de ensaio contendo 9 mL de BHI (brain-heart-infusion) (Difco, USA) inclinado e mantidos em estufa a 36°C.

### **3.3 Preparação do antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis***

As células leveduriformes de *P. brasiliensis* recolhidas foram transferidas para tubo Falcon de 15 mL contendo 10ml de salina estéril. Após ser homogeneizado em Vortex (Ika), 1400rpm por 10 minutos, as células leveduriformes passaram por um processo de ultra-som

por dois ciclos de 10 minutos para separação dos grumos de *P. brasiliensis*. O material foi então centrifugado a 15°C por 30 minutos a 3000rpm (Hermle, Germany). O sobrenadante foi coletado e a determinação da quantidade ( $\mu\text{g/ml}$ ) de possíveis antígenos foi realizada pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

### **3.4 Infecção intratorácica**

A infecção foi induzida pela injeção intratorácica (i.tr.) de  $10^6$  formas leveduriformes de *P. brasiliensis*, preparado em 100  $\mu\text{L}$  de tampão-salina-fosfatada (PBS) estéril e o grupo controle recebeu igual volume de PBS estéril, de acordo com a técnica descrita por Spector (1956) e adaptada para camundongos por Henriques e colaboradores (1990). Dos 62 camundongos infectados, 20 foram mantidos em separado para estudo de sobrevivência. Em cada ponto do período de tempo estudado após a infecção (2<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup>, 60<sup>o</sup> e 90<sup>o</sup> dias), 6 camundongos infectados e 2 controles foram sacrificados.

### **3.5 Obtenção dos órgãos e células**

Foi feito o sangramento do plexo oftálmico a partir do 30<sup>o</sup> dia após a infecção para obtenção do soro dos camundongos. Todos os camundongos envolvidos no experimento foram sacrificados por “overdose” de anestesia (NaCl 0,9%, Xilazina 2% e Ketamina 5%). A caixa torácica foi aberta e a cavidade lavada com 1 mL de PBS. O lavado intratorácico foi coletado e o seu volume medido com o auxílio de uma pipeta automática. O pulmão direito foi coletado e utilizado no procedimento de contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) de *P. brasiliensis*. Parte do pulmão esquerdo foi fixada em solução de formol

tamponado 10% para avaliação histológica, e parte congelada imediatamente para ser utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR).

### **3.6 Contagem de células formadoras de colônias (CFU)**

O pulmão direito de cada camundongo que foi sacrificado, foi triturado e homogeneizado em 1 mL de PBS estéril, 100µl foi submetido à determinação do CFU e o restante para a detecção de anticorpo específico e citocinas. Foram feitas diluições seriadas do homogeneizado. Cada amostra foi colocada em meio BHI enriquecido com 5% de soro de cavalo. Em seguida as placas foram incubadas em estufa de 36°C por 15 dias. Ao término do período de incubação, o número de unidades formadoras de colônia de *P. brasiliensis* (Pb-CFU) foi contado visualmente.

### **3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Fragmentos do pulmão de camundongos (infectados ou controles) e leveduras da cultura de *P. brasiliensis* foram transferidas para microtubos que continham 900µL do tampão de extração (Tris-HCl 100mM, EDTA 20mM, NaCl 1,4M, CTAB 2%, RNase 80µg/ml, PVP 1%, Ditiotretitol 10% e Proteinase K 20ng/ml) (Invitrogen, CA, USA) e incubados a 50°C por 18h. O DNA foi precipitado com isopropanol gelado (Invitrogen) por 48h a -20°C, e então lavado com etanol 70% e em seguida dissolvido em tampão TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM). A concentração de DNA foi avaliada por espectrofotometria a 280/260nm (GeneQuant pro, Amersham Biosciences, UK), cuja a concentração média foi 800ng/µl.

Os ciclos objetivaram amplificar o gene ribossômico ITS, utilizando os iniciadores ITS-1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e OL-5 (5'-TGT GAC GAA GCC CCA TAC G-3') (MOTOYAMA *et al.*, 2000), que gerariam um produto de PCR de 496pb. A reação de PCR foi feita para conter 30ng/ml DNA, 1 U de Taq polimerase, 0,5  $\mu$ M de cada iniciador, 0,25mM de dNTPs e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) em um volume final de 25 $\mu$ L. As reações de amplificação foram realizadas utilizando um método de 'touchdown' com 95°C/2min, 10 ciclos de 95°C/1min, 64°C/1min e 72°C/1,5min, 35 ciclos de 95°C/1min, 54°C/1min e 72°C/1,5min e 72°C/10min. A reação da PCR foi realizada no GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, USA). Os produtos da amplificação do DNA foram carregados no gel nativo de poliacrilamida (5%, 400 volts, 1,5h). Os produtos foram visualizados pela coloração com prata e os fragmentos foram identificados usando a escala de 100pb.

### **3.8 Contagem total e diferencial de células**

O número total de células foi determinado em solução de Türk (diluição de 1:40) em câmara de Neubauer (microscópio óptico em aumento de 100x). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em citoesfregaços corados pelo método de Panótico rápido (microscópio óptico em objetiva de imersão, aumento de 1000x).

### **3.9 Cultura de células**

Células do lavado intratorácico de camundongos foram preparadas em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 0,5% de antibiótico e 1% de aminoácidos não essenciais, e cultivadas em placas de cultura de 24 poços por 48 horas, na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL, em 500 $\mu$ L. As células foram estimuladas *in vitro* ou não com o antígeno solúvel de *P. brasiliensis* (20 $\mu$ g/ml). Após o período de cultivo em estufa de CO<sub>2</sub>, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados e congelados a -20°C, para posterior dosagem de citocinas e óxido nítrico.

### **3.10 ELISA (TNF-alfa, IFN-gama, IL-10)**

Os sobrenadantes de cultura, macerado de pulmão e soro dos camundongos infectados com *P. brasiliensis* e controles, foram submetidos à técnica de ELISA de captura (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 kit BD OptEIA, CA, USA). Placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão segundo as normas do fabricante, e incubadas por 18h a 4°C. Após este período os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS-Tween 20 (PBST) + 10% SFB, por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes em PBST e adicionadas as curvas-padrão para as respectivas citocinas, diluídas na razão de 1:2. Nos poços seguintes as amostras dos sobrenadantes de cultura foram distribuídas e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Terminada a incubação as placas foram lavadas e o 2º anticorpo biotilado + streptavidina foi adicionado e incubado por mais 1 hora a temperatura ambiente. Mais quatro lavagens foram feitas e a reação foi revelada pela adição do substrato contendo TMB. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M e a leitura feita em leitor de ELISA (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, USA) a 450 nm. As quantidades de

citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações das citocinas recombinantes.

### **3.11 Dosagem de óxido nítrico**

Os sobrenadantes das culturas de células do lavado intratorácico dos camundongos foram analisados para quantificação de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) através da reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Aliquotas de 100 $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram incubadas com 50 $\mu\text{L}$  de sulfanilamida (Sigma) a 1% e 50 $\mu\text{L}$  de N-1-dihidrocloreto de naftiletlenodiamina (Sigma) a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5% (Sigma) em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente a absorbância foi medida, em comprimento de onda de 540nm. A produção de  $\text{NO}_2$  foi quantificada através de comparação com curva-padrão, feita com diferentes concentrações de  $\text{NaNO}_2$ .

### **3.12 Avaliação histopatológica**

Para avaliação histopatológica, fragmentos do pulmão dos animais dos grupos controle e infectados foram fixados em solução de formol tamponado 10% por 24 horas. Após os procedimentos rotineiros para inclusão em parafina, foram realizados cortes de 5 $\mu\text{m}$  de espessura, semi-seriados, que foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico e fotografadas.

### **3.13 Detecção de anticorpos específicos (IgG1 e IgG2a)**

Placas de ELISA foram sensibilizadas com o antígeno solúvel de *P. brasiliensis* e incubadas por 18h a 4°C. Então, lavadas com PBS-Tween 20 (PBST) e bloqueadas com PBST + 10% SFB, por 2 horas. Após este período, as placas foram novamente lavadas quatro vezes em PBST e, em seguida, adicionados os sobrenadantes de macerados de pulmão e os soros de camundongos. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C. Terminada a incubação as placas foram lavadas e adicionados os anticorpos anti-IgG1 e IgG2a conjugados à peroxidase e incubadas por mais 1 hora a temperatura ambiente. Mais quatro lavagens foram realizadas e a reação revelada pela adição do substrato contendo ácido cítrico 0,1 M, fosfato de sódio 0,2 M, água destilada, cromógeno OPD e água oxigenada 0,03%. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 1M e a leitura feita em leitor de ELISA a 492nm. As detecções dos anticorpos específicos foram quantificadas como densidade ótica (DO).

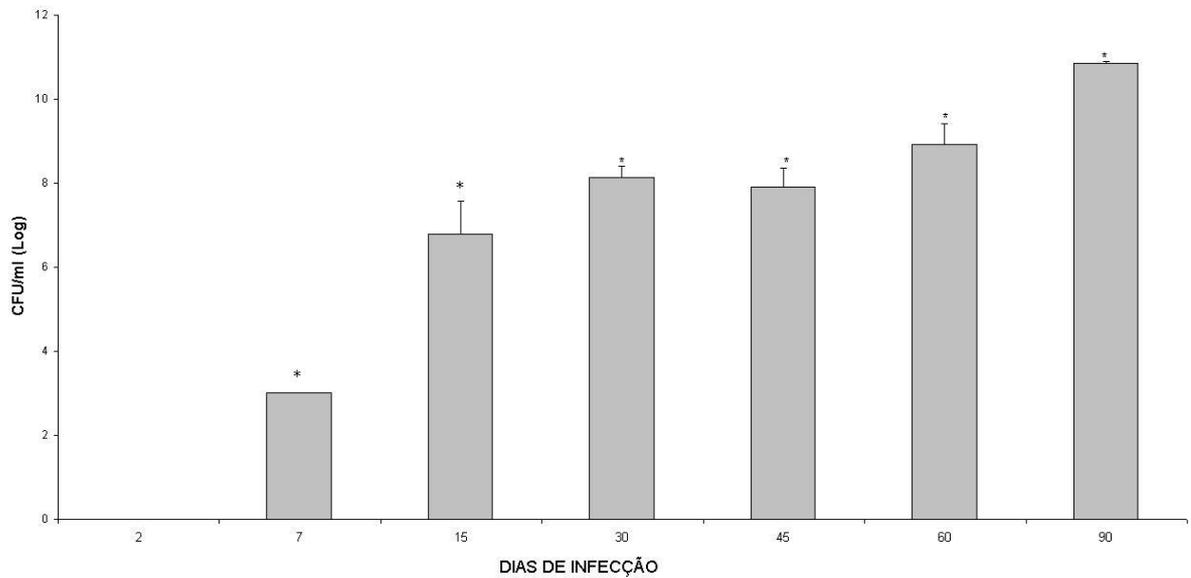
### **3.14 Análise estatística**

As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para determinação das diferenças significantes entre os grupos de camundongos, com nível de significância menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

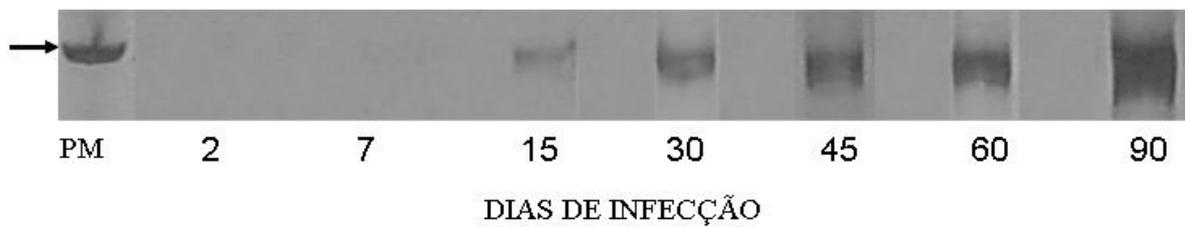
## **4. Resultados**

#### **4.1 Avaliação da evolução da infecção intratorácica**

A evolução da infecção foi caracterizada pelo aumento linear do número de colônias de *P. brasiliensis* nos pulmões dos camundongos, com um significativo aumento ( $p < 0,05$ ) em todos os pontos analisados a partir do 7<sup>o</sup> dia após a infecção, quando comparados com o grupo controle e o 2<sup>o</sup> dia após a infecção (Figura 6). Os produtos da PCR mostraram também um aumento gradativo de DNA detectado nos fragmentos de pulmão (Figura 7) com a progressão da infecção, correlacionando-se com o aumento de unidades formadoras de colônia.



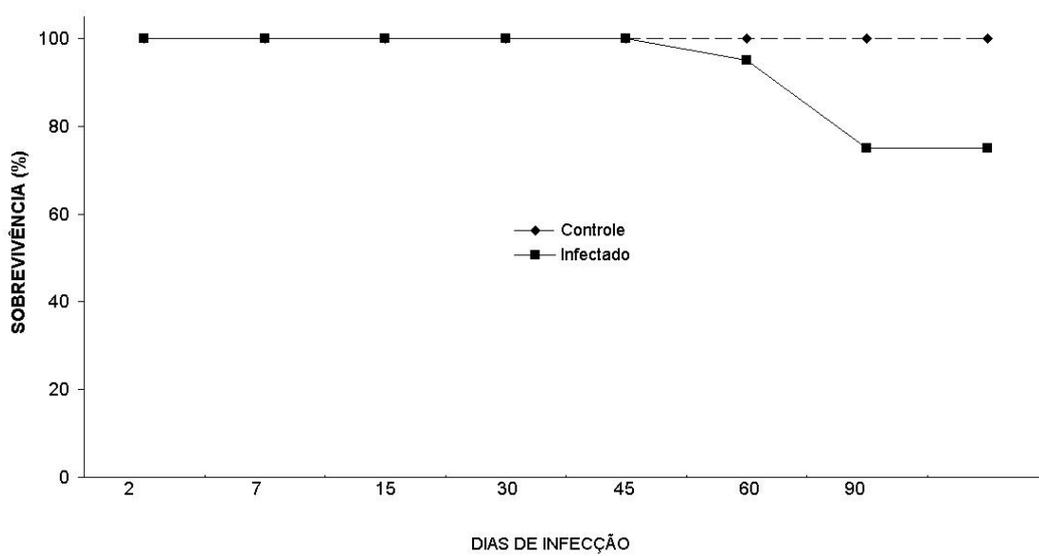
**Figura 6:** Cinética da infecção intratrorácica com *P. brasiliensis* através da contagem de unidades formadoras de colônia após os dias 2, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 de infecção. \* Representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao 2º dia após a infecção.



**Figura 7:** Produtos da PCR extraídos dos pulmões dos animais após os dias 2, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 da infecção com o *P. brasiliensis*. PM: peso molecular → 496 pb.

## **4.2 Taxa de sobrevivência**

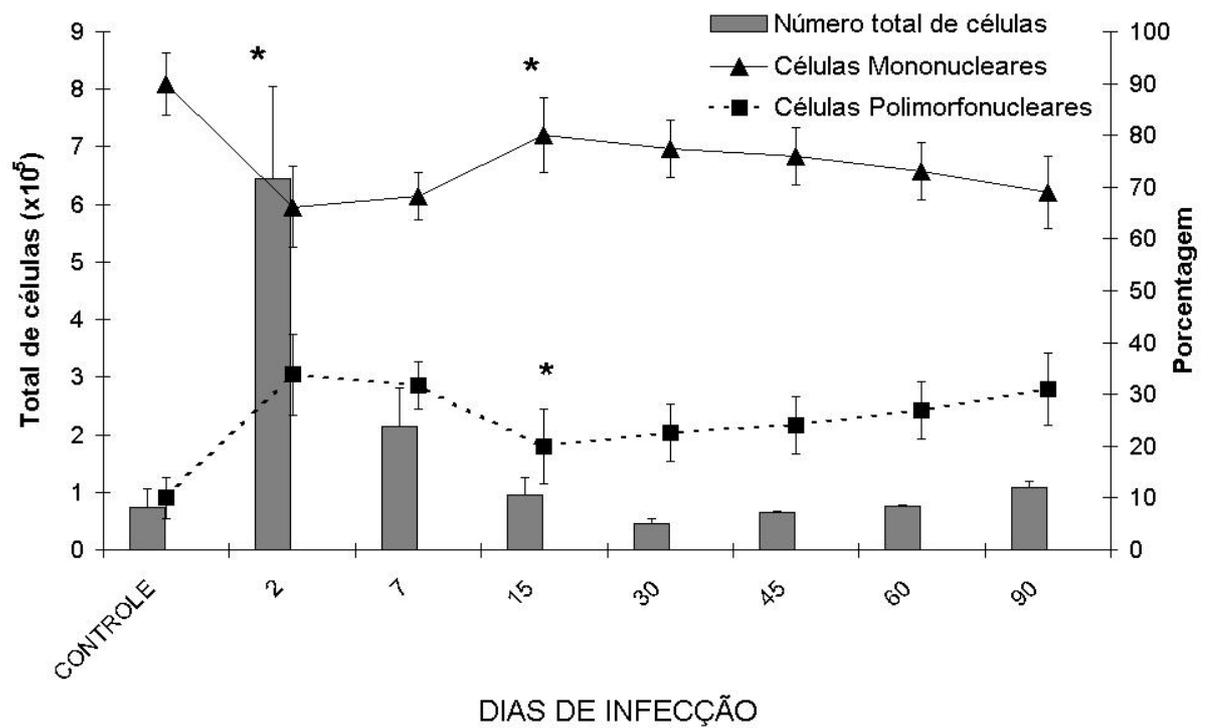
Os camundongos mantidos em separado para análise da sobrevivência após a infecção (n=20) começaram a morrer no 60<sup>o</sup> dia após a infecção, apresentando-se neste ponto uma porcentagem de 95% de sobrevivência. A análise de sobrevivência foi encerrada no 90<sup>o</sup> dia após a infecção, com 75% de sobrevivência (Figura 8).



**Figura 8:** Sobrevivência dos camundongos BALB/c após os dias 2, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 da infecção com o *P. brasiliensis*.

### **4.3 Perfil celular do lavado intratorácico**

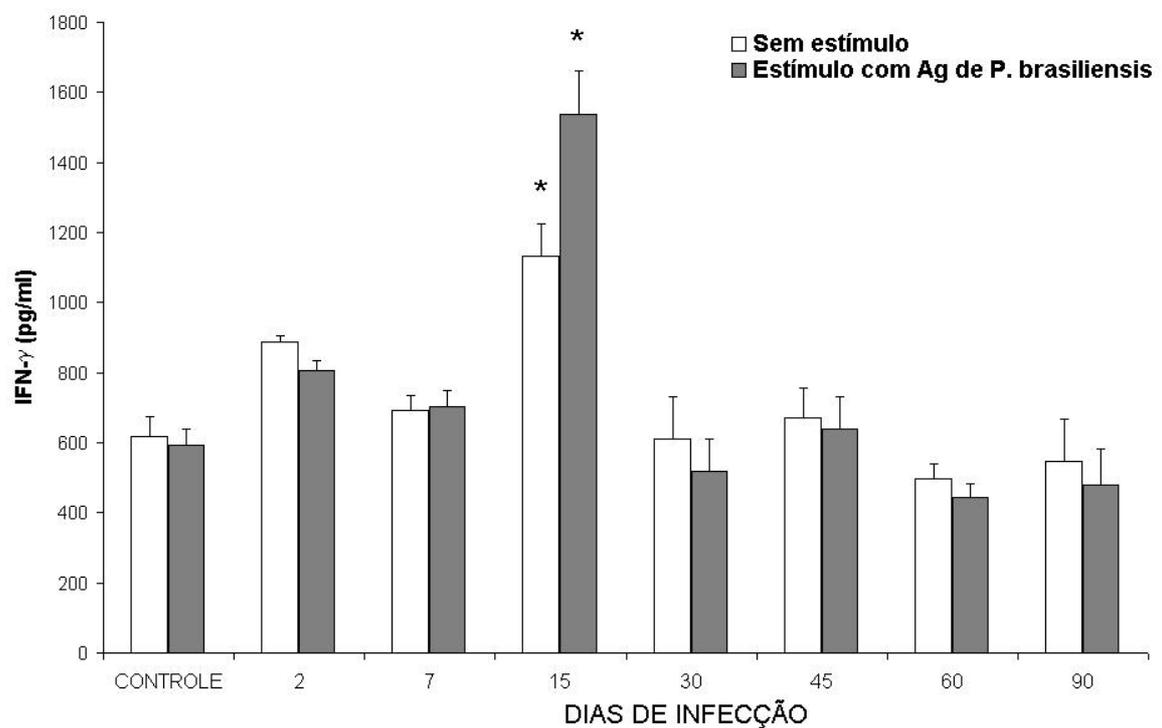
A avaliação do número total de células no lavado intratorácico mostrou um significativo aumento ( $p < 0,05$ ) no número total de células no 2º dia após a infecção, com conseqüente redução do número total de células até o 90º dia (Figura 9). Já a análise do perfil celular mostrou um aumento das células mononucleares no 15º dia após a infecção, tendendo a diminuição até o 90º dia. Ao contrário o número de células polimorfonucleares (PMN) diminuiu no 15º dia após a infecção e tendeu a retornar aos níveis iniciais no 90º dia após a infecção (Figura 9).



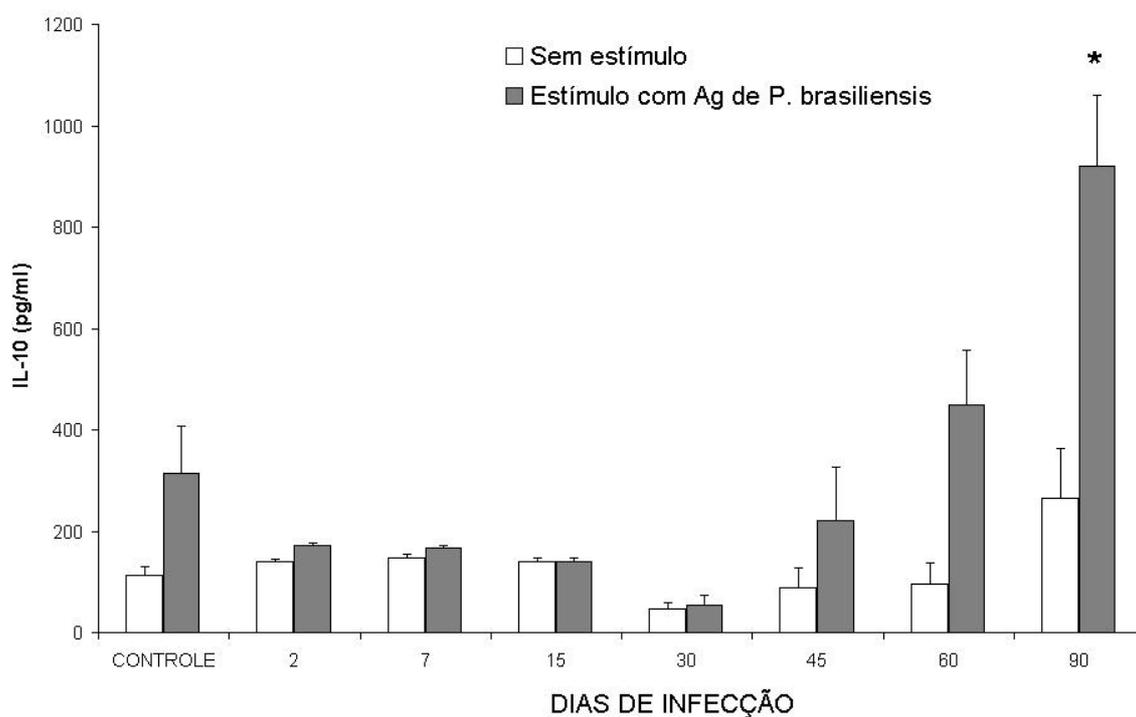
**Figura 9:** Contagem total e diferencial de células do lavado intratorácico dos animais após os dias 2, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 da infecção com o *P. brasiliensis*. \* representa a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos outros dias de infecção.

#### 4.4 Perfil de citocinas durante a evolução da infecção

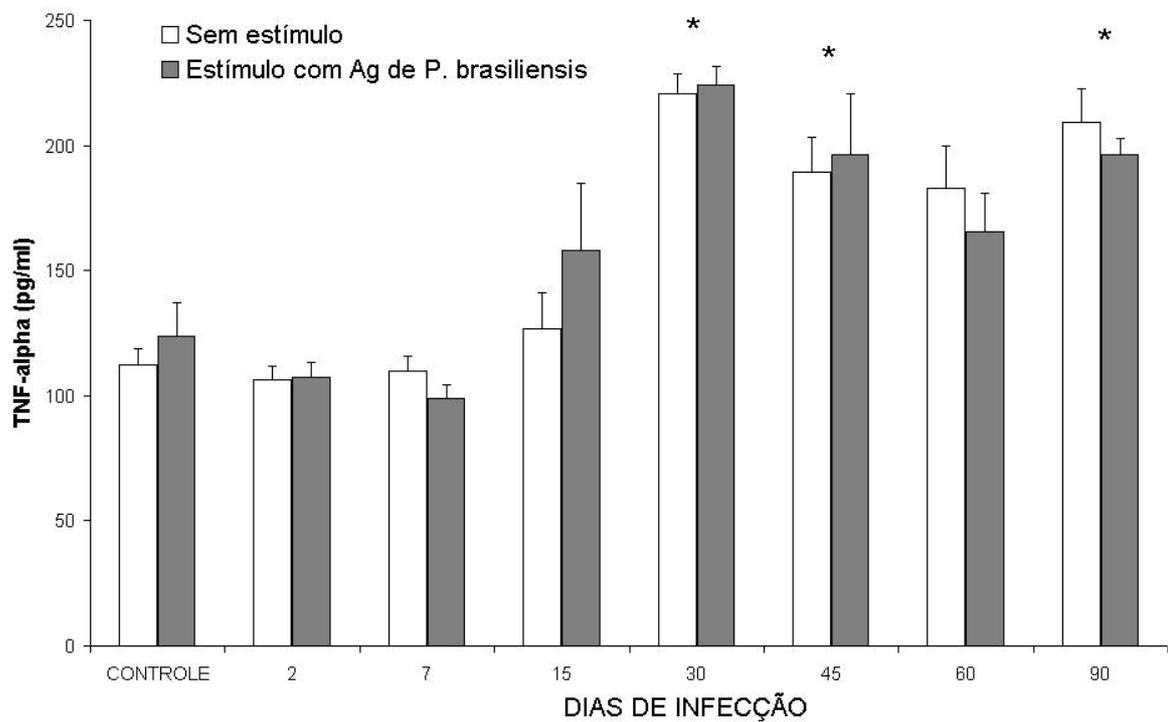
O perfil de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  foi avaliado nos sobrenadantes das células do lavado intratorácico, após estímulo ou não com o antígeno de *P. brasiliensis*, e também no sobrenadante dos macerados dos pulmões e soro dos animais infectados com *P. brasiliensis*. Células pleurais de camundongos infectados mostraram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de produção de IFN- $\gamma$  no 15<sup>o</sup> dia após a infecção, quando comparados com os outros pontos da infecção, havendo diminuição a partir desse ponto de observação (Figura 10). Por outro lado, a produção de IL-10 começa a aumentar a partir do 45<sup>o</sup> após a infecção, apresentando um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no 90<sup>o</sup> dia após a infecção, quando comparado aos períodos anteriores (Figura 11). A produção de TNF- $\alpha$  apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no 30<sup>o</sup> dia após a infecção, no entanto, no 45<sup>o</sup> dia e no 90<sup>o</sup> dia uma produção menor que a do 30<sup>o</sup> dia após a infecção, porém significativamente ( $p < 0,05$ ) mais alta do que nos pontos iniciais da infecção (Figura 12). A detecção de citocinas presentes nos sobrenadantes dos macerados de pulmão mostrou um aumento na produção de IFN- $\gamma$  já a partir do 45<sup>o</sup> dia, apresentando o pico de produção no 60<sup>o</sup> dia após a infecção ( $P < 0,05$ ), com redução drástica no 90<sup>o</sup> dia (Figura 13). A produção de IL-10 apresentou-se elevada no 30<sup>o</sup> dia após a infecção com queda significativa ( $p < 0,05$ ) no 90<sup>o</sup> dia após a infecção (Figura 14). Já a produção de TNF- $\alpha$  manteve-se significativamente aumentada ( $p < 0,05$ ) no 60<sup>o</sup> dia após a infecção (Figura 15), acompanhando o mesmo perfil da produção de IFN- $\gamma$ . No soro dos camundongos pode ser observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no 30<sup>o</sup> dia após a infecção com posterior queda até o 90<sup>o</sup> dia após a infecção (Figuras 16 e 17).



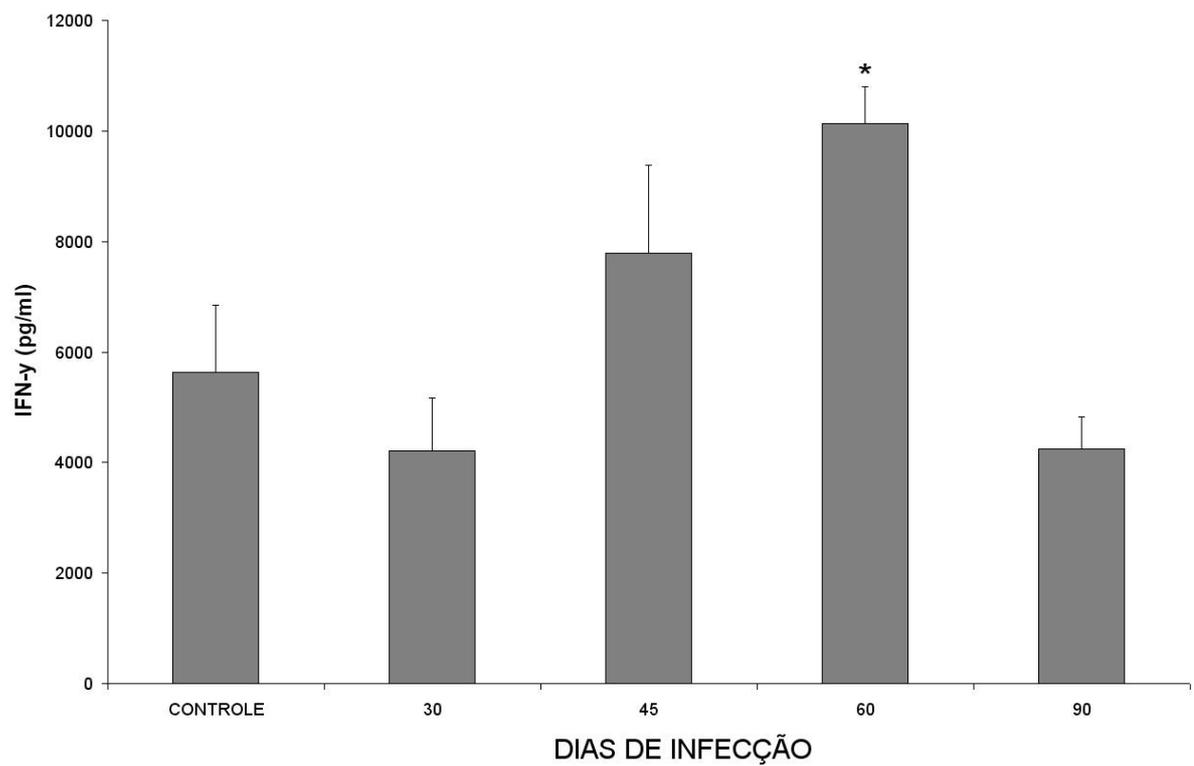
**Figura 10:** Produção de IFN- $\gamma$  por células do lavado intratorácico, após estímulo ou não com antígeno de *P. brasiliensis*, nos dias 2, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 após infecção com *P. brasiliensis*. \*  $p < 0,05$  quando comparados aos dias 2, 7, 30, 45, 60 e 90 após infecção e ao controle (camundongo não infectado).



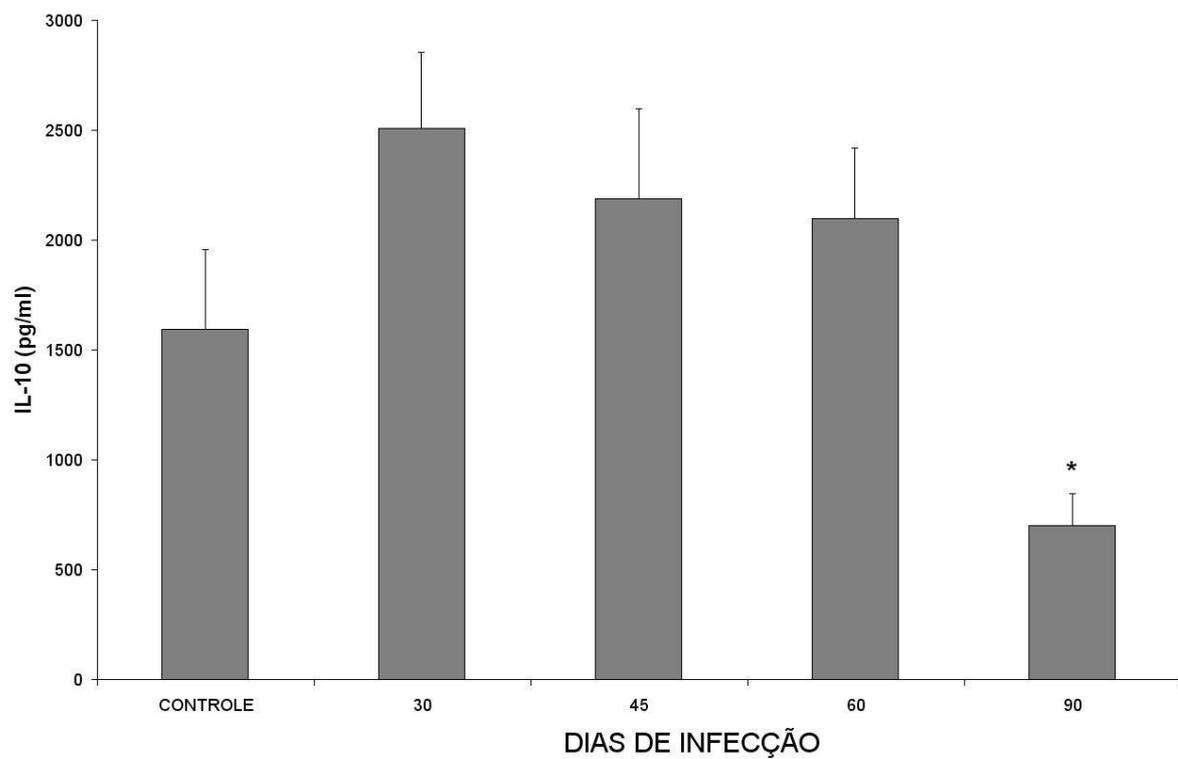
**Figura 11:** Produção de IL-10 por células do lavado intratorácico, após estímulo ou não com antígeno de *P. brasiliensis*, nos dias 2, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 após infecção com *P. brasiliensis*. \*  $p < 0,05$  quando comparados aos dias 2, 7, 15, 30, 45 e 60 após infecção e ao controle (camundongo não infectado).



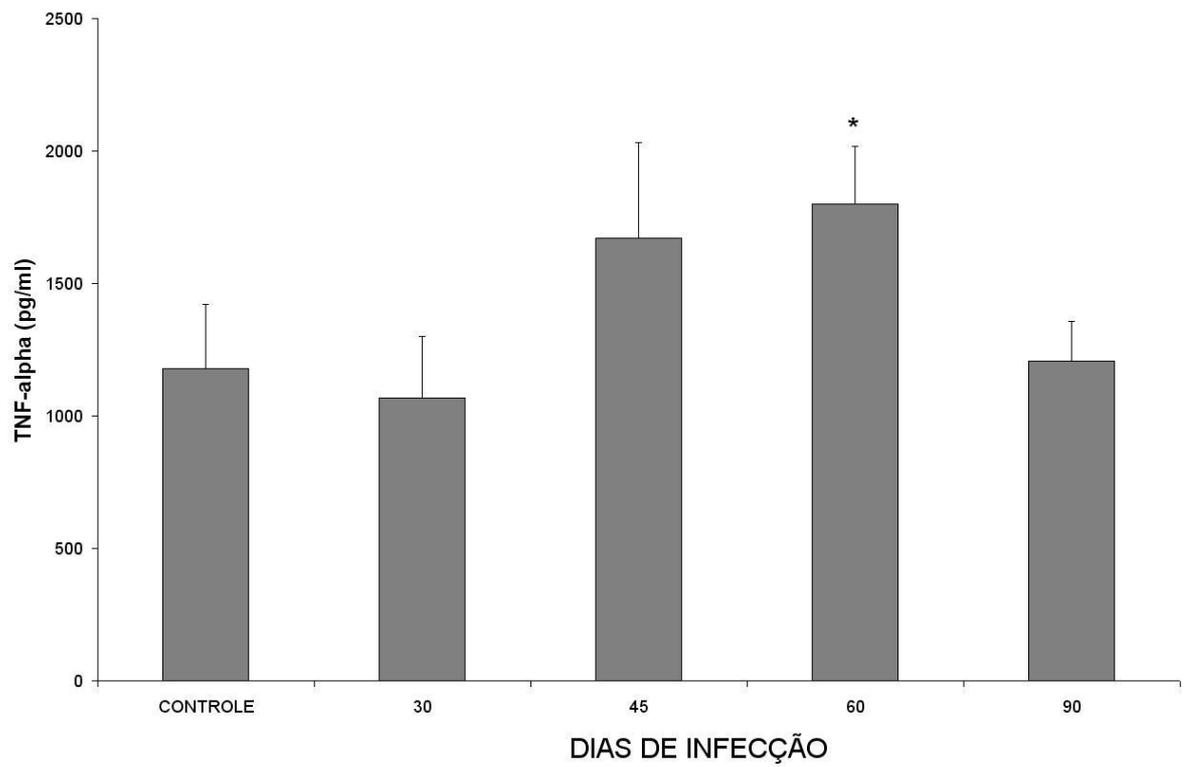
**Figura 12:** Produção de TNF- $\alpha$  por células do lavado intratorácico, após estímulo ou não com antígeno de *P. brasiliensis*, nos dias 2, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 após infecção com *P. brasiliensis*. \*  $p < 0,05$  quando comparados ao início da infecção (2, 7 e 15 Dias Pós Infecção).



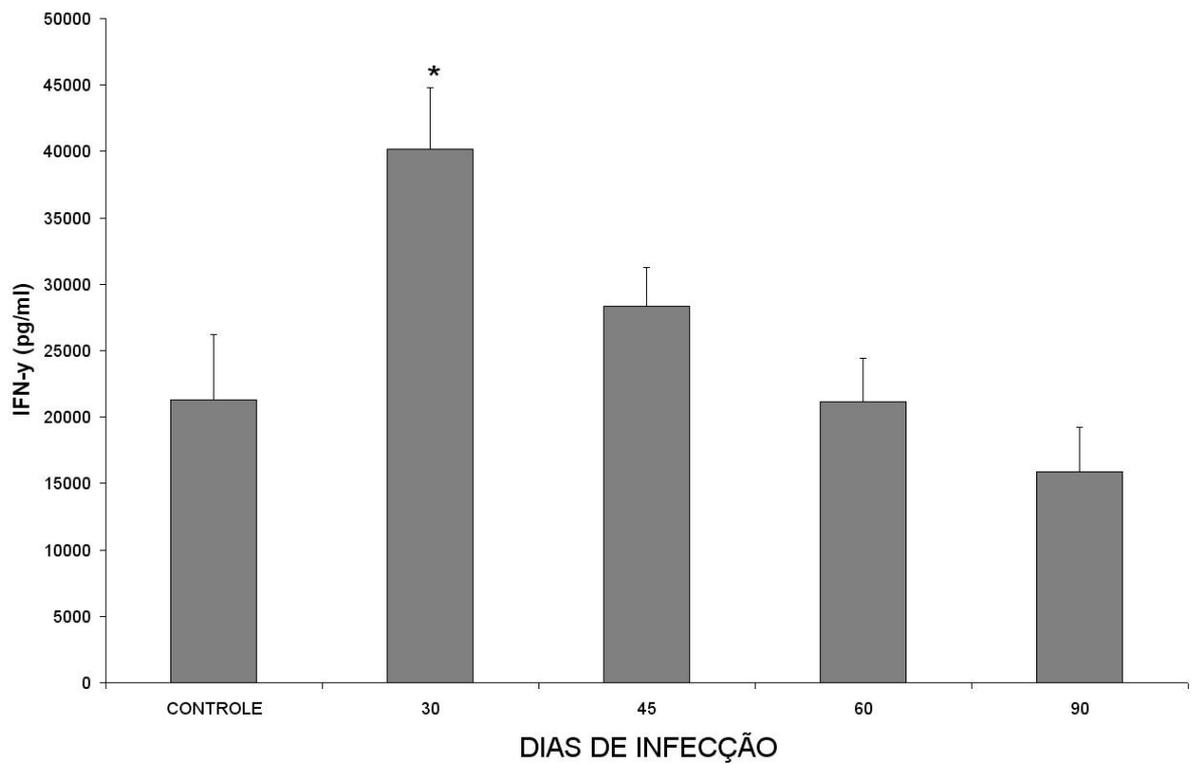
**Figura 13:** Detecção de IFN- $\gamma$  no sobrenadante do macerado de pulmão dos camundongos BALB/c nos dias 30, 45, 60 e 90 após infecção com *P. brasiliensis*. \*  $p < 0,05$  versus o controle (camundongo não infectado).



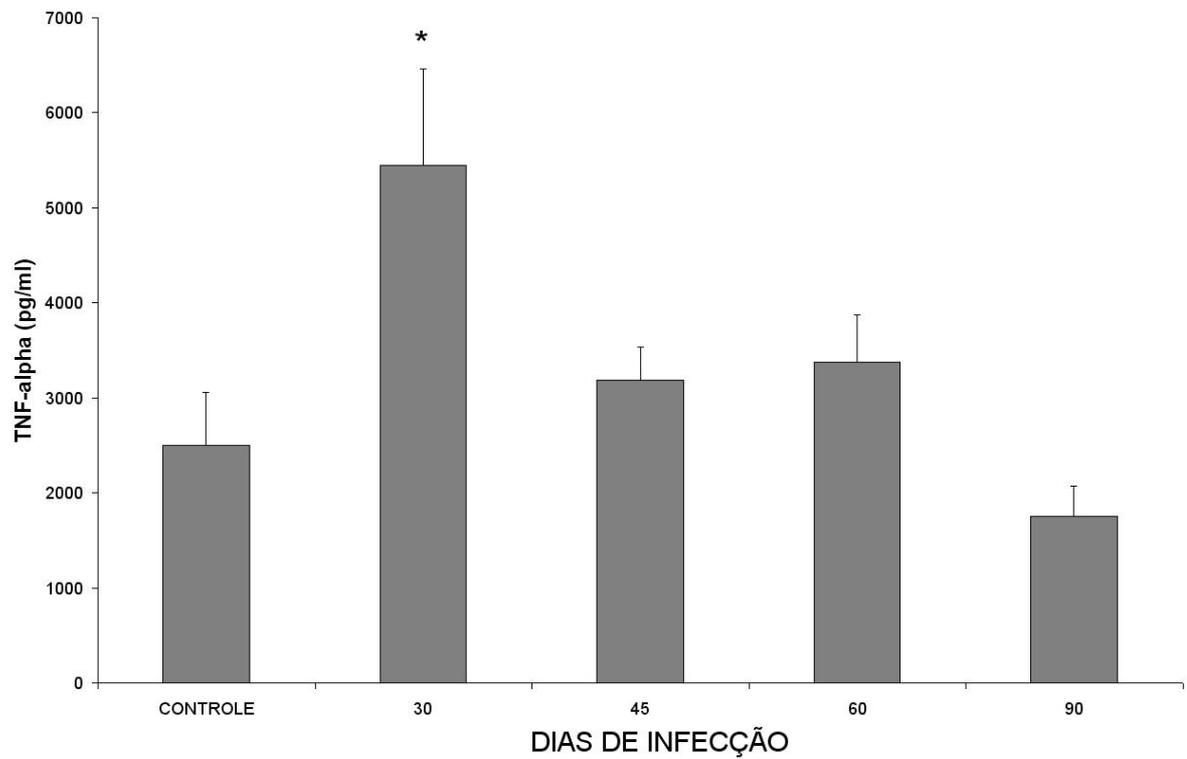
**Figura 14:** Detecção de IL-10 no sobrenadante do macerado de pulmão dos camundongos BALB/c nos dias 30, 45, 60 e 90 após infecção com *P. brasiliensis*. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos dias 30, 45 e 60 após infecção e ao controle (camundongo não infectado).



**Figura 15:** Detecção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante do macerado de pulmão dos camundongos BALB/c nos dias 30, 45, 60 e 90 após infecção com *P. brasiliensis*. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos 30 dias após a infecção.



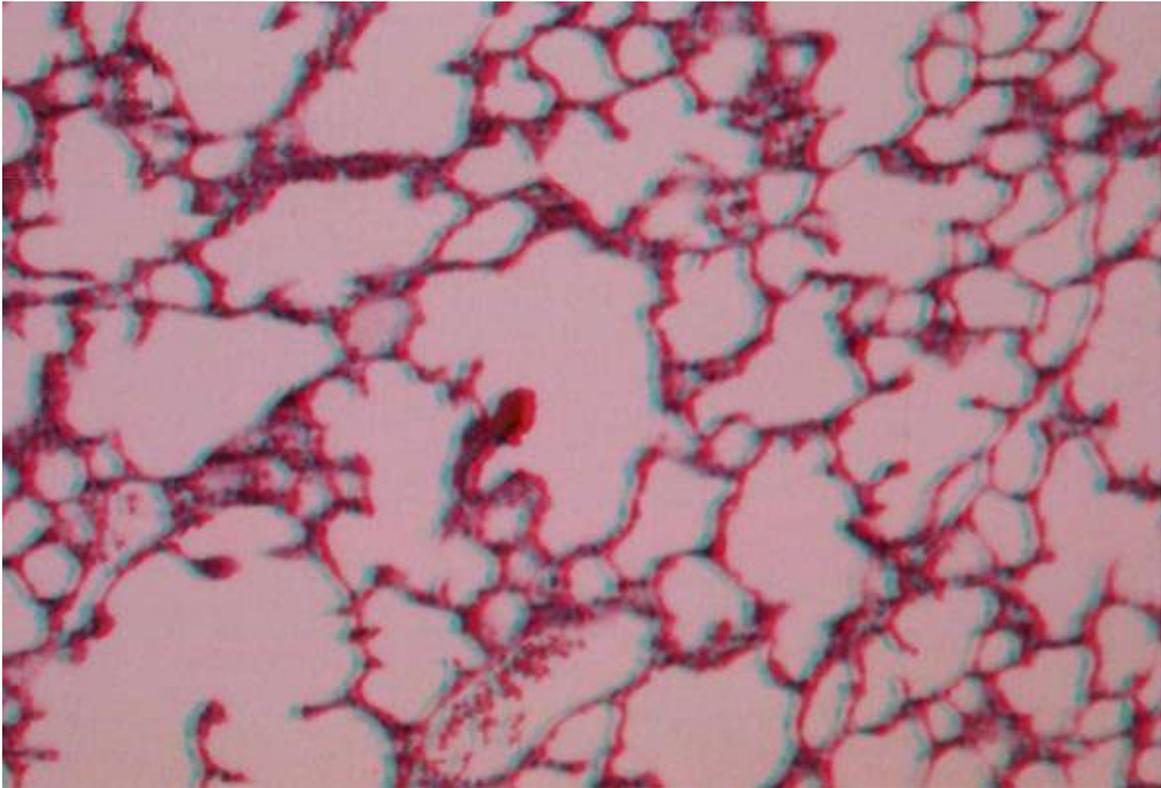
**Figura 16:** Detecção de IFN- $\gamma$  no soro dos camundongos BALB/c nos dias 30, 45, 60 e 90 após infecção com *P. brasiliensis*. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos outros pontos do estudo e ao controle (camundongo não infectado).



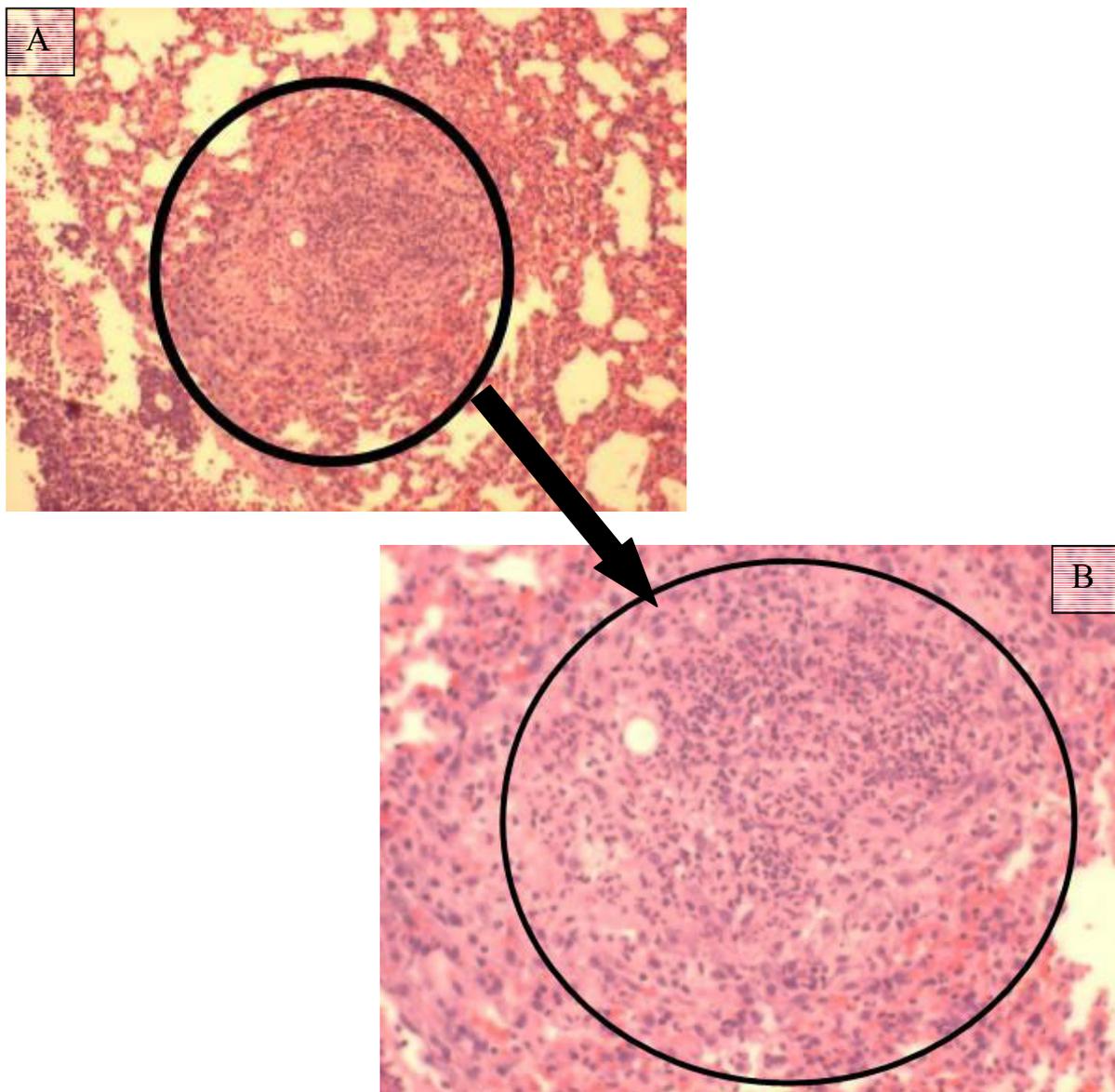
**Figura 17:** Detecção de TNF- $\alpha$  no soro dos camundongos BALB/c nos dias 30, 45, 60 e 90 após infecção com *P. brasiliensis*. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos outros pontos do estudo e ao controle (camundongo não infectado).

#### 4.5 Análise histopatológica

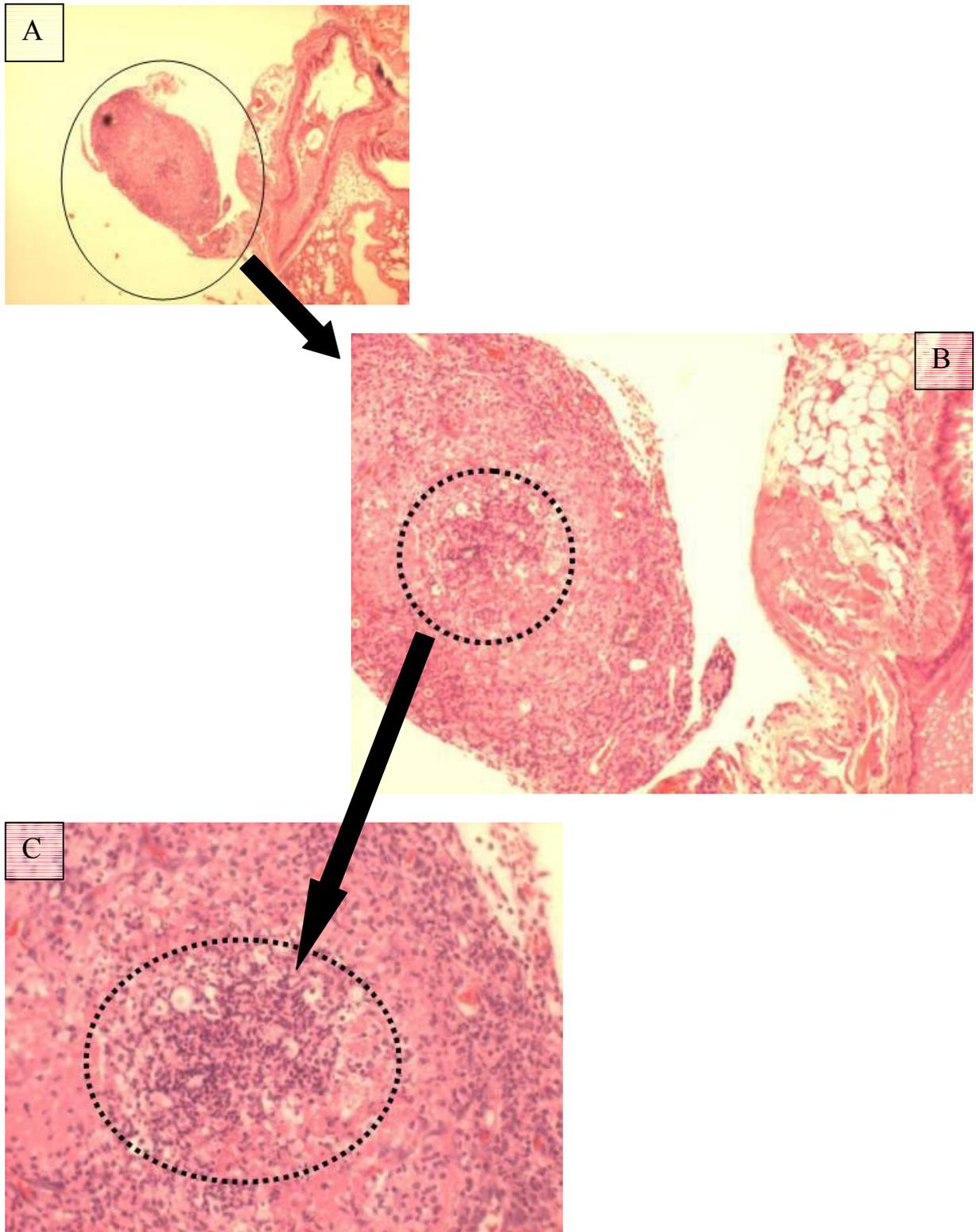
O exame dos cortes histológicos de pulmão corado por HE mostrou um aumento no número, complexidade e tamanho dos granulomas, durante o curso da infecção. A figura 18 mostra a conformação natural do pulmão de camundongos não infectados. O 2º dia após a infecção apresentou um denso infiltrado celular inflamatório, células PMN ao redor dos fungos e um granuloma inicial (Figura 19). O 7º dia após a infecção mostrou granulomas desenvolvidos próximo à cartilagem com predominante infiltrado PMN e presença de fungos (Figura 20). No 15º após a infecção observam-se células gigantes, grande quantidade de fungos e células PMN em grandes granulomas (Figura 21). No 30º dia após a infecção pode ser encontrado granulomas gigantes com coroa bem formada, grande quantidade de fungos dentro do granuloma e células PMN próximos às células leveduriformes (Figura 22). No 45º dia após a infecção encontra-se grande quantidade de fungos rodeados por células PMN (Figura 23). O 60º dia após a infecção apresentou redução da espessura da coroa e muitas células PMN e células gigantes próximas às células leveduriformes (Figura 24). No 90º dia após a infecção notou-se aumento no tamanho dos granulomas com grande quantidade de fungos, células gigantes e poucas ou nenhuma célula PMN (Figura 25). A figura 26 mostra como se encontrava a cavidade torácica de camundongos infectados com *P. brasiliensis*.



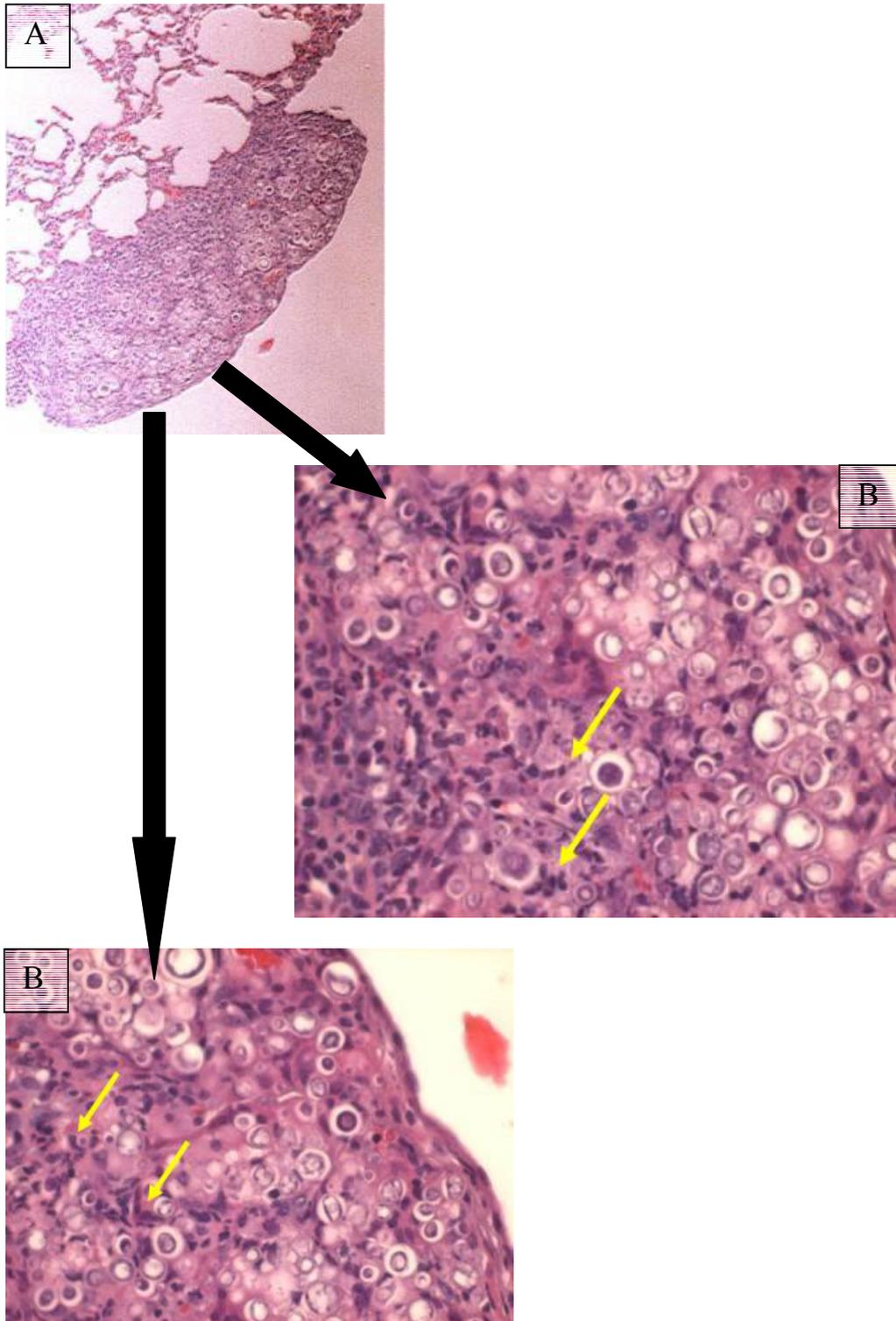
**Figura 18:** Corte histológico de pulmão de camundongo do grupo controle. Coloração pela HE (100x).



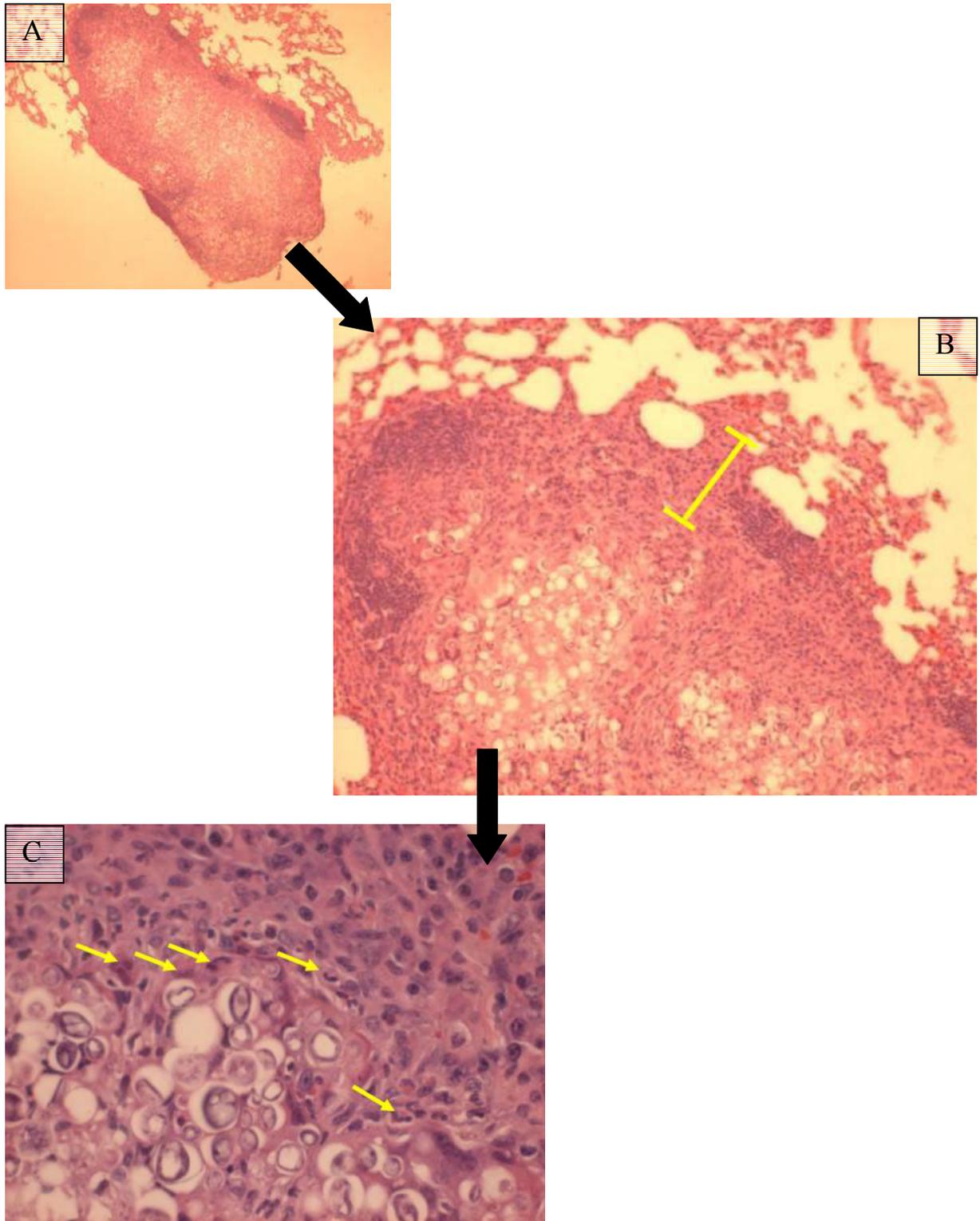
**Figura 19:** Histopatologia de pulmão de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* cepa 69P. 2º dia após a infecção com infiltrado celular denso em PMN (círculos), A) 100X e B) 200X.



**Figura 20:** Histopatologia de pulmão de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* cepa 69P. 7<sup>o</sup> dia após a infecção granuloma desenvolvido (circulo continuo), A) 40X. Notar infiltrado predominante em PMN e fungos dentro do circulo descontinuo B) 100X e C) 200X .



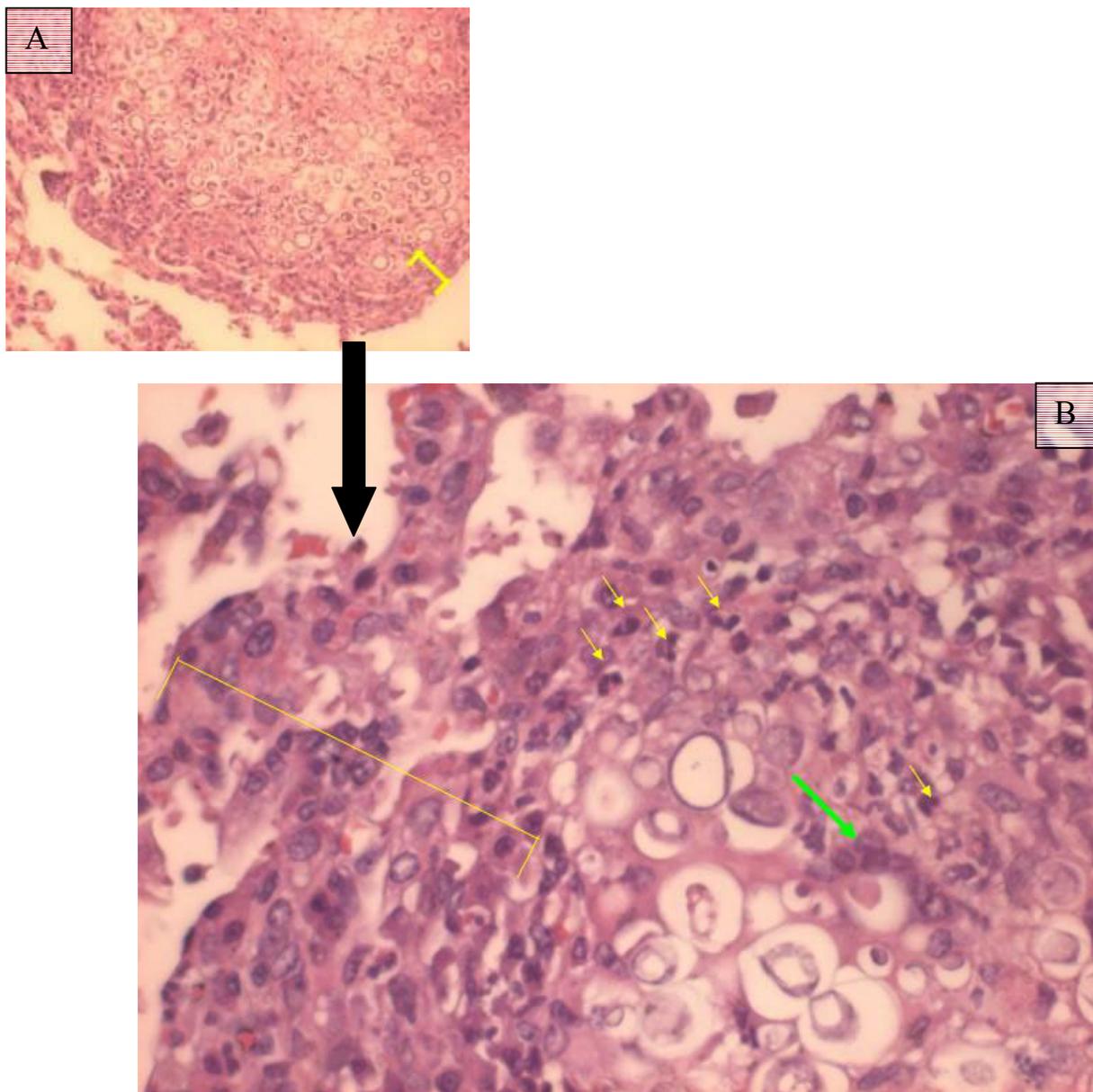
**Figura 21:** Histopatologia de pulmão de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* cepa 69P. 15º dia após a infecção presença de células gigantes (setas amarelas), muitos fungos e células PMN, A) 100x e B) 400X.



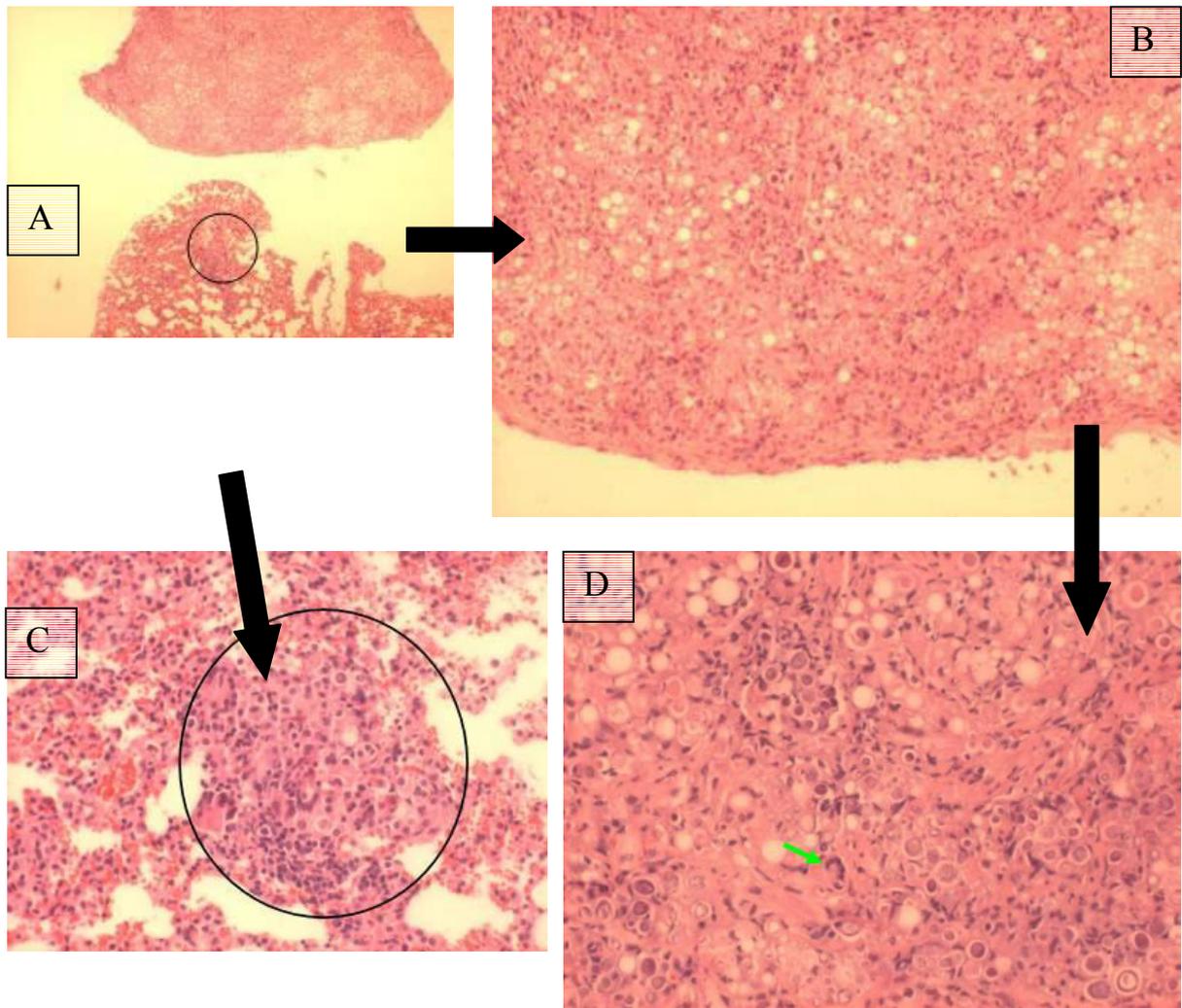
**Figura 22:** Histopatologia de pulmão de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* cepa 69P. 30<sup>o</sup> dia após a infecção notar o tamanho do granuloma e da coroa (linha amarela), muitos fungos rodeados por células PMN dentro do granuloma (setas amarelas), A) 40x, B) 100X e C) 400X.



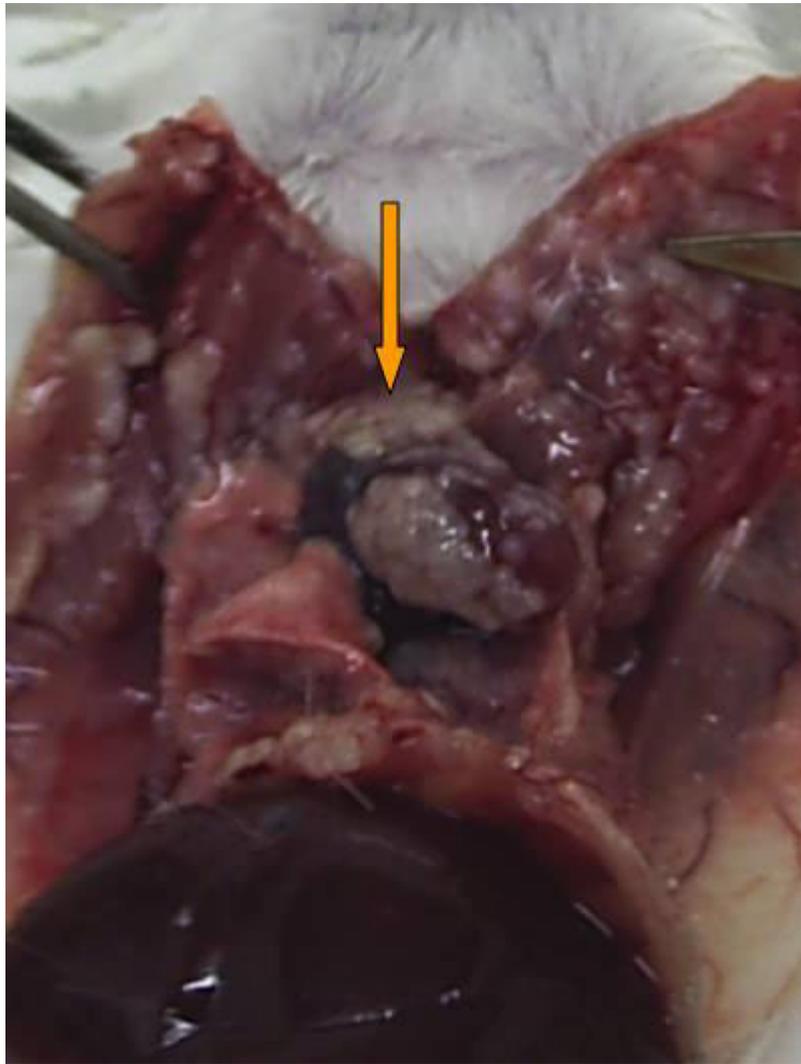
**Figura 23:** Histopatologia de pulmão de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* cepa 69P. 45º dia após a infecção notar granuloma bem formado no parênquima do pulmão (circulo negro) 40X.



**Figura 24:** Histopatologia de pulmão de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* cepa 69P. 60<sup>o</sup> dia após a infecção notar a redução no tamanho da coroa (linha amarela), presença de muitos fungos, células PMN (setas amarelas) e células gigantes (seta verde), A) 100X e B) 400X.



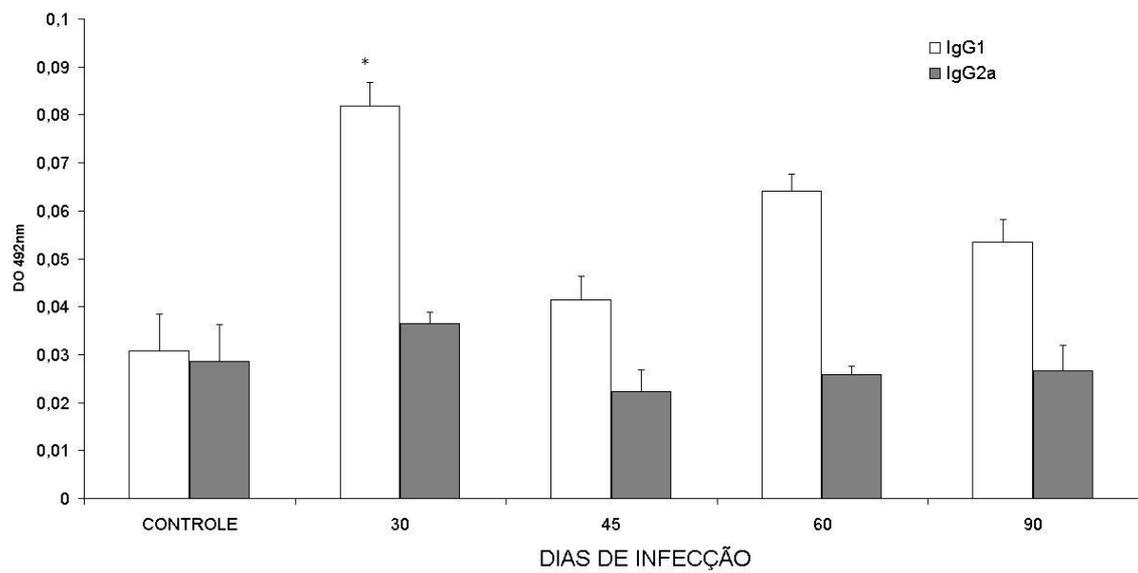
**Figura 25:** Histopatologia de pulmão de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* cepa 69P. 90<sup>o</sup> dia após a infecção notar o tamanho do granuloma, a quantidade de fungos dentro do granuloma, a presença de células gigantes (seta verde) e poucos ou quase nenhum PMN. Presença de granulomas iniciais (circulo negro), A) 40X, B) 100X, C) 200X e D) 400X.



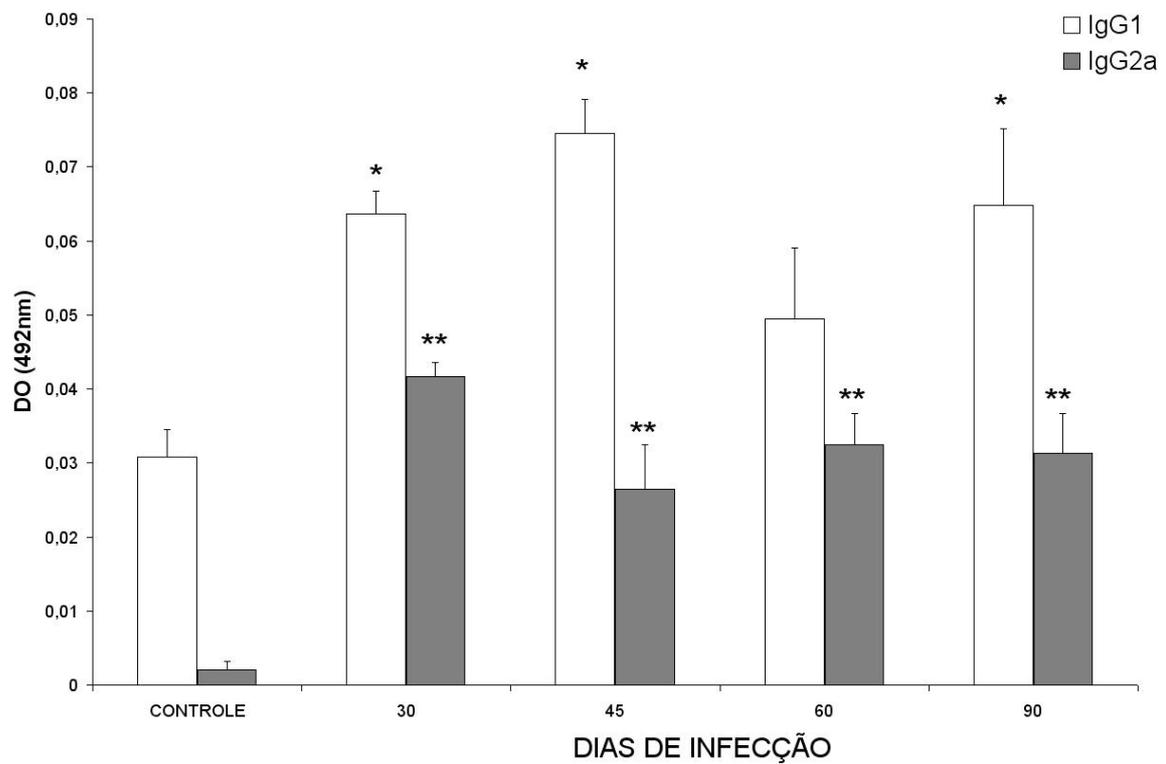
**Figura 26:** Cavidade pleural de camundongo BALB/c infectados com *P. brasiliensis*. Seta laranja mostra granulomas na cavidade.

#### 4.6 Produção de IgG1 e IgG2a específica para o antígeno de *P. brasiliensis*

Anticorpos IgG1 e IgG2a específicos anti-*P. brasiliensis* foram determinados nos sobrenadantes dos macerados de pulmões e no soro de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*. Os resultados dos sobrenadantes dos macerados de pulmão mostraram um significativo aumento ( $p < 0,05$ ) de IgG1 no 30<sup>o</sup> dia após a infecção, quando comparados aos camundongos não infectados, decrescendo á partir daí (Figura 27). Por outro lado, em todos os períodos de tempo analisados o anticorpo IgG2a manteve-se igual ao controle (Figura 27). No soro dos camundongos, a detecção dos anticorpos IgG1 e IgG2a específicos contra *P. brasiliensis* apresentou-se significativamente aumentada ( $p < 0,05$ ) na maioria dos pontos da infecção, quando comparados ao soro dos camundongos controle (Figura 28), sendo que, em todos os pontos da infecção, a detecção de IgG2a mostrava-se em menor quantidade do que IgG1 (Figura 28).



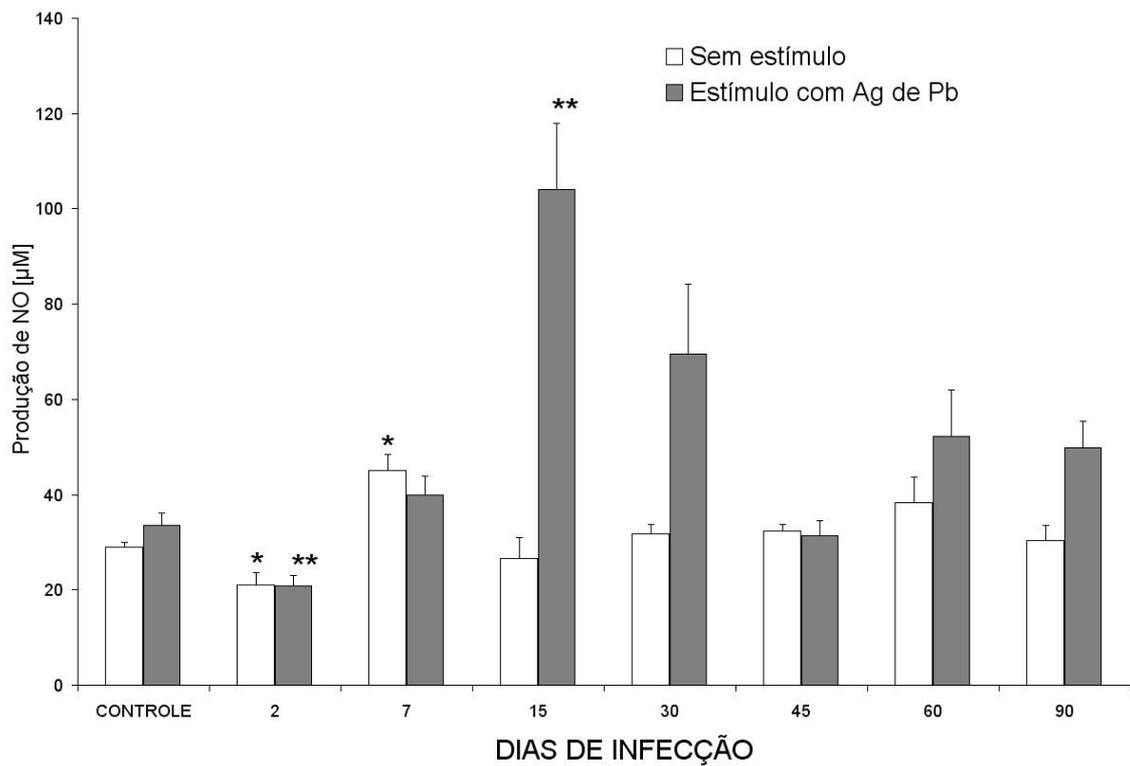
**Figura 27:** Detecção de IgG1 e IgG2a específicos anti-*P. brasiliensis* nos pulmões dos camundongos BALB/c nos dias 30, 45, 60 e 90 após infecção com *P. brasiliensis*. DO: densidade óptica 492nm. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos outros pontos da infecção.



**Figura 28:** Detecção de IgG1 e IgG2a específicos anti-*P. brasiliensis* no soro dos camundongos BALB/c nos dias 30, 45, 60 e 90 após infecção com *P. brasiliensis*. DO: densidade óptica 492nm. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,001$ , quando comparados ao controle.

#### **4.7 Produção de Óxido Nítrico**

As células do lavado intratorácico foram estimuladas ou não com o antígeno de *P. brasiliensis* e após 48 horas de cultura o NO foi quantificado. Houve um pico na produção de NO no 7º dia após a infecção ( $p < 0,05$ ) em sobrenadante das células não estimuladas *in vitro* com o antígeno solúvel de *P. brasiliensis*. Entretanto, quando as células do lavado foram estimuladas *in vitro* com o antígeno solúvel de *P. brasiliensis*, houve um pico de produção de NO no 15º dia após a infecção ( $p < 0,05$ ), decrescendo a partir deste ponto (Figura 29).



**Figura 29:** Produção de Óxido Nítrico (NO) por células do lavado intratorácico, após estímulo ou não com antígeno de *P. brasiliensis*, nos dias 2, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 após infecção com *P. brasiliensis*. \*  $p < 0,05$  quando comparados 2 e 7 dias de infecção e \*\*  $p < 0,05$  quando comparados 2 e 15 dia de infecção.

## **5. Discussão**

O presente trabalho apresentou o perfil da resposta imune frente à infecção intratorácica com *P. brasiliensis* em camundongos BALB/c. A rota estudada propõe mimetizar a via natural da infecção por este tipo de fungo. Os resultados mostraram uma taxa de sobrevivência de 75% no 90º dia após a infecção, quando o estudo foi interrompido devido às condições clínicas e fisiológicas dos camundongos. Este fato pode estar relacionado à alta virulência da cepa 69P utilizada, assim como a via de infecção intratorácica levar o fungo diretamente ao pulmão, que é o sítio de instalação e multiplicação do *P. brasiliensis*. Entretanto, outros trabalhos, utilizando a cepa Pb18 e outras vias de infecção, como a intratraqueal (CANO *et al.*, 1995) ou intraperitoneal (KASHINO *et al.*, 1996), mostraram um tempo de sobrevida, em média, de 200 dias. Porém, quando camundongos BALB/c foram infectados por via intravenosa, com a cepa Pb IOC 3698, os animais apresentaram no 70º dia após a infecção, uma taxa de sobrevida de apenas 30% (BORBA *et al.*, 2005).

A progressão da infecção com *P. brasiliensis* em camundongos BALB/c é monitorada pela presença e quantidade de fungos determinados pelo CFU. No presente trabalho, além do CFU, a presença do fungo foi detectada pela pesquisa de DNA de *P. brasiliensis* por PCR. Neste trabalho demonstrou-se que houve aumento gradativo do número de colônias de *P. brasiliensis* nos pulmões dos camundongos infectados, o qual pôde ser correlacionado com a detecção de DNA do fungo nos produtos da PCR dos pulmões, confirmando que esse método é eficiente para avaliar a presença de *P. brasiliensis* em tecidos de indivíduos infectados. Correlação semelhante, associada ao aumento de CFU e aumento de detecção de DNA por PCR, foi demonstrada em camundongos BALB/c infectados com *Rhizopus oryzae* (IBRAHIM *et al.*, 2005) e em camundongos CD-1 infectados com *Aspergillus fumigatus* (SINGH *et al.*, 2005).

O padrão de distribuição do número de células encontrado em cavidades peritoneal, torácica e craniana de camundongos demonstra o quão efetiva pode ser a resposta do

hospedeiro frente aos diferentes patógenos. Os dados do presente trabalho demonstraram aumento inicial de células no lavado da cavidade torácica já a partir do 2º dia após a infecção. No 15º dia após a infecção pôde ser observado um aumento de células mononucleares e diminuição de células polimorfonucleares. Por outro lado, no 90º dia após a infecção houve uma tendência de inversão destes resultados, observado por uma diminuição sutil de células mononucleares e o aumento das células polimorfonucleares. No entanto, ratos inoculados intraperitonealmente com fragmentos da parede celular do fungo apresentaram um aumento intenso de leucócitos PMN até 24 horas após a injeção, seguidos por uma migração de células mononucleares a partir de 48 horas após a injeção (ALVES *et al.*, 1987). Desse modo, os dados observados no presente trabalho sugerem que a presença de polimorfonucleares nos momentos iniciais da infecção estejam relacionados à resposta imune inespecífica que em seguida, tende a desenvolver uma resposta imune específica contra o fungo. Esse mesmo padrão de migração celular foi observado em hamsters que tiveram *P. brasiliensis* inoculados em seus testículos (COELHO *et al.*, 1994).

Adicionalmente, a análise histopatológica de pulmões dos animais infectados mostrou um aumento de PMN e formação de granulomas, já a partir do 2º dia de infecção. Durante o curso da infecção, houve evidências do crescente aumento do fungo, PMN, número e tamanho dos granulomas até o 60º dia após a infecção. No entanto, quando a infecção estava no 90º dia verificou-se que as células PMN estavam ausentes ou em pequenas quantidades. Reforçando a idéia de que essas células têm um papel central no início da infecção, com o propósito de conter a disseminação do fungo. Seiler e colaboradores (2003) demonstraram que, em camundongos C57Bl/6 infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, no início da infecção, houve uma constituição que propicia a contenção da bactéria, com as células PMN tendo um papel central na regulação do foco granulomatoso no pulmão para que este granuloma formado possa ter uma função de proteção ao longo do tempo. No entanto, as variações dos

perfis celulares do lavado intratorácico observado no presente estudo, podem estar inversamente relacionadas com a formação do granuloma. Assim, sugerindo que a evolução do granuloma em resposta à infecção por *P. brasiliensis* depende principalmente de células presentes na cavidade torácica, as quais foram inicialmente recrutadas para esse local e que posteriormente migram para o pulmão.

A presença de quimiocinas e receptores de quimiocinas têm um papel fundamental no recrutamento de células durante as reações inflamatórias granulomatosas. Estudos prévios demonstraram que a alteração dos padrões de quimiocinas e citocinas influencia a evolução da infecção com *P. brasiliensis* (MAMONI e BLOTTA, 2005) e que a presença de quimiocinas como RANTES e IP-10 estão relacionadas com a infiltração de células mononucleares, enquanto a presença de MIP-1alpha, principalmente quando aumentada pela ausência de IFN- $\gamma$ , está relacionada com uma crônica neutrofilia (SOUTO *et al.*, 2003). Além disso, a ausência, no foco da infecção, de moléculas de adesão intercelulares (ICAM-1) efetivamente envolvidas na migração celular e na organização dos granulomas, aumenta a susceptibilidade dos camundongos, atrasando a formação dos granulomas, e favorece o crescimento e disseminação dos fungos (MOREIRA *et al.*, 2006).

No presente estudo, no 90<sup>o</sup> dia após a infecção, observou-se que o granuloma não conseguiu conter a dispersão do fungo, fato que provavelmente esteja associado à diminuição ou ausência de células PMN no granuloma, como também, pela alta produção de IL-10 nesse ponto da infecção. Já que essa citocina pode afetar significativamente a ativação de células PMN, inibindo sua habilidade em matar o *P. brasiliensis* (COSTA *et al.*, 2007).

As células do lavado intratorácico mostraram-se respondedoras frente ao estímulo *in vitro* pelo antígeno solúvel de *P. brasiliensis* observado pela detecção de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10. O aumento inicial na produção de IFN- $\gamma$  pode estar correlacionado com a ativação das células da região torácica, evidenciado pelo aumento da produção de NO,

sugerindo que houve uma tentativa de controlar a infecção. O IFN- $\gamma$  tem um papel fundamental na ativação de macrófagos e de células PMN do lavado bronquioalveolar de camundongos CD-1 infectados com *Blastomyces dermatitidis* (KETHINENI *et al.*, 2006). No entanto, no presente trabalho observou-se que houve redução na produção de IFN- $\gamma$  após o 15º dia pós-infecção com *P. brasiliensis* em camundongos BALB/c, sugerindo que os baixos níveis dessa citocina estejam relacionados ao agravamento da doença nesses animais através de uma modulação negativa da produção de IFN- $\gamma$ . Em camundongos nocauteados para a produção de IFN- $\gamma$  houve 100% de mortalidade 16 dias após infecção pela via endovenosa por *P. brasiliensis*, com disseminação para pulmão, baço e fígado, mostrando que a falta dessa citocina leva ao agravamento da doença (SOUTO *et al.*, 2000). Além disso, em pacientes com as formas mais severas da paracoccidiodomicose aguda ou crônica, onde há comprometimento do hospedeiro, são detectados baixos níveis de IFN- $\gamma$ , com conseqüente redução da atividade microbicida das células e formação de granuloma (BENARD *et al.*, 2001).

Ainda no lavado intratorácico, a produção de IL-10 foi detectada com aumento gradativo a partir do 45º dia após a infecção com *P. brasiliensis* com pico mais elevado no 90º dia após a infecção. Contudo, a produção de TNF- $\alpha$  já estava aumentada a partir do 30º dia após a infecção e mantendo níveis similares até o 90º dia após a infecção. Apesar da produção aumentada de TNF- $\alpha$  no lavado intratorácico, os animais apresentavam péssima condição fisiológica, sugerindo que houve modulação negativa pelo aumento na produção de IL-10 pelas células do lavado intratorácico. Além disso, uma possível causa da não atividade do TNF- $\alpha$  pode estar relacionado a ausência ou baixa expressão do receptor de TNF-  $\alpha$  p55 (SOUTO *et al.*, 2000)

Além do lavado intratorácico, a produção de citocinas foi determinada, a partir do 30º dia após a infecção, no macerado de pulmão e no soro de camundongos BALB/c infectados com

*P. brasiliensis*. A detecção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no macerado de pulmão mostraram estar aumentadas no 60<sup>o</sup> dia após a infecção e houve uma subsequente queda no 90<sup>o</sup> dia após a infecção. Já a detecção de IL-10 mostrava-se aumentada a partir do 30<sup>o</sup> dia após a infecção, e também com forte queda no 90<sup>o</sup> dia após a infecção. Em adição a esta queda na detecção das citocinas no macerado de pulmão no 90<sup>o</sup> dia após a infecção observou-se também a presença de granulomas fibrosados, disseminação generalizada do fungo, além de granulomas iniciais, sugerindo que as alterações dessas citocinas analisadas contribuíram para o descontrole da infecção no pulmão. Segundo Wagner e colaboradores (1994) a IL-10 endógena pode ter um efeito tanto benéfico quanto deletério na resposta do hospedeiro frente à *Listeria monocytogenes*.

No soro dos camundongos, o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  parecem ser essenciais no controle da infecção com *P. brasiliensis*. No presente estudo, foi detectado aumento da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no 30<sup>o</sup> dia após a infecção com *P. brasiliensis*, e que no entanto diminuiu no 90<sup>o</sup> dia, quando os animais se encontravam muito debilitados. Esses dados reforçam o importante papel dessas citocinas associadas à resistência da doença, já que o TNF- $\alpha$  é requerido em reações inflamatórias granulomatosas, tanto para o recrutamento como na ativação de células efetoras, principalmente macrófagos (ADAMS, 1976; TRACEY e CERAMI, 1993). Macrófagos obtidos de camundongos resistentes liberaram níveis mais altos de TNF- $\alpha$  que aqueles obtidos de animais susceptíveis quando co-cultivados na presença de leveduras (CALICH e KASHINO, 1998), sendo que IFN- $\gamma$  desempenha um papel fundamental na ativação de macrófagos em infecções sistêmicas com *P. brasiliensis* pela eliminação das leveduras (TABORDA *et al.*, 1998).

Desse modo, a modulação no perfil de citocinas identificadas no presente trabalho pode estar regulando o recrutamento de células para a cavidade pleural. Como já descrito, a administração de IL-4 ou IL-10 recombinante em camundongos bloqueia o fluxo de células

para a cavidade pleural, assim como o aumento de IFN- $\gamma$  no exsudato, mostrando a importância do balanço dessas citocinas na influência da ativação de células na cavidade pleural (FINE *et al.*, 2003).

A resposta imune humoral, apesar de não desempenhar papel principal na defesa do hospedeiro frente ao *P. brasiliensis* exerce função auxiliar na ativação do sistema imune. Os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos contra *P. brasiliensis*, mostraram que tanto no macerado de pulmão, quanto no soro dos camundongos infectados, houve predomínio de anticorpos de perfil Th2, devido os altos níveis de IgG1 e baixos níveis de IgG2a. Esses dados corroboram com o agravamento da infecção, já que o controle da doença está diretamente relacionado com a resposta Th1, independente das vias de infecção (CANO *et al.*, 1995; KASHINO *et al.*, 2000). Estudos demonstraram que a depleção de neutrófilos (PINA *et al.*, 2006) e IL-4 (ARRUDA *et al.*, 2004), induz o aumento da resposta imune protetora, associada ao perfil de resposta Th1, com produção aumentada de anticorpos específicos contra *P. brasiliensis* do isotipo IgG2a.

Assim, a associação dos tipos celulares, perfil de citocinas e imunoglobulinas detectadas na cavidade pleural podem levar a alterações na formação e atividade do granuloma com conseqüente agravamento da infecção com *P. brasiliensis*. Dentre os vários tipos celulares, as células B1 são o subtipo dominante de linfócitos B na cavidade pleural, por conseguinte, influenciam na cinética de produção de anticorpos protetores e contribuem para o desenvolvimento de uma resposta Th2 e a susceptibilidade do camundongo na infecção com *P. brasiliensis* (MARCELINO-FRANÇA *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que a interação de células B1 com macrófagos desempenham papel importante na formação de granuloma na presença de antígeno de *P. brasiliensis* (VIGNA *et al.*, 2006), assim como o balanço de IL-10 e TNF-  $\alpha$  (ZOUAIN *et al.*, 2002). Camundongos imunizados com fração antigênica de *P. brasiliensis* e posteriormente infectados com cepa Pb18, desenvolveram

disseminação progressiva da doença para fígado e baço com aumento da produção de citocinas associadas a alta produção de IgG1 e IgG2a e baixa produção de IgG2b e IgG3 (DINIZ *et al.*, 2004).

Estudos mostraram que as células Ly-1 B (B1) diferentemente das células B convencionais são produtoras de IL-10 (O’GARRA e HOWARD, 1992) e que a presença de componentes da matriz extracelular, como laminina, fibronectina e colágeno, estimulam as células B1 a produzirem altas taxas de IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (FERREIRA *et al.*, 2003). Além disso, outros estudos demonstraram que os componentes da matriz extracelular estão diretamente envolvidos na formação de granulomas contra diferentes patógenos (ZHU e BOROS, 1996; NISHIKAKU e BURGER, 2003; SATO *et al.*, 2003).

Tomados juntos os dados do presente trabalho indicam que a evolução da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* está associada com a falta de ativação eficiente das células presentes no pulmão, que podem estar relacionados com a modulação negativa da resposta imune.

## **6. Conclusões**

1. A evolução da infecção mostra que a rota de infecção intratorácica foi eficaz para o estudo da paracoccidioomicose em modelo experimental murino.

2. A contagem de unidades formadoras de colônia de *P. brasiliensis* está diretamente relacionada com a detecção de DNA do *P. brasiliensis* por PCR nos pulmões dos animais infectados durante o curso da infecção.

3. O desbalanço de citocinas e imunoglobulinas durante o curso da infecção pode estar relacionado a perda de função do granuloma presente no pulmão e conseqüente agravamento da doença nos camundongos BALB/c.

## **7. Referências Bibliográficas**

- ADAMS, D.O. The granulomatous inflammatory response. **Am J Pathol**, v. 84, p. 164-191, 1976.
- AJELLO, L. e POLONELLI, L. Imported paracoccidioidomycosis: a publica helth problem in non-endemic areas. **Eur J Epidemiol**, v. 1, p. 160-165, 1977.
- ALMEIDA, F.P. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **An Fac Med São Paulo**, v. 5, p. 125-141, 1930.
- ALVES, L.M.; FIGUEIREDO, F.; BRANDÃO FILHO, S.L.; TINCANI, I.; SILVA, C.L. The role of fractions from *Paracoccidioides brasiliensis* in the genesis of inflammatory response. **Mycopathol**, v. 97, p. 3-7, 1987.
- AMARAL, C.C.; GARCIA, I.P.; FERNANDES, G.F.; ALMEIDA, S.R.; CAMARGO, Z.P.; SOUZA, M.C. Adjuvant Effect of Synthetic Oligodeoxyribonucleotides (CpG-ODN) from the *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 gene on the Th2–Th1 Immunomodulation of Experimental Paracoccidioidomycosis. **Scand J Immun**, v. 62, p. 325–333, 2005.
- ÂNGULO ORTEGA, A. Calcifications in paracoccidioidomycosis: are they morphological manifestation of subclinical infections? **PAHO Scient Publ**, v. 254, p. 129-133, 1972.
- ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; COCK, A.M.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Experimental paracoccidioides brasiliensis infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. **Med Mycol**, v. 40, n. 2, p. 169-78, 2002.
- ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; PINA, A.; KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; VAZ, C.A.C.; FRANCO, M.F.; KELLER, A.C.; CALICH, V.L.G. Dual role of Interleukin-4 (IL-4) in Pulmonary Paracoccidioidomycosis: Endogenous IL-4 can induce Protection or Exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infect Immun**, v. 72, p. 3932-3940, 2004.
- BELONE, A.F.F.; MADEIRA, S.; ROSA, P.S.; OPROMOLLA, D.V.A. Experimental reproduction of the Jorge Lobo's disease in BALB/c mice inoculated with *Lacazia loboi* obtained from a previously infected mouse. **Mycopathol**, v. 155, p. 191–194, 2001.
- BENARD, G.; ROMANO, C.C.; CACERE, C.R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.; DUARTE, A.J. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, p. 248-252, 2001.
- BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; AEPINUS, C.; NAJVAR, L.K.; FOTHERGILL, A.W.; KNOBLOCH, J.; GRAYBILL, J.R. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 8, p. 2940-2, 2000.
- BLOTTA, M.H.S.L.; MAMONI, R.L. OLIVEIRA, S.J., PAPAORDANOU P.M.; GOVEIA, A.; CAMARGO, Z.P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in southeast region. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, p. 390-394, 1999.

BORBA, C.M.; VINHAS, E.A.; LOPES-BEZERRA, L.M.; LUCENA-SILVA, N. Morphological, biochemical and molecular approaches for comparing typical and atypical *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 88, n. 3-4, p. 257-66, 2005.

BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol**, v. 10, p. 80-87, 2002.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomicose: uma revisão, **Rev Clin Microbiol**, v. 6, p. 89-117, 1993.

BURGOS, L.C.; CANO, L.E.; RESTREPO, A. Purification de antígenos somáticos del *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudio Preliminar. **Rev Inst Med**, São Paulo, v. 27, p. 76-81, 1985.

CAILHIER, J.F.; SAWATZKY, D.A.; KIPARI, T.; HOULBERG, K.; WALBAUM, D.; WATSON, S.; LANG, R.A.; CLAY, S.; KLUTH, D.; SAVILL, J.; HUGHES, J. Resident Pleural Macrophages are Key Orchestrators of Neutrophil Recruitment in Pleural Inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 15, 2005.

CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.; SIQUEIRA, A.M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J Exp Pathol**, v. 66, n. 5, p. 585-594, 1985.

CALICH, V.L.G. e KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Br J Med Biol Res**, v. 31, p. 615-623, 1998.

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

CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L.M.; VAZ, C.A.C.; RUSSO, M.; CALICH, V.L.G. Pulmonary Paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: Relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. **Infect Immun**, v. 63, p. 1777-1783, 1995.

CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L.M.; COSTA, T.A.; MENGEL, J.O.; XIDIEH, C.F.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.C.; VAZ, C.A.C.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G. Depletion of CD8<sup>+</sup> T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 68, n. 1, p. 352-359, 2000.

CASTAÑEDA, E.; BRUMMER, E.; PAPPAGIANIS, D.; STEVENS, D.A. Regulation of immune responses by T suppressor cells and by serum in chronic paracoccidioidomycosis. **Cell Immunol**, v. 117, p. 1-11, 1988(a).

CASTAÑEDA, E.; BRUMMER, E.; PAPPAGIANIS, D.; STEVENS, D.A. Impairment of cellular but not humoral immune response in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. **Infect Immun**, v. 56, p. 1771-1777, 1988(b).

CIFERRI, R. e REDAELLI, P. *Paracoccidioidaceae*, N. Fam. istituta per l'agente del Granuloma Paracoccidioide (*Paracoccidioides brasiliensis*). **Boll dell'Ist Sierot Milanese.**, v. XV, n. II, p. 97-102, 1936.

CLEMONS, K.V. e STEVENS, D.A. Interactions of mammalian steroid hormones with *Paracoccidioides brasiliensis*: estradiol receptor binding and mediation of cellular functions. **Interciência**, v.15, p. 206-8, 1990.

COELHO, K.I.; TAKEO, K.; YAMAGUCHI, M.; SANO, A.; KURITA, N.; YOSHIDA, S.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Experimental paracoccidioidomycosis in hamster: transmission electron microscopy of inoculation site lesion. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 36, p. 217-223, 1994.

COSTA, D.L.; DIAS-MELICIO, L.A.; ACORCI, M.J.; BORDON, A.P.; TAVIAN, E.G.; PERACOLI, M.T.; SOARES, A.M. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. **Microbiol Immunol**, v. 51, p. 73-80, 2007.

CUZZOCREA, S.; PISANO, B.; DUGO, L.; IANARO, A.; NDENGELE, M.; SALVEMINI, D. Superoxide-related signaling cascade mediates nuclear factor-kappaB activation in acute inflammation. **Antioxid Redox Signal**, v. 6, n. 4, p. 699-704, 2004.

DIEZ, S.; GARCIA, E.A.; PINO, P.A.; BOTERO, S.; CORREDOR, G.G.; PERALTA, L.A.; CASTANO, J.H.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 41, n. 6, p. 351-8, 1999.

DINIZ, S.N.; REIS, B.S.; GOES, T.S.; ZOUAIN, C.S.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v. 22, p. 485-92, 2004.

FAZIOLI, R.A. **Paracoccidioidomicose experimental murina**, estudo da hipersensibilidade do tipo tardio. São Paulo, 143p, 1990. (Dissertação de Mestrado-Instituto Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

FERREIRA, K.S.; ALMEIDA, S.R.; RIBEIRO, C.H.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Modulation of proliferation, differentiation and cytokine secretion of murine B-1b cells by proteins of the extracellular matrix. **Immunol Lett**, v. 86, p. 15-21, 2003.

FIGUEIREDO, J.F.C.; MARTINEZ, R.; SILVA, G.F. Paracoccidioidomicose e AIDS: características gerais dos casos ocorridos em Ribeirão Preto, SP, Brasil, no período de 1987 a 1991. **Ver Arg Micol**, v. 15, p. 63-73, 1992.

FINE, J.S.; ROJAS-TRIANA, A.; JACKSON, J.V.; ENGSTROM, L.W.; DENO, G.S.; LUNDELL, D.J.; BOBER, L.A. Impairment of leukocyte trafficking in a murine pleuritis model by IL-4 and IL-10. **Inflammat**, v. 27, p. 161-174, 2003.

FRANCO, M.; MENDEZ, R.P.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis, a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 20, p. 129-132, 1987.

FRANCO, M. e MONTENEGRO, M.R.G. Relação parasita-hospedeiro na paracoccidioidomycose. **Rev Cienc Biomed**, v. 7/8, p. 47-60, 1987.

GOLDANI, L.Z. e SUGAR, A.M. Short report: use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 2, p. 152-3, 1998.

GONZALEZ, A.; SAHAZA, J.H.; ORTIZ, B.L.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Med Mycol**, v. 41, n. 5, p. 391-399, 2003.

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal biochem**, v. 126, p. 131-138, 1982.

HENRIQUES M G, WEG V B, SILVA P M, FERNANDES P D, CORDEIRO R S, VARGAFTING B B. Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **Br J Pharmacol**, v. 99, n. 1, p. 164-168, 1990.

IBRAHIM, A.S.; BOWMAN, J.C.; AVANESSIAN, V.; BROWN, K.; SPELLBERG, B.; EDWARDS, J.E.; DOUGLAS, C.M. Caspofungin Inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3- $\beta$ -D-Glucan Synthase, Lowers Burden in Brain Measured by Quantitative PCR, and Improves Survival at a Low but Not a High Dose during Murine Disseminated Zygomycosis. **Antimicrob Agent Chemot**, v. 49, p. 721-727, 2005.

KASHINO, S.S. **Efeito do bloqueio do sistema mononuclear fagocítico na paracoccidioidomycose experimental em camundongos resistentes e susceptíveis ao fungo**. São Paulo, 111 p., 1990. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; CALICH, V.L.G. Cytokine production (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10) in the protection and exacerbation models of murine experimental paracoccidioidomycosis. **Int Meet Cytokin**. Angra dos Reis, RJ, Brasil, Abstract 01.55, 1996.

KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L.H.; VAZ, C.A.; BURGER, E.; SINGER, L.M.; CALICH, V.L. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **J Interferon Cytokine Res**, v. 20, p. 89-97, 2000.

KETHINENI, N.; BRUMMER, E.; STEVENS, D.A. Susceptibility to pulmonary blastomycosis in young compared to adult mice: immune deficiencies in young mice. **Med Mycol**, v. 44, p. 51-60, 2006.

KURITA, N.; BISWAS, S.K.; OARADA, M.; SANO, A.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 37, p. 19-24, 1999.

LACAZ, C.S.; VIDAL, M.S.; PEREIRA, C.N.; HEINS-VACCARI, E.M.; DE MELO, N.T.; SAKAI-VALENTE, N.; ARRIAGADA, G.L. *Paracoccidioides cerebriformis* Moore, 1935. Mycologic and immunochemical study. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 39, p. 141-144, 1997.

LEÃO, R.C. e MENDES, E. Paracoccidioidomycosis: neoplasias and associated infections. **Allegol Immunopathol**, v. 8, p. 185-188, 1980.

LONDERO, A.T. Paracoccidioidomicose: formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. **J Pneumol**, v. 12, p. 41-60, 1986.

LOPEZ, R. e RESTREPO, A. Spontaneous regression of pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mycopathol**, v. 83, p. 187-90, 1983.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUTZ, A. Uma micose pseudococcitica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. **Brasil Med.**, v. 22, p. 121-124; 141-144, 1908.

MAMONI, R.L.R.L.; NOUER, A.S.A.; OLIVEIRA, S.A.; MUSATTI, C.C.; ROSSI, C.L.; CAMARGO, Z.P.; BLOTTA, M.H.S.L. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-B in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 40, p. 1-7, 2002.

MAMONI, R.L. e BLOTTA, M.H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, v. 32, p. 20-29, 2005.

MARCELINO FRANÇA, K.; VERÍCIMO, M.A.; RETAMAL, C.; KIPNIS, T.L.; ARNHOLDT, A.C. B1 cells contribution to susceptibility in experimental paracoccidioidomycosis: immunoglobulin isotypes and repertoire determination. **Med Mycol**, v. 44, p. 755-766, 2006.

MARQUES, C.S.; FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; SILVA, N.C.; OLIVEIRA, C.S.; TAGLARIM, G.V.; & DILLON, N.L. Aspectos epidemiológicos da Paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). **Rev Inst Med Trop de São Paulo**, v. 25, p. 87-92, 1983.

MARTINEZ, R. e MOYA, M.J. Associação entre paracoccidioidomicose e alcoolismo. **Ver Saud Pub**, São Paulo, v. 26, p. 12-16, 1992.

McEWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PATIÑO, M.M.; SALAZAR, M.E.; & RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol**, v. 25, p. 165-175, 1987.

MENEZES-DE-LIMA-JUNIOR, O. e HENRIQUES, M. DAS G. Mechanisms of cell accumulation induced by *Mycobacterium bovis* BCG. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 227-32, 1997.

MENEZES DE LIMA JUNIOR, O.; WERNECK BARROSO, E.; CORDEIRO, R.S.B. & HENRIQUES, M.G.M.; Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-gurin in mouse pleurism. **J Leukocyte Biol**, v. 62, p.778-785, 1997.

MOHAMMED, K.A.; NASREEN, N.; WARD, M.J.; ANTONY, V.B. Helper T cell type 1 and 2 cytokines regulate C-C chemokine expression in mouse pleural mesothelial cells. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 159, n. 5, p. 1653-9, 1999.

MONTENEGRO, M.R.G. Carta ao editor: formas clínicas da Paracoccidioidomicose. **Ver Inst Med Trop São Paulo**, v. 28, p. 203-204, 1986.

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*. **Am J Pathol**, v. 169, p. 1270-1281, 2006.

MOTOYAMA A. B., VENACIO E. J., BRANDAO G. O., PETROFEZA-SILVA S., PEREIRA I. S., SOARES C. M., FELIPE M. S. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. **J Clin Microbiol**, v.38, n.8, p.3106-3109, 2000.

MOTTA, T.R.; MOREIRA-FILHO, C.A.; MENDES, R.P.; SOUZA, L.R.; SUGIZAK, M.F.; BAUEB, S.; CALICH, V.L.; VAZ, C.A. Evaluation of DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers (RAPD) as genetically associated elements to differentiate virulent and non-virulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 33, n. 3, p. 151-7, 2002.

MOURA, A.C.; WERNECK-BARROSO, E.; ROSAS, E.C.; HENRIQUES, M.G.; CORDEIRO, R.S. Opposite cellular accumulation and nitric oxide production in vivo after pleural immunization with *M. leprae* or *M. bovis* BCG. **Int J Mol Med**, v. 3, n. 1, p. 69-74, 1999.

MUSATTI, C.C.; REZKALLAH, M.T.; MENDES, E. & MENDES, N.F. In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. **Cell Immunol**, v. 24, p. 365-378, 1976.

NAKAGAWA ITANO, E.; UNO, J.; SANO, A.; YARITA, K.; KAMEI, K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; MIKAMI, Y. Detection of the gp43 gene and (1-3)-beta-D-glucan of *Paracoccidioides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice. **Nip Ishink Gak Zas**, v. 43, n. 1, p. 29-35, 2002.

NINO-VEGA, G.A.; CALCAGNO, A.M.; SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F.; GOODAY, G.W.; GOW, N.A. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 38, n. 6, p. 437-41, 2000.

NISHIKAKU, A.S. e BURGER, E. Immunohistochemical demonstration of TGF-beta and decorin in paracoccidioidal granulomas. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, p. 1073-1078, 2003.

O'GARRA, A. e HOWARD, M. Cytokines and Ly-1 (B1) B cells. **Int Rev Immunol**, v. 8, p. 219-234, 1992.

ORTIZ, B.L.; DIEZ, S.; URAN, M.E.; RIVAS, J.M.; ROMERO, M.; CAICEDO, V.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 5, n. 6, p. 826-30, 1998.

PEAO, M.N.; AGUAS, A.P.; GRANDE, N.R. Cellular kinetics of inflammation in the pleural space of mice in response to the injection of exogenous particles. **Exp Lung Res**, v. 18, n. 6, p. 863-76, 1992.

PERAÇOLLI, M.T.S.; MOTA, N.G.S.; MONTENEGRO, M.R. Experimental paracoccidioidomycosis in the syrian hamster. **Mycopathol**, v. 79, p. 7-17, 1982.

PINA, A.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; MOLINARI-MADLUM, E.E.W.; VAZ, C.A.C.; KELLER, A.C.; CALICH, V.L.G. Absence of Interleukin-4 determines less severe pulmonary Paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infect Immun**, v. 72, p. 2369-2378, 2004.

PINA, A.; SALDIVA, P.H.; RESTREPO, L.E.; CALICH, V.L. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **J Leukoc Biol**, v. 79, p. 1202-1213, 2006.

PINTO, J.G.; MARTINS, L.A.; CAVALHEIRO, J.S.; ACORSI, M.J.; PEDRINI, S.C.; SOARES, A.M.; OLIVEIRA, S.L. Cytokine production in lungs and adrenal glands of high and low antibody producing mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 44, p. 505-514, 2006.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*. **J Med Vet Mycol**, v. 23, p. 323-334, 1985.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol**, v. 39, n. 3, p. 233-41, 2001.

SANO, A.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. The Research Encouragement Award. Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. **Nip Ishin Gak Zas**, v. 40, n. 1, p. 1-8, 1999.

SATO, J.; SCHOREY, J.; PLOPLIS, V.A.; HAALBOOM, E.; KRAHULE, L.; CASTELLINO, F.J. The fibrinolytic system in dissemination and matrix protein deposition during a mycobacterium infection. **Am J Pathol**, v. 163, p. 517-531, 2003.

- SEILER, P.; AICHELE, P.; BANDERMANN, S.; HAUSER, A.E.; LU, B.; GERARD, N.P.; GERARD, C.; EHLERS, S.; MOLLENKOPF, H.J.; KAUFMANN, S.H.E. Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. **Eur J Immunol**, v. 33, p. 2676 – 2686, 2003.
- SILVA, M.R.R.; PAIVA, L.F.; JESUINO, R.S.A. Avaliação do Cetoconazol em camundongos inoculados com *Paracoccidioides brasiliensis* pela histopatologia de fígado e baço e pela intradermorreação de paracoccidioidina. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 27, n. 1, p. 11-14, 1994.
- SINGER-VERMES, L.M.; CALDEIRA, C.B.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clin Exp Immunol**, v. 94, p. 75-79, 1993.
- SINGH, G.; IMAI, J.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Efficacy of Caspofungin against Central Nervous System *Aspergillus fumigatus* Infection in Mice Determined by TaqMan PCR and CFU Methods. **Antimicrob Agents Chemot**, v. 49, p. 1369–1376, 2005.
- SOUTO, J.T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Determine Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Mice. **Am J Pathol**, v. 156, p. 1811-1820, 2000.
- SOUTO, J.T.; ALIBERTI, J.C.; CAMPANELLI, A.P.; LIVONESI, M.C.; MAFFEI, C.M.; FERREIRA, B.R.; TRAVASSOS, L.R.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. **Am J Pathol**, v. 163, p. 583-590, 2003.
- SPECTOR, W.S., ed. **Handbook of toxicology**. Vol. I. Acute toxicities. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, Vol.Iº, p. 346-347, 1956.
- SPLENDORE, A. Um' affezione micotica com localizzazione nella mucosa della bocca, osservata in Brasile, determinata da funghi appartenenti alla tribù degli exoascei (*Zymonema brasiliensis* n. sp.). **In:** Volume in onore del. Prof Angelo Celli nel 25º. anno di insegnamento. Roma, G. Bertero, p. 421-458, 1912.
- TABORDA, C.P.; JULIANO, M.A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L.R. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect Immun**, v. 66, p. 786-793, 1998.
- TEIXEIRA, H.C.; CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.D.; IMPÉRIO-LIMA, M.R. & RUSSO, M. Experimental paracoccidioidomycosis: early immunosuppression occurs in susceptible mice after infection with pathogenic fungi. **Braz J Med Biol Res**, v. 20 p. 587-589, 1987.
- TEIXEIRA, H.C. **Paracoccidioidomicose experimental murina**: respostas imunes e não imunes variam conforme a susceptibilidade dos camundongos e a patogenicidade dos fungos. São Paulo, 87p., 1987. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

TRACEY, K.J. e CERAMI, A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. **Annu Rev Cell Biol**, v. 9, p. 317-343, 1993.

TRAVASSOS, L.R.; PUCCIA, R.; CISALPINO, P.; TABORDA, C.; RODRIGUES, E.G.; RODRIGUES, M.; SILVEIRA, J.F.; ALMEIDA, I.C. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res**, v. 26, n. 3, p. 297-304, 1995.

VIGNA, A.F.; ALMEIDA, S.R.; XANDER, P.; FREYMÜLLER, E.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Granuloma formation in vitro requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen. **Microbes Infect**, v. 8, p. 589-597, 2006.

VILELA, R.; MENDOZA, L.; ROSA, P.S.; BELONE, A.F.; MADEIRA, S.; OPROMOLLA, D.V.; DE RESENDE, M.A. Molecular model for studying the uncultivated fungal pathogen *Lacazia loboi*. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 3657-3661, 2005.

WAGNER, R.D.; STEINBERG, H.; BROWN, J.F.; CZUPRYNSKI, C.J. Recombinant interleukin-12 enhances resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. **Microb Pathog**, v. 17, p. 175-186, 1994.

WANKE, B.; LONDERO, A.T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infections, In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (eds). Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: **CRC Press**, p. 109-120, 1994.

ZHU, Y. e BOROS, D.L. Fibronectin co-stimulates via the alpha 5 beta 1 receptor IL-2, IL-4 production by splenic, granuloma lymphocytes of *Schistosoma mansoni* infected mice. **Scand J Immunol**, v. 43, p. 633-639, 1996.

ZOUAIN, C.S.; GUSTAVSON, S.; SILVA-TEIXEIRA, D.N.; CONTIGLI, C.; RODRIGUES JR., V.; LEITE, M.F.; GÓES, A.M. Human immune response in schistosomiasis: the role of P24 in the modulation of cellular reactivity to *Schistosoma mansoni* antigens. **Hum Immunol**, v. 63, p. 647-656, 2002.

## **8. Artigo**

INTRATHORACIC INFECTION MODEL OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS IN  
BALB/c MICE

CAIO ALVES, ANA AZEVEDO, MARCO MACHADO, HENRIQUE TEIXEIRA, MARIA  
SOUZA, AND ANA FERREIRA

*Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia,  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas  
Gerais, Brasil; Laboratório de Genética Molecular, EMBRAPA, Juiz de Fora, Minas Gerais,  
Brasil*

*Abstract.* The present study proposes a novel model for the study of *P. brasiliensis* infection using the intrathoracic route. BALB/c mice were infected with  $10^6$  yeast forms of *P. brasiliensis* and after 2, 7, 15, 30, 45, 60 and 90 days postinfection *P. brasiliensis* colony forming units were enumerated and the presence of *P. brasiliensis* DNA was determined in lung tissue. The results showed a gradual increase in the number of colony forming units, which was confirmed by the detection of *P. brasiliensis* DNA in lungs of infected mice. These data indicate that *P. brasiliensis* infection by the intrathoracic route has a rapid progression into the lung tissue similar to the acute form of the human disease and that DNA analysis could be useful for improving diagnosis.

Paracoccidioidomycosis or South American blastomycosis, is a chronic granulomatous infection caused by the *Paracoccidioides brasiliensis*.<sup>1</sup> In the majority of cases the *P. brasiliensis* penetrates into the organism by the respiratory route.<sup>2</sup> Infected individuals generally develop asymptomatic or subclinical paracoccidioidomycosis, nodules in the lungs being detectable. The utilization of experimental models through different routes of infection allows a better understanding of host-parasite interactions. The intraperitoneal, intratracheal, and intranasal routes have been widely used for the study of experimental paracoccidioidomycosis.<sup>3, 4</sup> This is the first report on paracoccidioidomycosis induced by the intrathoracic route. It was shown that *P. brasiliensis* DNA obtained by serum correlates with the *P. brasiliensis* colony counts in lung tissue of infected mice.<sup>5</sup> Specific primers OL5 and ITS1 were able to distinguish between DNA obtained from *P. brasiliensis* and other pathogenic fungi.<sup>6</sup> The aim of this study was to evaluate the progression of *P. brasiliensis* infection by the intrathoracic route in BALB/c mice, by counting colony forming units and confirming the presence of the fungus through the detection of *P. brasiliensis* DNA using the PCR method.

For this study BALB/c male mice, 8--10 weeks old were used. Mice were raised at the Biological Reproduction Center of the Federal University of Juiz de Fora. The present study has the approval of the committee of ethics in animal research of the Federal University of Juiz de Fora (number 11/2003-CEA).

The *P. brasiliensis* was isolated from one infected female patient, diagnosed and characterized.<sup>7</sup> After characterization, this strain was identified as 69P and a sample was donated to this study by the University Hospital of UFJF. To maintain the strain in the laboratory, the sample was replicated every 20 days in two assay tubes containing 9 ml of Brain-Heart-Infusion (BHI) agar (Difco-BD, CA, USA) inclined and kept at 36°C.

The infection was induced by intrathoracic inoculation of  $10^6$  *P. brasiliensis* yeast forms in 100  $\mu$ L of PBS. The animals of the control group received an equal volume of PBS. All mice (n = 6/group) were sacrificed by overdose of anesthesia (0.9% NaCl, 2% Xylazine, 5% Ketamine) at 2, 7, 15, 30, 45, 60 or 90 days postinfection. The right lung was used in the procedure of counting colony forming units of *P. brasiliensis* and the left was immediately frozen to be used in the DNA detection by PCR. The right lung was triturated in 1 ml of sterile PBS and 100  $\mu$ l was used for determining CFU counts. *P. brasiliensis* was grown in BHI agar enriched with 5% of horse serum maintained at 36°C for 15 days. At the end of the incubation period numbers of CFU were counted visually.

For the DNA detection, the lung tissues and control cultures of *P. brasiliensis* were transferred to microtubes containing 900  $\mu$ l of the extraction buffer (100 mM tris-HCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% CTAB, 80  $\mu$ g/ml RNase, 1% PVP, 10% dithiothreitol and 20 ng/ml proteinase K) (Invitrogen, CA, USA) and incubated at 50°C overnight. DNA was precipitated with frozen isopropanol (Invitrogen) for 48 hours at -20°C. The samples were then washed with 70% ethanol, and dissolved in 100  $\mu$ l of TE buffer (10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA). The DNA concentration was evaluated at 260/280 nm (GeneQuant pro, Amersham Bioscience, UK). The ribosomal gene ITS were amplified using primers ITS-1 and OL-5 (Table 1).<sup>6</sup> The reaction was made with 30 ng/ml DNA, 1 U Taq polymerase, 0.5  $\mu$ M primers, 0.25 mM dNTPs and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) in a final volume of 25  $\mu$ l. The amplification was made using a touchdown method with 95°C/2 min, 10 cycles of 95°C/1 min, 64°C/1 min and 72°C/1.5 min, 35 cycles of 95°C/1 min, 54°C/1 min and 72°C/1.5 min and 72°C/10 min. The amplification was done in the GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, USA). The products of the amplification were carried in native gel 5% polyacrilamide (400 volts, 1.5 hours). The products were visualized by silver staining and the fragments were identified using a scale of 100-bp.

The Mann-Whitney test was used to determine the significant differences between infected mice and control in different days, with the level of significance being 5%.

The progression of the disease was followed by observing the almost linear increase of the number of *P. brasiliensis* CFU in lung tissues of infected mice, showing a significant increase ( $p < 0.05$ ) at all time points from day 7 postinfection (Fig. 1A), in comparison with day 2. As expected, the PCR products showed an increase in *P. brasiliensis* DNA from the lung fragments as the disease progresses (Fig. 1B), correlating with the CFU increases (Fig. 1).

The strain 69P used in this study has a high virulence profile and the route of infection allows a rapid access to the lung, the pivotal site of multiplication of *P. brasiliensis*. The CFU counts demonstrated a gradual increase in *P. brasiliensis* in the lung; however a dissemination of the *P. brasiliensis* to other organs was not found (data not shown). This fact can be related to a fungus strain characteristic, or to the intermediate resistance pattern of the BALB/c lineage against *P. brasiliensis*.<sup>4, 8</sup> The CFU data are corroborated by the DNA detection of *P. brasiliensis* in lung fragments from infected mice. To our knowledge, this work is the first that shows a correlation between the increase of *P. brasiliensis* CFU and specific DNA detection during the evolution of paracoccidioicomyosis. The intrathoracic infection route can be an interesting model for the study of this pulmonary disease because the rapid progression into the lung tissue is similar to the acute form of the human disease. DNA analysis of tissues from infected individuals may be useful for improving the diagnosis of paracoccidioicomyosis.

Financial support: This study was supported by a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brasil.

Author's addresses: Caio C.S. Alves, Maria A. Souza, Henrique C. Teixeira, Ana P. Ferreira, Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, E-mail: ana.paula@ufjf.edu.br; Ana L. Azevedo, Marco A. Machado, Laboratório de Genética Molecular, EMBRAPA, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, 36036-330, Phone/Fax: 55 32 2102 3214.

## REFERENCES

1. Marques CS, Franco MF, Mendes RP, Silva NC, Oliveira CS, Taglarim GV, Dillon NL, 1983. Aspectos epidemiológicos da Paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 25: 87--92.
2. Londero AT, 1986. Paracoccidioidomicose: formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. *J. Pneumol.* 12: 41--60.
3. Calich VLG, Kashino SS, 1998. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Br J Med Biol Res* 31: 615--623.
4. Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CAC, Russo M, Calich VLG, 1995. Pulmonary Paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: Relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. *Infect Immun* 63: 1777--1783.
5. Goldani LZ, Sugar AM, 1998. Short report: use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 58: 152--153.

6. Motoyama AB, Venancio EJ, Brandao GO, Petrofeza-Silva S, Pereira IS, Soares CM, Felipe MS, 2000. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol* 38: 3106--3109.
7. Burgos LC, Cano LE, Restrepo A, 1985. Purification de antígenos somáticos del *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudio Preliminar. *Rev Inst Med* 27: 76--81.
8. Calich VLG, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E, 1985. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol* 66: 585--594.

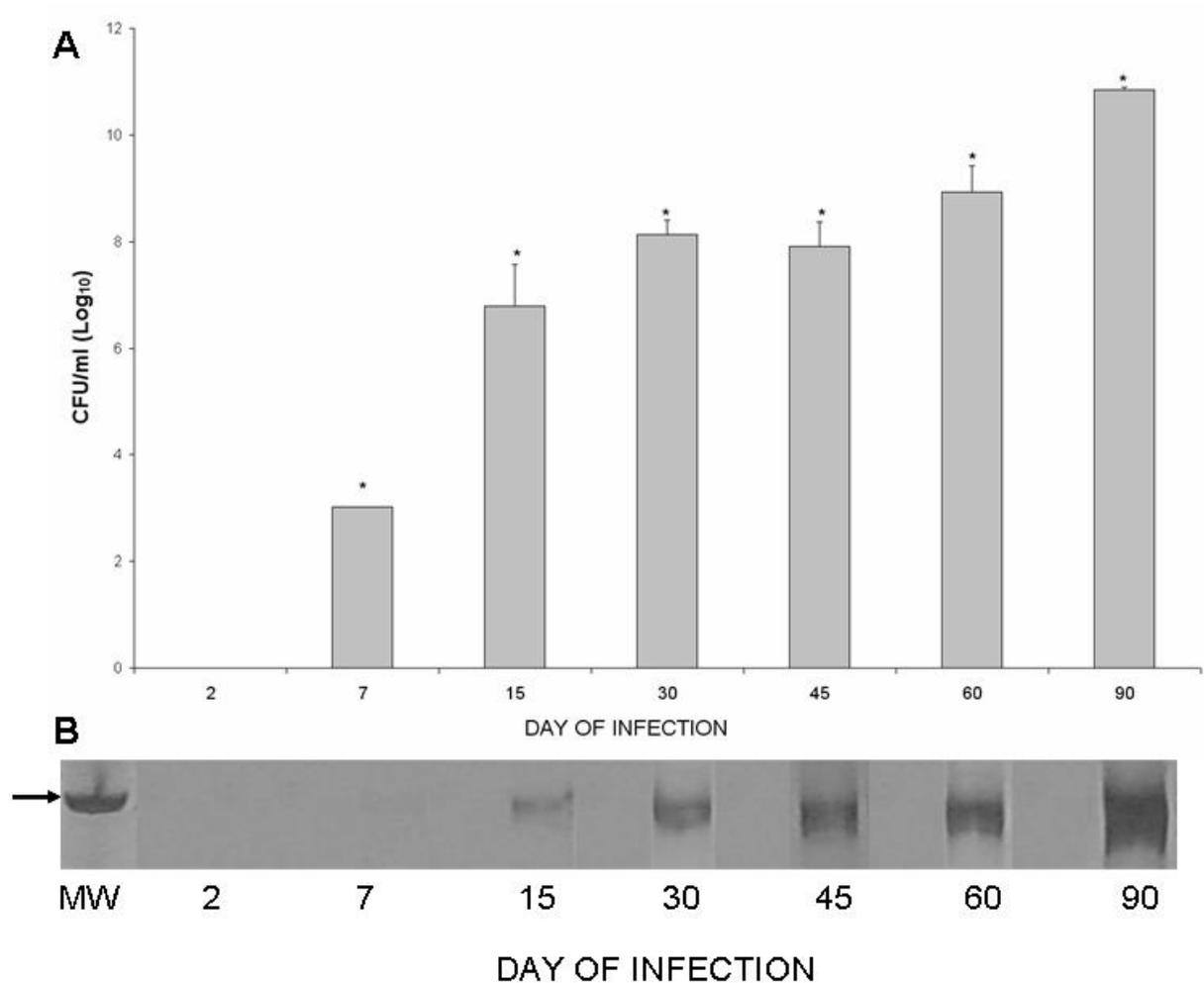


Figure 1. (A) Time course of pulmonary infection of BALB/c mice inoculated intrathoracically with  $10^6$  yeast forms of *P. brasiliensis*. Each bar represents the mean of six

animals. Range bars represent standard errors of the means. \*p < 0.05 vs group 2 days postinfection. (B) DNA products obtained after digestion of lungs at different times evaluated by PCR using ITS-1 and OL-5 primers, and analyzed by 5% polyacrilamide gel electrophoresis silver staining. Arrow: 496-bp molecular weight (MW). GeneRuler 100-bp DNA ladder.

Table 1 – Primer sequence

Primers	Sequencing	Product
ITS-1	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'	496pb
OL-5	5'-TGT GAC GAA GCC CCA TAC G-3'	

## **9. Anexos**



The American Journal of  
Tropical Medicine and Hygiene

09-Aug-2007 Re: AJTMH-07-0408 Manuscript ID

Dear Dr. Ana Ferreira:

This is to acknowledge that the above manuscript has been received by the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Please refer to this number in all your future correspondence with the Journal office. FOR ORIGINAL SUBMISSIONS:

This information refers to ORIGINAL SUBMISSIONS only. If this is a revised manuscript, please skip to the REVISIONS section of this letter below.

Please verify the following information and notify the journal office immediately if there are any discrepancies: Manuscript type:

Title: INTRATHORACIC INFECTION MODEL OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS IN BALB/c MICE

Authors: Alves, Caio; Azevedo, Ana; Machado, Marco; Souza, Maria; Teixeira, Henrique; Ferreira, Ana

Right running head: INTRATHORACIC PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS INFECTION

If you have not done so already, please be sure to download and sign the journal copyright form and return it to the journal office by fax or mail. This form can be accessed on the <http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh> site under the "Instructions and Forms" link. We also require the signatures of all contributing authors on the cover letter indicating that they participated in the study and concur with the submission and subsequent revisions submitted by the corresponding author.

Thank you for your interest in The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

Sincerely,

Laura Buckley

Editorial Assistant

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene