

VICIANY ERIQUE FABRIS

AMILOIDASE EXPERIMENTAL NO HAMSTER (*Mesocricetus auratus*)
INDUZIDA PELO *Paracoccidioides brasiliensis*

- Aspectos histológicos e ultraestruturais do rim
- Estudo da função renal
- Eletroforese e imuno-eletroforese das proteínas séricas e urinárias

ORIENTADOR : PROF. DR. JOSÉ LOPES DE FARIA

Tese de doutoramento apresentada à
Faculdade de Ciências Médicas da
UNICAMP

CAMPINAS

— 1976 —

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais, que nunca mediram esforços para que eu
pudesse concretizar os meus objetivos.

A minha espôsa, MIRIAN
incentivadora pertinaz.

A minhas filhas, PAULA e FERNANDA,
pelo tempo que deixei de lhes dedicar.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Magnífico Reitor

Prof. Dr. Zeferino Vaz

Coordenador Geral da UNICAMP

Prof. Dr. Paulo Gomes Romeo

Coordenador Geral das Faculdades

Prof. Dr. Rogério Cezar de Cerqueira Leite

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Diretor da Faculdade de Ciências Médicas

Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti

Diretor Associado

Prof. Dr. John Cook Lane

CHEFES DOS DEPARTAMENTOS E PROFESSORES TITULARES

Prof. Armando de Aguiar Pupo

Prof. Aureliano Baptista da Fonseca

Prof. Bernardo Beiguelman

Prof. Décio Silveira Pinto de Moura

Prof. Gottfried Koberle

Prof. José Aristodemo Pinotti

Prof. José Lopes de Faria

Prof. José Martins Filho

Prof. Luiz Sérgio Leonardi

Prof. Manuel Pereira

Prof. Nubor Orlando Facure

Prof. Oswaldo Vital Brazil

Prof. Reginaldo Zaccara de Campos

Prof. Silvio dos Santos Carvalhal

Prof. Vicente Amato Neto

PROFESSORES EMÉRITOS

Prof. Antonio Augusto de Almeida

Prof. Gabriel Oliveira da Silva Porto

AGRADECIMENTOS

Àqueles que souberam despertar meu interesse pela Anatomia Patológica, sendo responsáveis pela minha formação como patologista:

- PROF. DR. MARIO RUBENS G. MONTENEGRO
- DR. MARCELLO FABIANO DE FRANCO
- DRA. KUNIE IABUKI
- DR. CELSO RUBENS VIEIRA E SILVA

Agradecimento particular:

- PROF. DR. JOSÉ LOPES DE FARIA, pela sua acolhida ao Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP
- DRA. KUNIE IABUKI, que propôs o tema.

Muitas pessoas foram responsáveis para que este trabalho fosse realizado. A todos somos gratos:

- Departamento de Morfologia Animal da FFCL de Rio Claro, na pessoa da PROF. CARMINDA DA CRUZ LANDIN, pelo auxílio na preparação do material para microscopia eletrônica.
- Ao auxiliar de ensino, WILSON NAKAMOTO, pelos dados de eletroforese e imunoeletroforese.
- Aos seguintes colegas pelo apoio recebido:
DRA. MARIA CRISTINA F.I. DE MATTOS, DR. JOÃO LAURO VIANA DE CAMARGO e DRA. MARTA C. HABERMANN.
- SR. NIVALDE A. BASSO, pelo valioso auxílio técnico e datilográfico.
- SRTA. VILMA VILEIGAS e SR. NILSON VENDRAMINI, por trabalhos datilográficos.
- A todos os funcionários que muito nos auxiliaram:
 - Disciplina de Anatomia Patológica.
 - Laboratório Clínico do Hospital das Clínicas.
 - Secção de Documentação Fotográfica
 - Biblioteca - Biotério - Gráfica

" Between animal and human medicine there is no dividing line - nor should there be. The object is different but the experience obtained constitutes the basis of all medicine"

Rudolph Virchow (1821 - 1902)

ÍNDICE

	Pag
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A substância amilóide.....	1
1.1.1. Histórico.....	1
1.1.2. Classificação.....	2
1.1.3. Identificação histológica.....	5
1.1.4. Modelos experimentais.....	7
1.1.5. A microscopia e a microscopia dos órgãos mais comumente envolvidos na amiloidose secundária.....	8
1.1.6. Natureza e Patogênese.....	15
1.2. A Paracoccidioidomicose.....	23
1.2.1. Considerações gerais.....	23
1.2.2. Modelos experimentais.....	25
2. OBJETIVO DO PRESENTE TRABALHO.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Animais utilizados.....	28
3.2. Inóculo e via de inoculação.....	29
3.2.1. Microscopia óptica.....	29
3.2.2. Microscopia eletrônica.....	29
3.3. Exames laboratoriais.....	30
3.4. Colheita de material.....	31
3.4.1. Sangue.....	31
3.4.2. Urina.....	31
3.4.3. Necrópsia e colheita de fragmentos de tecido.....	31
3.5. Microscopia óptica.....	32
3.5.1. Colorações específicas para o amilóide....	32
3.5.2. Critérios de avaliação das lesões.....	33
3.5.3. Documentação fotográfica.....	34
3.6. Microscopia eletrônica.....	34
3.6.1. Obtenção e fixação dos fragmentos.....	34
3.6.2. Desidratação e embebição.....	35
3.6.3. Inclusão e corte.....	35

	Pag
3.6.4. Coloração.....	35
3.6.4.1. Cortes grossos.....	35
3.6.4.2. Cortes finos.....	36
3.6.5. Exame das telas e material fotográfico....	36
3.7. Provas de função renal.....	36
3.7.1. Proteinúria.....	36
3.7.2. Proteinemia.....	37
3.7.3. Uréia e creatinina no sôro.....	37
3.8. Eletroforese e imunoeletroforese de proteínas....	38
3.8.1. Eletroforese.....	38
3.8.2. Imunoeletroforese.....	38
3.9. Animais controles.....	39
3.9.1. Animais normais.....	39
3.9.2. Animais inoculados com solução de meio de cultura em salina estéril.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Generalidades.....	40
4.2. Macroscopia dos rins.....	40
4.3. Microscopia óptica dos rins.....	43
4.4. Microscopia eletrônica dos rins.....	47
4.5. Provas de função renal.....	50
4.5.1. Dosagens de proteínas no sôro.....	50
4.5.2. Dosagens de proteínas na urina.....	51
4.5.3. Uréia e creatinina no sôro.....	53
4.6. Eletroforese.....	54
4.6.1. Proteínas séricas.....	54
4.6.2. Proteínas urinárias.....	54
4.7. Imunoeletroforese.....	55
4.7.1. Proteínas séricas.....	55
4.7.2. Proteínas urinárias.....	55
4.8. Documentação fotográfica.....	56
5. COMENTÁRIOS.....	70
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Substância Amiloide

1.1.1. Histórico

A substância Amiloide, foi descrita provàvelmente, pela primeira vèz por BONET^{*}, no século XVII, quando relatou o caso de um paciente que apresentava um abscesso no fígado e um baço muito grande com inúmeros "cálculos brancos". É de se supor que BONET estivesse descrevendo a deposição de amiloide na polpa branca do baço ("baço sagu") observado na amiloidose secundária.

ROKITANSKY^{*} em 1842 foi o primeiro a descrever a "amiloidose" como uma entidade patológica, na qual muitos órgãos exibiam um aspecto céreo devido a deposição de um material homogêneo. Foi VIRCHOW^{*}, 13 anos mais tarde em 1855 que notando a coloração azul escura desta substância, quando corada com iôdo e ácido sulfúrico diluído, à semelhança do amido, denominou-a de substância amiloide e à doença Amiloidose.

Dois anos após (WILKS^{*}, 1856) observa a associação de amiloidose com doenças inflamatórias crônicas (osteomielite e tuberculose).

MECKEL^{*} descobre que o mesmo aspecto céreo que era descrito somente no fígado, baço e rins, também podia ser encontrado em outros órgãos como a parede da aorta e artérias menores, coração e parede intestinal. Em 1886, WILD^{*}, relata o primeiro caso de amiloidose não relacionada a nenhuma outra patologia.

A forma de amiloidose relacionada ao Mielo_{ma} Múltiplo foi descrita, ao que parece, pela sua descrição aná-

^{*} APUD KYLE e BAYRD, 1975.

tomo patológica por ADAMS* em 1872; porém só em 1903, WEBER* descreve comprovadamente um caso de mieloma múltiplo com proteína de Bence-Jones na urina, associado a Amiloidose. Em 1904, ASKANAZY-KONIGSBERG* dá uma descrição pormenorizada desta associação.

A história da Amiloidose está descrita em um excelente trabalho de LETTERER (1968).

1.1.2. Classificação

Não existe uma classificação satisfatória para a Amiloidose. A confusão e a controvérsia, são consequência da variedade dos sistemas de classificação e da terminologia usada por diferentes investigadores.

REIMANN e col. (1935), classificaram-na da seguinte forma:

Amiloidose Primária, seria a forma que não é precedida nem coexiste com outras doenças; compromete principalmente os tecidos mesodérmicos (músculo esquelético e liso, sistema cardiovascular, etc.) tendo tendência a formar depósitos nodulares.

Amiloidose Secundária, envolve o fígado, baço, rins e supra renais e está associada a doenças crônicas.

Amiloidose, Forma Tumoral, caracteriza-se pelo acúmulo de pequena e única ou grandes e múltiplas massas de amiloide, encontradas geralmente na bexiga, uretra, ou trato respiratório alto.

Amiloidose, associada ao Mieloma Múltiplo

KING (1948), simplificou a classificação. A Amiloidose será Típica quando envolvesse os rins, fígado, baço e supra-renais, associada ou não a qualquer outra doença, in-

cluindo Mieloma Múltiplo e Atípica quando encontrada em um ou mais focos, ou órgãos que não os citados, novamente associada ou não a outras doenças. A classificação aparentemente simples foi alvo de críticas e confusões.

Em 1950, DARLIN, volta a classificá-la como Primária (sistema ou focal) quando não associada a outras doenças, Secundária (sistêmica ou focal) quando associada a outros processos morbidos e Amiloidose associada ao Mieloma Múltiplo.

SYMMERS (1956), observando as coincidências entre as classificações, propõe uma classificação nova: Amiloidose Secundária generalizada (associada a doenças predisponentes), Amiloidose Primária generalizada (não associada a outras doenças) e Amiloidose Localizada.

Esta classificação era mais simples, porém, também incompleta, pois, começavam a ser descritos os primeiros casos de amiloidose de caráter heredo-familiar.

MISSMAHL e HARTWIG (1953), verificaram existir uma forma de amiloide que era birrefringente quando corada com o vermelho-congo sob microscópio de luz polarizada. No entanto, quando este amiloide era submetido ao fenol, perdia essa característica; outra forma de amiloide só perdia esta propriedade quando submetido ao glicerol. Este último tipo característico do amiloide que se depositava próximo a fibras de reticulina; o primeiro tipo, era característico daquele que se depositava entre as fibras colágenas. Baseado nestas observações, um novo tipo de classificação da amiloidose foi proposta (HELLER e col., 1964): Amiloidose Perireticular e Amiloidose Pericolágena.

A classificação, embora interessante, não tem sido aceita pela maioria dos autores por falta de consistência da coloração e por se tornar difícil a classificação em casos de amiloidose generalizada avançada, quando existe deposição de amiloide tanto Pericolágena como Perireticular. Alguns auto-

res têm feito associação da classificação em pauta, com a de KING (1948); assim teríamos Amiloidose Perireticular (Típica ou Atípica) e Amiloidose Pericolágena (Típica ou Atípica). Outro dado que vem dificultar a classificação de HELLER e col., sob o ponto de vista morfológico, é o fato de que, sob o microscópio eletrônico é difícil, senão impossível, distinguir colágeno imaturo de fibras reticulares; esta diferenciação só é conseguida por métodos histoquímicos (COHEN, 1967).

Em 1974, ISOBE e OSSERMAN sugerem uma nova classificação baseada fundamentalmente nos padrões clínicos da distribuição do amiloide:

PADRÃO I - Quando o amiloide envolve principalmente, língua, coração, trato-gastrointestinal, músculos liso e estriados, ligamentos do carpo, nervos e pele (este padrão de distribuição é aquele observado no tipo Primário de REIMANN). Esta distribuição, é mais comumente vista em associação com discrasia plasmocitária oculta ou Mieloma Múltiplo.

PADRÃO II - Quando a amiloidose envolve principalmente o fígado, baço, rins e supra-renais (é o padrão de distribuição do tipo Secundário de REIMANN) sendo comumente associado a infecções crônicas, artrite reumatóide, febre mediterrânea familiar e doença de Hodgkin.

PADRÃO MISTO I e II - Quando o amiloide envolve os órgãos preferenciais dos dois padrões anteriores, parecendo representar uma mistura de processos patológicos.

LOCALIZADA - Quando o depósito de amiloide é limitado a um só tecido ou órgão.

Recentemente, KYLE e BAYRD (1975) baseados em 236 casos de amiloidose, e empregando os conhecimentos atuais

sobre a bioquímica das fibrilas de amiloide, preferem empregar a classificação de REIMANN (1935), ampliada:

<u>Classificação</u>	<u>Maior componente proteico</u>
<u>Amiloidose Primária</u> (sem evidências de doenças pré-existentes ou coexistentes)	Ig - VL*
<u>Amiloidose Secundária</u> (coexiste com outras doenças como infecções crônicas e artrite reumatóide)	A U O**
<u>Amiloidose com Mieloma Múltiplo</u>	Ig - VL
<u>Amiloidose Localizada</u> (envolvimento de um só órgão)	Ig - VL
<u>Amiloidose Familiar</u>	A U O

1.1.3. Identificação Histológica da Substância Amiloide

A substância amiloide, quando as lâminas são coradas pela hematoxilina-eosina (HE) e observadas ao microscópio óptico, aparece como uma substância amorfa, eosinofílica, hialina.

Esta substância tem a propriedade de corar-se metacromaticamente com o violeta de metila, violeta de cristal e o azul de toluidina (LARSEN, 1958).

A técnica de van-Gieson para colágeno, produz na substância amiloide, uma "coloração negativa": o colágeno cora-se em vermelho, outros elementos em amarelo forte e o amiloide assume uma cor amarela desbotada (cáqui) (SYMMERS, 1956; COHEN e col., 1959).

* Ig - VL = Fragmento variável amino-terminal de imunoglobulina de cadeia leve.

** A U O = Amiloide de origem desconhecida (provavelmente uma proteína não imunoglobulínica).

Pelo método de coloração do ácido periódico-Schiff (PAS), o amiloide cora-se em tonalidade violácea (COHEN, 1967).

Na atualidade tem-se usado amplamente o vermelho-congo para evidenciar os depósitos de amiloide (ZUCKER-FRANKLIN e FRANKLIN, 1970; ZOLTOWSKA e WRZOLKOWA, 1973).

A substância amiloide corada pelo vermelho congo, toma a cor rosa. Falta ao método, no entanto, boa especificidade pois cora também tecido elástico e faixas espessas de colágeno (COHEN, 1967); a especificidade da reação aumenta quando o amiloide assim corado é observado ao microscópio de luz polarizada, adquirindo neste caso uma birrefringência verde (MISMAHL e HARTWIG, 1953; COHEN, 1967). Infelizmente, a especificidade não é absoluta como mostra o excelente trabalho de KLATSKIN (1969).

A partir dos trabalhos de PUCHTLER e col. (1962, 1964) tem-se obtido bons resultados com o vermelho-congo, em meio alcalino (hidróxido de Na a 1%), quando o amiloide é observado sob microscópio de fluorescência.

ROMHAYI (1971), introduziu a técnica de tratar os tecidos, antes da coloração com o vermelho-congo, com enzimas proteolíticas, afim de facilitar a distinção entre a birrefringência do amiloide e a do colágeno.

Material embebido em epoxi para microscopia eletrônica, pode ser corado pelo vermelho-congo com a técnica descrita por SHIRAHAMA e COHEN (1966).

Embora BENNHOLD (1922), tenha introduzido o vermelho-congo como teste histoquímico para identificação do amiloide, até o momento não se conhece como a substância se liga ao corante. O trabalho de WOLMAN e BUBIS (1965), relata as possíveis ligações da "molécula de amiloide" e do corante, afim que se produza birrefringência. RUINEN e col. (1972), fazem uma revisão do assunto, sem concluir sobre a natureza da ligação amiloi-

de-vermelho-congo.

Baseado no fato de que o vermelho-congo , desaparece do sôro, da maioria dos pacientes com amiloidose, com maior rapidez do que nos indivíduos normais, tem-se usado como um dos procedimentos para a detecção "in vivo" de amiloidose (CALKINS e COHEN, 1960).

A partir da década de 60 a introdução de fluorocromos na coloração do amiloide, feita por VASSAR e CULLING (1959) afim de produzir fluorescência secundária, tem sido usada com frequência.

O fluorocromo mais usado para este fim é a TIOFLAVINA-T, que nos locais do depósito de amiloide, fluoresce em amarelo esverdeado sob luz ultravioleta. Existem inúmeros trabalhos na literatura testando a especificidade do método (HOBBS e MORGAN, 1963; LEHNER, 1965; MCKINNEY e GRUBB, 1965; ROGERS, (1965; BURNS e col., 1967).

Atualmente preconiza-se para a detecção da substância amiloide que se use o vermelho-congo alcalino sob microscópio de luz polarizada e TIOFLAVINA-T sob microscópio de fluorescência.

Em nossa experiência, temos obtido bons resultados usando o vermelho-congo alcalino sob luz ultravioleta , aparecendo a substância amiloide, fluorescendo em vermelho-alaranjado.

1.1.4. Os Modêlos Experimentais

Uma das primeiras referências de que os animais eram susceptíveis de apresentar amiloidose, foi a de ZENONI (1922), em cavalos hiperimunizados para produção de antitoxina diftérica (APUD, ZOLTOWSKA e WRZOLKOWA, 1973).

Inúmeras variedades de animais de laborató

rio e uma série de agentes indutores tem sido descritos e usados para a produção de modelos experimentais de amiloidose. O agente indutor mais comumente usado é a CASEÍNA e o animal experimental, o RATO. A literatura específica é farta destes exemplos (TEIJUM, 1956, 1964; SRI RAM e col., 1968; HARDT, 1971; COHEN e SHIRAHAMA, 1972; SHIRAHAMA e col. 1973; SCHEINBERG e col., 1975).

Outros modelos experimentais tem sido desenvolvidos:

- rato e endotoxina de Escherichia coli (BARTH e col., 1968)
- rato e adjuvante de FREUND completo (DELELLIS e col., 1970)
- coelho e caseína (COHEN e CALKINS, 1960; RANLOV e WANSTRUP, 1967).
- cobaio e caseína (CATHCART e col., 1972)
- hamster e Leishmania donovani (HINGLAIS e col., 1964; SHIBOLET e col., 1967; DUARTE, 1976).
- hamster e vacina tríplice (ZOLTOWSKA e WRZOLKOWA, 1973).

Pode-se deduzir, pelos modelos experimentais, que os mesmos são baseados na observação de que, infecções crônicas, proteínas estranhas e hiperimunizações, induzem a formação de amiloide.

1.1.5. A Macroscopia e a Microscopia dos Órgãos mais Comumente envolvidos na Amiloidose Secundária.

Macroscopicamente a substância amiloide pode ser identificada como foi descrita classicamente por VIRCHOW, através da coloração pelo iôdo e ácido sulfúrico diluído, quando então adquire uma cor azulada.

Os órgãos que apresentam amiloidose em pequena quantidade, não exibem anormalidades macroscópicas; no en-

tanto, quando a mesma, torna-se acentuada, o órgão envolvido torna-se borrachoso, de consistência firme, pálido e de aspecto céreo (COHEN, 1967).

A microscopia óptica, a deposição do amilóide sempre se inicia entre as células, frequentemente nas proximidades de membranas basais. Com a progressão dos depósitos, as pequenas massas acabam se fundindo, envolvendo as células adjacentes, levando-as, progressivamente a atrofia. Nos estádios avançados, grandes depósitos de amiloide, terminam por envolver todo o órgão, destruindo as células e às vezes interferindo com sua função.

a) Amiloidose Renal - a amiloidose renal é uma das formas mais comuns e de consequências mais sérias do envolvimento orgânico desta patologia (CALKINS e COHEN, 1960).

Macroscopicamente, o rim, pode não mostrar alterações de volume ou cor, se os depósitos forem pequenos. Nas formas mais avançadas o órgão mostra-se aumentado de volume, firme, de cor cinza pálido; ao corte há saída de pouca quantidade de sangue, a superfície é pálida, de aspecto céreo, translúcida. Embora classicamente descrito, nem sempre o rim lesado está aumentado de volume, não é raro, encontrar rins normais, ou mesmo diminuídos de tamanho, sem que haja outras nefropatias intercorrentes (AUERBACH e STEMMERMAN, 1944). A contração renal é atribuída à diminuição da luz vascular, pela deposição de substância amiloide na parede de artérias e arteríolas.

Microscopicamente são os glomérulos a primeira estrutura a ser atingida na amiloidose renal, embora, o interstício tubular e a parede das artérias possam ser igualmente acometidas.

Nos glomérulos a substância amiloide pode aparecer espessando a membrana basal dos capilares de modo difuso ou nodular. Com o progredir dos depósitos os glomérulos acabam se transformando em "bolas hialinas", não raramente colageni-

zadas, (SHIRAHAMA e COHEN, 1967) com completa destruição da arquitetura e oclusão da luz capilar. Nesses estádios avançados há atrofia glomerular e às vezes espessamento conjuntivo da cápsula de Bowman (HINGLAIS e MONTERA, 1964).

É um fato interessante, que nas fases iniciais e intermediárias do depósito de amiloide, os glomérulos do mesmo rim podem ser diferentemente acometidos (SLAUSON e col. , 1970). Nos estádios avançados, todos os glomérulos são invariavelmente atingidos.

Os túbulos são geralmente dilatados, revestidos por células cúbicas, contendo na luz material amorfo PAS positivo (COHEN, 1967). Os depósitos de amiloide, começam por se localizar nas proximidades da membrana basal tubular, estendendo-se ao tecido conjuntivo intersticial.

Numerosos trabalhos de microscopia eletrônica têm sido realizados tanto em rins amiloidóticos de animais experimentais quanto em rins humanos obtidos de biópsias e autópsias. Um dos mais importantes trabalhos pertinente ao assunto , foi realizado por COHEN e CALKINS (1959) que descreveram pela primeira vez um componente fibrilar no amiloide de diversas origens. Este trabalho veio confirmar a hipótese de ROMHANYI (1949) que ao observar a birrefringência do amiloide, sugeriu a possibilidade da substância ser constituída de fibras. Na realidade hoje sabemos que a aparência hialina e amorfa do amiloide, vista ao microscópio óptico, corresponde, de fato, ao depósito de material fibrilar.

O componente fibrilar é proteico e observado ao M.E., mostra-se constituído por fibrilas rígidas, não ramificadas, medindo aproximadamente $100 \text{ \AA}$ de espessura com comprimento estimado em $8000 \text{ \AA}$ (COHEN e CALKINS, 1960).

De modo geral, o conjunto dos trabalhos existentes na literatura, mostra que existem semelhanças entre os

achados ultraestruturais quer quando se estudam rins humanos quer rins de animais experimentais, qualquer que seja a classificação da amiloidose estudada (COHEN e CALKINS, 1960; BERGSTRAND e BUCHT, 1961; SUZUKI e col., 1963; HINGLAIS e col., 1964; SORENSON e SHIMAMURA, 1964; SHIMAMURA e SORENSON, 1965; SHIRAHAMA e COHEN, 1967; ZOLTOWSKA e WRZOLKOWA, 1973).

Os autores nem sempre concordam quando descrevem as fases iniciais dos depósitos de amiloide no rim. Assim, COHEN e CALKINS, 1960, estudando amiloidose induzida por caseína em coelhos observaram que quando existiam depósitos focais de amiloide no rim, eles eram localizados, entre o citoplasma da célula endotelial e a membrana basal; quando o acúmulo era maior, aparecia em pequena quantidade no lado epitelial da membrana basal.

Outros autores, em trabalhos posteriores, concordam em descrever os primeiros depósitos da substância amiloide na região mesangial (SUZUKI e col., 1963; HINGLAIS e MONTE NEGRO, 1964; SHIMAMURA e SORENSON, 1965).

SHIRAHAMA e COHEN (1967), estudaram extensamente o assunto, encontrando a maioria dos depósitos iniciais de amiloide, localizados na área mesangial: entre as células mesangiais, entre a célula mesangial e a célula endotelial e entre a célula mesangial e a membrana basal. A matriz mesangial (componente do mesangio, frouxo, semelhante à membrana basal) às vezes se confunde com a substância amiloide. Estes autores concluem neste trabalho, que as células mesangiais, são capazes de tomar parte na formação e na reabsorção do amiloide.

A medida que os depósitos progridem, estes vão se relacionando com a membrana basal dos capilares. Às vezes, a membrana basal é claramente separada das fibrilas de amiloide enquanto que em outras ocasiões ela torna-se volumosa, à custa de fibrilas na sua espessura, chegando mesmo a perder-se, imersa na massa de amiloide (JAO e PIRANI, 1972; HIPTINSTALL, 1974).

Com relação as células epiteliais, de modo geral, as alterações consistem em perda dos processos podálicos, a medida que os citoplasmas dos mesmos vão se fundindo em contiguidade a membrana basal, nas áreas onde existe amiloide (JAO e PIRANI, 1972).

Da extensa bibliografia consultada encontramos apenas no trabalho de SORENSON e SHIMAMURA, 1964, o encontro de substância amiloide na luz dos capilares glomerulares.

As fibrilas de amiloide por vezes podem aparecer livres no espaço de Bowman, tanto em amiloidose renal humana (SHIRAHAMA e COHEN, 1967) como em amiloidose renal experimental (HINGLAIS e col., 1964).

Com relação a outras estruturas renais, túbulos, interstício tubular e vasos, o trabalho de JAO e PIRANI, (1972), realizado em rins humanos, mostrou que nos casos de depósitos iniciais de amiloide, a membrana tubular se encontrava normal; o interstício tubular já apresenta pequenos depósitos em torno de capilares e fibroblastos adjacentes. Nos capilares o amiloide aparece inicialmente depositado na membrana basal, espessando-a discretamente. Em arteríolas e pequenas artérias, as fibrilas de amiloide, raras vezes, foram observadas na porção subendotelial ou no interior da lâmina elástica interna.

Em amiloidoses moderadas, a membrana basal tubular se achava espessada, notadamente nos segmentos das alças de Henle, túbulos convolutos distais, túbulos coletores e raramente nos túbulos convolutos proximais. Nos casos avançados, onde havia grande quantidade de amiloide intersticial e perivascular, as membranas basais tubulares perdiam sua identidade, em meio à massa das fibrilas de amiloide. As células tubulares comprimidas eram pequenas mas frequentemente apresentavam numerosas mitocôndrias. Em alguns túbulos foram observadas fibrilas no in-

terior da luz. No interstício, em meio às massas de amiloide encontravam-se restos de organelas citoplasmáticas ou feixes de fibras colágenas. Nos capilares intersticiais, a membrana basal, quase sempre desaparecia em meio a massas de fibrilas. Em artériolas e pequenas artérias, o amiloide era mais abundante entre as células musculares lisas da média.

A microscopia eletrônica permite distinguir com facilidade as alterações glomerulares da amiloidose de outras alterações glomerulares que tem aspecto semelhante ao microscópio óptico (SUZUKI e col., 1963; OSLEN, 1972).

b) Amiloidose hepática - O fígado é um órgão frequentemente afetado na amiloidose, porém as alterações da função hepática geralmente são discretas a despeito da grande quantidade de amiloide depositada no órgão (LEVINE, 1962).

Macroscopicamente o órgão pode estar bastante aumentado de volume. Externamente e aos cortes, apresenta cor castanho pálida, consistência firme e aspecto céreo.

Microscopicamente, a substância amiloide aparece inicialmente entre as células de Kuppfer e o hepatócito. A medida que o depósito progride, comprime as células hepáticas, levando-as à atrofia e posterior desaparecimento, quando grandes áreas do parenquima, podem ser substituídas inteiramente pelo amiloide (COHEN, 1967).

À microscopia eletrônica, observa-se que as fibrilas de amiloide depositam-se inicialmente no espaço de Disse (SKINNER e col., 1966). A medida da progressão dos depósitos, estes vão comprimindo e atrofiando as células hepáticas, bem como obstruindo os sinuzóides.

c) Amiloidose esplênica: Como no rim e no fígado, pequenos depósitos de amiloide no baço, passam despercebidos macroscopicamente. Quando os depósitos são mais extensos, pode existir esplenomegalia, havendo relato na literatura de ruptura espontânea do órgão com hemoperitônio fatal (POLLIACK e HERSHKO, 1972).

A deposição de amiloide no baço pode seguir dois padrões distintos ou uma associação de ambos:

- a) Deposição de amiloide limitado às adjacências dos folículos linfóides ou no interior dos folículos. Esta deposição dá um aspecto, à macroscopia, de pequenos nódulos consistentes aparentando grânulos de sagu ("baço sagu").
- b) Deposição de amiloide nas paredes dos seios esplênicos e nas traves conjuntivas. Estes depósitos, determinam, notadamente na porção capsular do órgão, estrias ou focos esbranquiçados, consistentes, lembrando a gordura branca dos suínos (baço lardáceo). Às vezes há coalescência destes depósitos, formando massas nodulares de amiloide.

À microscopia eletrônica, observa-se que os depósitos iniciais da substância amiloide encontra-se nas proximidades das membranas basais das células reticuloendoteliais - dos seios esplênicos e no interior da parede de pequenas artérias (COHEN e col., 1965). Em 1967, RANLOV e WANSTRUP, observaram que fibrilas de amiloide podem ser encontradas no interior do citoplasma de células do SRE do baço, aspecto este, confirmado por KAZIMIERCZAK (1972).

d) Amiloidose de outros órgãos : As supra-renais e os nódulos linfáticos são também locais de envolvimento relativamente frequente por amiloidose associada a doenças crônicas.

Na supra-renal, os depósitos se iniciam nas proximidades das membranas basais das células da cortical, notadamente da zona glomerular. A medida da progressão dos depósitos estes vão acometendo zonas mais profundas até atingirem a medular (ROBBINS, 1974).

No nódulo linfático, a distribuição do amiloide pode inicialmente ser confinada ao tecido conjuntivo perivascular e posteriormente envolver todo o nódulo, convertendo-o em uma massa de amiloide (HEEFNER e SORENSON, 1962). Eventualmente pode aumentar de volume, simulando uma linfadenopatia, aspecto este, mais observado, na amiloidose primária (MACKENZIE, 1963).

1.1.6. A natureza e patogênese

A definição química da natureza das proteínas que compõem as fibrilas de amiloide tem sido realizada em função de métodos que permitem a solubilização, o fracionamento, a purificação e a concentração dos maiores constituintes proteicos destas fibrilas (PRAS e col., 1969).

A investigação química dos tecidos com amiloide, foi iniciada por FRIEDREICH e KEKULE* que em 1859, chegaram a conclusão que somente proteínas faziam parte do amiloide. Este dado, foi confirmado por SCHMIEDEBERG* em 1920, pela similaridade dos pesos moleculares do amiloide e das globulinas séricas, sugerindo, portanto, que a substância amiloide era constituída de globulinas. LETTERER* (1934), postulou que o amiloide constituía-se de imunoglobulinas normais, depositadas nos tecidos na forma de imunoprecipitados. Com o desenvolvimento de método para isolamento de fibrilas de amiloide (COHEN e CALKINS, 1962), inúmeros

* apud HARDT e RANLOV (1973).

trabalhos de fisicoquímica e imunoquímica tem sido realizados.

OSSERMAN e col. (1964), sugerem a possibilidade da participação de imunoglobulinas anormais ou suas frações, na formação da amiloidose.

GLENNER e col. (1971b), pela análise da sequência de amino-ácidos e imunoquímica de fibrilas de amiloide isoladas e purificadas, concluem que estas fibrilas consistem de fragmentos de imunoglobulinas de cadeias leves. Em trabalho recente, SHIRAHAMA e col., (1973), demonstraram que um conjunto de segmentos variáveis de imunoglobulinas de cadeia leve, tem arranjo fibrilar.

Outros trabalhos concomitantes e posteriores sugerem que as fibrilas de amiloide, possam ser formadas por destruição enzimática de cadeias prolipeptídicas leves, circulantes, de imunoglobulinas (GLENNER e col., 1971a; FRANKLIN e ZUCKER-FRANKLIN, 1972; TAN e col., 1972; LINKE e col., 1973). Em concordância com estes achados bioquímicos, em 1972, KAZIMIERCZAK e em 1973 e 1975, SHIRAHAMA e COHEN, mostraram ao microscópio eletrônico, a íntima relação entre as fibrilas de amiloide e lisossomas. Aqui abriu-se um novo campo de pesquisa para se estudar enzimas e amiloidose e reabsorção do amiloide (FIELDS e col., 1973).

A relação entre proteína de Bence-Jones e amiloide foi postulada por MAGNUS-LEVY em 1931 e enfatizada por OSSERMAN e col. em 1964; recentemente, GLENNER e col. (1971a), usando pepsina (pH-3,5; T-37°C) conseguiram criar fibrilas, com as características das fibrilas de amiloide, ao digerir proteínas monoclonais de Bence-Jones.

Em 1973 TERRY e col., através da análise sequencial de amino-ácidos, demonstraram que havia homologia estrutural entre fibrilas de amiloide isoladas de um depósito no intestino delgado e proteínas de Bence-Jones isolada da urina do mesmo paciente. Parecia então confirmada a participação de proteínas de Bence-Jones na patogênese do amiloide. No entanto, mui

to embora, este fato tenha sido confirmado por outros pesquisadores, algumas proteínas de Bence-Jones, não produzem fibrilas de amiloide, sob as mesmas condições. (GLENNER e col., 1973).

OSSERMAN e col. (1964), têm enfatizado, que a proteína de Bence-Jones, de pacientes com amiloidose, tem uma grande tendência a se ligar a certos tecidos normais, evidenciando uma maior afinidade que outras proteínas de Bence-Jones de indivíduos sem amiloidose. Isto indicaria que algumas proteínas de Bence-Jones tem características "amiloidogênica". Revendo os trabalhos de GLENNER, parece provável que esta característica "amiloidogênica" deva ser encontrada na região variável de cadeia leve de imunoglobulinas.

Embora reconhecida a natureza imunoglobulínica de alguns amiloides, outros, principalmente aqueles ligados a amiloidose familiar e secundária, quando submetidos a análise sequencial de amino-ácidos, revelam-se constituídos por uma nova classe de proteína-fibrilar-amiloide (GLENNER e col., 1973). Esta proteína foi denominada de AVO (Amyloid of unknown origin) ou AS (Amyloid subunit) e um dos candidatos para esta fonte de proteína AVO deve ser "algo" relacionado a imunoglobulinas, como por exemplo, componentes do complemento.

BLADEN e col. (1966), trabalhando com amiloide purificado, obtido de 5 pacientes com amiloidose primária ou secundária, descreveram uma estrutura semelhante a uma rôsca, medindo $80 \text{ \AA}$ de diâmetro e composta de 5 sub unidades globulares em torno de uma cavidade central. Esta estrutura pentagonal é uma proteína com atividade antigênica, encontrada em todas as preparações de amiloide estudadas (CATHCART e col, 1971). Os anticorpos obtidos contra este componente pentagonal, reagem também com um componente do sêro de pacientes normais (por este motivo foi esta substância denominada "Componente plasmático" ou "Componente P"). Por imunoeletroforese, o "Componente P", foi identificado como uma glicoproteína que migra na região alfa 1. Segundo

GLENNER e col. (1973), "a presença constante desta substância nos depósitos de amiloide, parece ter uma significância patológica, embora seja possível que represente apenas, uma adsorção nos depósitos fibrilares de amiloide, de um componente protéico do sôro".

A descoberta por GLENNER e col. em 1970, de que um anticorpo idiotípico para proteína-fibrilar amiloide de um paciente, reagia com um componente do sôro somente deste paciente, foi a primeira indicação da existência de um precursor circulante para as proteínas fibrilares do amiloide. Segundo GLENNER e col. (1973), há 4 formas possíveis de precursores, 3 dos quais são fragmentos de imunoglobulinas:

- a) Complexos antígeno-anticorpo podem ser catabolizados por macrófagos (WALDMANN e STROBER, 1969), as imunoglobulinas degradadas e deste modo levariam à formação de fibrilas e deposição em órgãos ricos em macrófagos como o fígado, baço e rins, produzindo uma distribuição característica da amiloidose secundária.
- b) Imunoglobulinas normais livres ou fragmentos de imunoglobulinas (cadeias polipeptídicas leves) circulantes e em concentração aumentada, como acontece, por exemplo, no Mieloma múltiplo, poderiam ser uma fonte direta de fibrilas no sistema vascular, produzindo uma distribuição característica de amiloidose primária.
- c) Uma deleção no gene que produz imunoglobulinas de cadeia leve, poderia resultar em fragmentos análogos a fragmentos de cadeia pesada; como se observa na "doença de cadeia pesada" (macroglobulinemia de Waldenstrom) (FORGET e col. , 1966)
- d) Sob certas circunstâncias, poderia estar separada a síntese de regiões constantes (corboxi-terminal) e variáveis (amino-terminal) das cadeias leves das imunoglobulinas , levando à formação de fibrilas.

Inúmeros trabalhos tem mostrado que as fibrilas de amiloide têm uma restrita região antigênica (GLENNER e col. 1973), explicando assim que embora ocasionalmente tenha se encontrado imunoglobulinas nos depósitos de amiloide (MELLORS e ORTEGA, 1956; VASQUES e DIXON, 1956) a maioria dos pesquisadores não consegue demonstrar imunoglobulinas ou suas sub unidades, usando antisoros específicos, quando trabalham com fibrilas isoladas de amiloide (BENDITT e ERIKSEN, 1961; FRANKLIN e PRAS, 1969). Usando técnica de anticorpos ligado à ferritina, PAUL e COHEN (1963), não conseguiram demonstrar ao microscópio eletrônico gamaglobulinas em fibrilas isoladas de amiloide.

A noção de que a amiloidose consistia de depósitos de gamaglobulinas circulantes, ficou suspeita quando CLERICE e col. (1965), conseguiram induzir imunotolerância para caseína em ratos recém-nascidos, que no entanto desenvolviam amiloidose, exatamente igual a do grupo controle de ratos não tolerantes. Em 1964, TEILUM, descreve agamaglobulinemia associada a amiloidose.

Em vista dos dados expostos, podemos deduzir quão contraditório tem sido os resultados obtidos por imunofluorescência, dos depósitos de amiloide.

Em 1956, MELLORS e ORTEGA, descreveram imunoglobulinas em tecidos humanos com amiloidose. Este dado foi confirmado experimentalmente em coelhos com amiloidose (VASQUES e DIXON, 1956). No entanto, ZUCKER-FRANKLIN e FRANKLIN, 1970, não puderam demonstrar imunoglobulinas em depósitos de amiloide em vários tipos de amiloidose (amiloidose primária, secundária a tuberculose e associada ao mieloma múltiplo). Também MERETOJA e col., (1972), estudando amiloidose renal associada a distrofia latice da córnea, não encontraram nos depósitos, presença de imunoglobulinas ou o componente B1C do complemento.

Além das imunoglobulinas, outros componentes séricos têm sido descritos nos depósitos de amiloide. LACKMAN e col. (1962), e SCHULTZ e col., (1967), descreveram a presen

ça de componentes do complemento em depósitos de amiloide, sugerindo assim uma espécie de mecanismo imunológico responsável pelo aparecimento de amiloidose nos tecidos. HOROWITZ e col. (1965), usando também técnica de imunofluorescência descreveram a presença de fibrinogênio em pacientes com febre mediterrânea e hiperfibrinogenia e em menor quantidade em pacientes com hipergamaglobulinemia, sugerindo que o amiloide simplesmente representa uma deposição nos tecidos, de proteínas que se encontram em altas concentrações no sôro.

MILGRON e col. (1966), por imunoeletroforese descreveram dois componentes na substância amiloide: uma lipoproteína e uma componente que aparecia na região de alfa globulina; sugerindo que estes dois componentes, devam ser proteínas séricas normais, que tornam-se concentradas nos depósitos de amiloide.

Os componentes polissacarídios, normalmente encontrados nos depósitos de amiloide, na maioria dos casos, não são constituintes das fibrilas nem, aparentemente, são relacionados com sua formação ou deposição, acumulando-se, possivelmente, como um fenômeno secundário. Outras moléculas como glicoproteínas e lípidos, frequentemente observadas nos depósitos de amiloide, não parecem ser, componentes integrais das fibrilas (GLENNER e col., 1973).

Em 1964, TEILUM estudando a amiloidose em ratos, induzida por caseína, elaborou uma teoria bifásica para a produção do amiloide. Na primeira fase ou fase pré-amiloide, também chamada fase-pironinofílica, haveria, nos animais experimentais, uma proliferação de células pironinofílicas, reticulares e linfóides. A pironinofília tecidual é observada claramente nas zonas perifoliculares do baço e na cortex dos nódulos linfáticos. Na segunda fase, denominada fase-amiloide, haveria uma marcada e progressiva diminuição da pironinofilia, com o aparecimento de amiloide nestas áreas; concomitantemente, aparecem nas

imediações deste amiloide células do SRE com citoplasma PAS positivo.

TEILUM postulou que para a produção de amiloide, devesse existir inicialmente um estímulo antigênico do sistema imune, quando então apareceria as células pironinofílicas; posteriormente com a persistência da indução antigênica haveria exaustão do sistema imune e o amiloide seria depositado. Portanto, "o amiloide seria formado "in situ", por células fixas do SRE por secreção local de globulina contendo polissacarídeos, que permanecem justapostos a estas células na forma de agregados solúveis".

Em 1970, CATHCART e col., lançaram a sugestão de que a amiloidose poderia ser uma expressão de tolerância imunológica, pois conseguiram induzir tolerância a caseína em coelhos, sem depressão da imunidade celular a outros antígenos; sugerindo que a tolerância a um imunógeno específico pode ter um papel central na amiloidogênese.

Um ano mais tarde, HARDT e CLAEßSON(1971), não conseguiram repetir os achados de CATHCART, observando que a depressão do sistema imune celular era intensa nos animais experimentais com amiloidose. Em outro trabalho HARDT (1971), dá uma evidência direta de que a amiloidose é induzida por células imunocompetentes, quando consegue induzir amiloidose em ratos singênicos normais com supressão imunológica, através da transferência de células do baço, de um animal doador amiloidótico.

A teoria de que existe uma depressão geral, no sistema imune celular, em animais amiloidóticos é evidenciada pelo trabalho de CLAEßSON e HARDT (1972).

Na investigação da relação entre amiloide e imunidade celular deprimida, inúmeros trabalhos tem sido publicados, usando condições que favorecem a depressão linfocitária :

Timectomia (RANLOV, 1966)*, esplenectomia (CALKINS e col. 1960)*, radiação ionizante (LESHER e col. 1957)*, antimetabólicos (GOOD, 1967)* e cortisona (COHEN e col. 1962; TEILUM, 1964).

Segundo HARDT e RANLOV (1973), a teoria de que a amiloidogênese está intimamente relacionada com distúrbios do sistema imune, é baseada em:

- a) A doença pode ser provocada por estimulação antigênica prolongada.
- b) As células engajadas com a fase pré-amiloide e amiloide (TEILUM, 1964) são aquelas conhecidas como mediadoras da reação imune.
- c) Na fase amiloide são observados graves distúrbios funcio--nais no sistema celular imune e estes distúrbios podem ser correlacionados a alterações histológicas nos órgãos lin--fóides.
- d) As fibrilas de amiloide consistem de componentes de imuno--globulinas.

Apesar dos esforços, de vários grupos de pesquisadores em todo o mundo, estudando o assunto sob vários ângulos, com os meios mais sofisticados usados na pesquisa cientí--fica, a origem do amiloide permanece ainda enigmática.

* apud FALKSON e FALKSON, 1973.

1.2. A Paracoccidioidomicose (Blastomicose Sul-Americana-BSA)

1.2.1. Considerações gerais

A Paracoccidioidomicose (térmo sugerido em 1971, no I Simpósio Sul Americano sobre o assunto, realizado na Colômbia sob os auspícios da OPAS-OMS) é uma micose profunda, de caráter endêmico, distribuída por quase todo Brasil. Foi identificada pela primeira vez por LUTZ em 1908, o qual descreveu os aspectos clínicos e patológicos da doença em sua forma mucocutânea, isolando o fungo de dois pacientes com lesões labiais.

SPLENDRE (1910), descreveu mais quatro casos da doença e em 1930, ALMEIDA identificou o agente etiológico propondo para o mesmo a denominação de Paracoccidioides brasiliensis (P. brasiliensis).

O P. brasiliensis é um fungo imperfeito, de dimorfismo reversível pela alteração da temperatura. Assim em culturas mantidas a 37°C e em tecidos humanos, assume a forma leveduriforme, com gemulação característica em roda de leme. O aspecto em "roda de leme" observado ao microscópio óptico e ao microscópio eletrônico (CARBONELL e POLLAK, 1963; FURTADO e col., 1967; CARBONELL, 1971) é falaz; ao microscópio eletrônico de varredura, o fungo em reprodução, aparece como uma esfera provida de brotamentos em toda sua superfície, semelhante ao aspecto de uma mina marítima (VIEIRA E SILVA e col. 1974). Este tipo de brotamentos múltiplos é característico do fungo, sendo já salientado por LUTZ na sua descrição. Quando a cultura é mantida em meio ambiente, toma a forma filamentosa.

A paracoccidioidomicose é observada com frequência na Venezuela, Colombia, Uruguai e Argentina, sendo o Brasil e especialmente o Estado de São Paulo, onde é assinalada a maioria dos casos (MACKNNON, 1972).

A distribuição geográfica do P. brasiliensis parece confinada a região florestal, sub-tropical e tropical úmida com temperatura média anual entre 17 e 24°C, verões chuvosos e invernos moderados, sendo rara a ocorrência em desertos, estepes, zona litorânea e floresta equatorial (MACKINNON, 1972).

Como a micose em questão, parece estar mais ligada a indivíduos do meio rural, se iniciando na região buco-faríngea, muitos autores admitem a possibilidade da mesma estar relacionada aos hábitos higiênicos destas pessoas. No entanto não se conhece bem o habitat natural do agente, as condições de sua vida saprofítica ou o modo de contaminação do homem.

Assim como, admite-se que a lesão inicial deva começar na região buco-faríngea, com comprometimento linfático-regional e posterior disseminação linfática e hematogênica, inclusive para pulmões e pele (AZULAY, 1953; MOTTA, 1956), outros autores, admitem que a lesão se inicia por via pulmonar, pela inalação do fungo do meio ambiente, com posterior disseminação linfática e hematogênica para outros locais (MACKINNON, 1968; LONDERO e RAMOS, 1972). Os numerosos casos de Paracoccidioidomicose surpreendidos em hospitais para doenças pulmonares (REGO e col. 1968) e a observação de lesões mucocutâneas vários anos após o diagnóstico das lesões pulmonares (ROLLIER e CHENEBAULD, 1962) evidenciam a alta frequência do foco primário, residindo no pulmão.

Sob o ponto de vista histopatológico, as lesões observadas na Paracoccidioidomicose, são do tipo granulomatoso. A literatura pertinente é rica em descrições pormenorizadas, das lesões observadas no homem, sendo fundamentais os trabalhos de CUNHA MOTTA, no Brasil (MOTTA, 1935, 1945, 1948, 1956).

MENDES e col. (1971), PADILHA-GONÇALVES (1972) e MUSSATI (1974), mostraram que pacientes com Paracoccidioidomicose apresentam depressão na resposta imune mediada por células, o componente da resposta imune que é mais efetivo na pro-

teção a fungos (Informe de grupo científico da OMS, 1973). IABUKI (1973), refere esta hipótese, ao descrever a evolução da infecção experimental do hamster por P.brasiliensis. A imunidade humoral, parece não ser prejudicada em indivíduos com BSA, já que o resultado de várias pesquisas sorológicas mostra que os anticorpos circulantes encontram-se em alta porcentagem no sôro destes pacientes (CORREA e GIRALDO, 1972).

1.2.2. Os modelos experimentais

Os trabalhos com modelos experimentais de Paracoccidioidomicose, têm permitido o estudo da morfologia do agente nos tecidos, bem como conhecimentos sobre a patogenia da doença.

A primeira vez que se conseguiu produzir infecção experimental por P.brasiliensis foi em 1927 quando MONTENEGRO, utilizando o cobaio e a via testicular para o inóculo, produziu orquite específica, sem generalização da doença. Antes, SPLENDORE (1910), já havia inoculado, cobaio, gato, cão e macaco com material de lesões humanas, sem no entanto obter resultados.

Inúmeros tem sido os animais de laboratório, além do cobaio, usados como modelos experimentais: rato, coelho, camundongo e hamster. Inúmeras, também, tem sido as vias de inoculação dos animais, digestiva, respiratória, subcutânea, intra-peritoneal, intra-cardíaca, intra-muscular, endovenosa e intra-testicular. Entre nós, o animal mais utilizado é o cobaio e para o inóculo, a via intra-testicular.

O hamsters foi utilizado pela primeira vez como modelo experimental para a BSA, por GUIMARÃES (1951), que utilizou a via intra-testicular para inocular, material colhido de lesão labial de um paciente com Paracoccidioidomicose. Neste animal pode observar a evolução das lesões, semelhantes à doença humana progressiva. As lesões comprometiam, em ordem decrescente de intensidade, os testículos, fígado, nódulos linfáticos, baço, pulmões e intestinos. GUIMARÃES em 1964, volta a chamar a aten--

ção sobre a importância do hamster para modelo experimental da BSA. Neste trabalho, compara os resultados obtidos com micoses - experimentais, no hamsters, cobaio, rato e camundongo.

CONTI-DIAZ e FURCOLOW (1972) em um trabalho crítico sobre o comportamento do hamster e do camundongo , quando inoculados com P.brasiliensis, optam pelo hamster e via intra-testicular, por serem os que produzem melhores resultados.

Entre nós, IABUKI (1973), estudou a BSA experimental no hamster, dando uma excelente descrição da morfologia das lesões de inoculação e de disseminação, da ultraestrutura do local do inóculo, bem como estudando a evolução dos títulos de anticorpos circulantes; neste trabalho, a autora cita o encontro de amiloidose, em alguns animais experimentais.

2. OBJETIVO DO PRESENTE TRABALHO

Em 1973, IABUKI, trabalhando com Blastomycose Sul-Americana em hamsters, notou que alguns animais desenvolviam anasarca em torno do 70º dia, pós inoculação.

Na autópsia, estes animais apresentavam, além da disseminação da doença, amiloidose de vários órgãos (fígado, nódulos linfáticos, supra-renais, baço e rins). A distribuição orgânica era portanto a do tipo secundário (REIMANN e col., 1935; KYLE e BAYRD, 1975) ou semelhante ao Padrão II de ISOBE e OSSEMAN (1974).

Esta observação permitiu que planejássemos este trabalho, com os seguintes objetivos:

1. Estudar, do ponto de vista de microscopia óptica e ultraestrutural, as lesões de amiloidose renal que se desenvolvem em hamsters com Paracoccidioidomicose experimental.
2. Estudar, as variações da proteinúria de 48 horas e das taxas de uréia, creatinina e proteínas no sêro antes e depois do aparecimento da amiloidose renal.
3. Estudar como em 2, o comportamento das proteínas séricas e urinárias, através da eletroforese do sêro e da urina.
4. Pesquisar como em 2, por imunoeletroforese, IgG e a fração C₃ do complemento, na urina e no sêro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais Utilizados

Trabalhamos com hamsters (Mesocricetus auratus), machos, com cêrca de 3 meses de idade, pesando em média 79.5 g, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.

Estes animais foram divididos em 4 grupos experimentais que foram trabalhados em épocas diferentes.

GRUPO 1 - Composto por 26 animais inoculados com P. brasiliensis (cepa 18).

GRUPO 2 - Composto por 13 animais inoculados com solução de meio de cultura, em salina estéril (contrôle do grupo 1).

Os animais destes grupos, eram pesados a cada 10 dias e foram utilizados para estudo de microscopia óptica e microscopia eletrônica dos rins.

GRUPO 3 - Composto de 30 animais inoculados com P. brasiliensis (cepa 192).

GRUPO 4 - Composto de 10 animais, inoculados com solução de meio de cultura em salina estéril (contrôle do grupo 3).

Os animais dos 2 últimos grupos foram utilizados para estudo da função renal, eletroforese e imunoeletroforese das proteínas do sôro e urina.

3.2. Inóculo e Via de Inoculação

Para o inóculo foi usada suspensão, em salina estéril, das cepas 18 e 192 de P. brasiliensis, provenientes da micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. As culturas foram usadas no 7º dia de cultivo. O meio de cultura do fungo foi o de FAVA NETO (1955), a 37º C, em tubos de 20 x 220 mm. A suspensão tinha a turvação igual ao tubo 6 da escala de MAC FARLAND. Desta suspensão, 0,2 ml, foram imediatamente inoculados no testículo esquerdo de cada hamster, sob anestesia superficial com éter sulfúrico.

Os animais dos grupos controles foram injetados, identicamente, com 0,2 ml de solução de meio de cultura em salina estéril.

3.2.1. Microscopia Óptica (M.O.)

Para o estudo anátomo-patológico, ao microscópio óptico, 2 animais do grupo 1 e 1 animal do grupo 2, foram sacrificados de cada vez, com éter sulfúrico, aos 29, 40, 50, 61, 70, 81, 90, 102, 110, 123, 130, 140 e 151 dias após a inoculação.

3.2.2. Microscopia Eletrônica (M.E.)

Para o estudo ultraestrutural da amiloidose renal, os rins usados, foram selecionados após análise prévia do material à M.O.

3.3. Exames Laboratoriais

Os exames laboratoriais, obedeceram o esquema da tabela 1.

T A B E L A 1

Exames laboratoriais realizados nos animais do grupo 3 e 4 por época de sua realização.

Momentos Exames de Laboratório	Antes da Inoculação	Após a Inoculação		Após Edema
		30 dias*	60 dias*	
Proteinúria de 48 horas.	+ **	+	+	+
Proteinemia	+	+	+	+
Uréia no sôro	+	+	+	+
Creatinina no sôro	+	+	+	+
Eletroforese de proteínas do sôro	+			+
Eletroforese de proteínas na urina	+			+
Imunoeletroforese do sôro	+			+
Imunoeletroforese da urina	+			+

* Escolha dos períodos baseado em resultados anteriores de IABUKI, (1973).

* * Exame realizado.

3.4. Colheita de Material

3.4.1. Sangue

O sangue foi colhido por punção cardíaca, com o animal sob anestesia superficial ou a céu aberto, aspirado com seringa, sem anticoagulantes e colocado em tubos de ensaio pequenos, identificados. O volume de sangue colhido variou com o momento da colheita, tamanho do animal e fatores técnicos momentâneos. O sêro era separado por coagulação, em geladeira a 42 C por 24 horas. A seguir o sobrenadante era separado e centrifugado durante 15 minutos a 2.000 rpm. O sêro assim obtido era transferido para tubos de ensaio esterilizados e congelados a - 202 C, com a devida identificação.

3.4.2. Urina

A coleta de urina foi feita com os animais colocados em gaiolas metabólicas, com restrição hídrica, por 48 horas. A urina era coletada em pequenas provetas, o volume urinário individual era medido, e a seguir era ela centrifugada e congelada a -202 C para uso posterior.

3.4.3. Necropsia e colheita de fragmentos de tecido

Os animais sacrificados foram abertos ventral e longitudinalmente com ampla incisão toraco-abdominal. Foram expostos e examinados todos os órgãos, com retirada de fragmentos para estudo anátomo-patológico, com especial interesse pelos rins.

O rim direito era seccionado longitudinalmente ao meio; uma das partes fixadas em formaldeído e a outra em Helly.

O rim esquerdo era seccionado de modo semelhante, uma das partes, fixada em formaldeído e da outra, retirada dos fragmentos para microscopia eletrônica como descrito em 3.6.1.

3.5. Microscopia Óptica

O material utilizado para exame histológico foi preparado pelas técnicas habituais de fixação, inclusão, corte e coloração normalmente empregadas nos laboratórios de rotina de Anatomia Patológica.

A fixação foi feita em formaldeído a 10%, ou em Helly, em volume 10 vezes maior que o fragmento a ser fixado. O meio de inclusão foi a parafina e os cortes foram efetuados com micrótomo comum, em secções de 4 micra. A coloração de rotina foi feita com hematoxilina e eosina (H.E.) e alguns dos achados histopatológicos foram confirmados por colorações específicas: prata urotropina (JONES, 1957), PAS (HOTKHISS, 1948), Hematoxilina-Fosfotungstica e Masson (AFIP).

3.5.1. Colorações específicas para o amiloide

As lâminas dos rins dos animais do grupo 1 e 2 foram submetidas às colorações preconizadas para o amiloide: Vermelho-Congo alcalino (PUCHTLER e col., 1962), Vermelho - Congo alcalino observado ao microscópio de luz polarizada * (MISMAHL e HARTWIG 1953), Vermelho Congo alcalino sob luz ultra-violeta (experiência pessoal), Tioflavina - T (VASSAR e CULLING, 1959, ROGERS, 1965) com secção histológica, montada em glicerina tamponada (pH 8,5) sob microscópio de fluorescência e metacroma-

* Fotomicroscópio ZEISS-STANDART RA, equipado com polarizador e analizador de luz polarizada.

sia com Violeta de Cristal (LARSEN, 1958).

3.5.2. Critérios de avaliação das lesões

A análise das lâminas de rim foi realizada, segundo o esquema, modificado de ALMEIDA, 1972 observando:

- Estrutura geral do parênquima.
- Glomérulos: tamanho, lobulação, celularidade mesangial (*), celularidade parietal da cápsula de Bowman, infiltração dos glomérulos por células inflamatórias, aumento da matriz mesangial, espessamento da membrana basal glomerular, presença de depósitos de amiloide, congestão, sinéquias e fibrose.
- Túbulos: degeneração, sinais de regeneração, necrose, atrofia, presença de amiloide peritubular (intersticial), presença e tipo de cilindros na luz tubular, destruição inflamatória tubular.
- Interstício tubular: edema, hemorragia, presença e tipos de infiltrado inflamatório, depósitos de amiloide e fibrose.
- Vasos: hiper celularidade da parede, edema da parede, necrose, trombose, presença de amiloide na parede.

Para efeito de avaliação do grau de acometimento amiloidótico dos rins, dos animais do grupo 1, estabelecemos o seguinte critério, para a quantificação da amiloidose renal, baseado na coloração das lâminas pelo Vermelho Congo alcali no sob luz ultravioleta:

- a) glomérulos: + a +++ (*)
- b) interstício tubular: + a +++
- c) parede vascular: + a +++

* + = pouca

++ = moderada

+++ = muita

d) índices de amiloidose glomerular (IAG), interstício tubular (IAIT), e parede vascular (IAV): Estes índices foram definidos como a soma dos sinais (+) atribuídos a intensidades dos depósitos de amiloide, em cada uma das estruturas citadas.

e) índice de amiloidose renal (IAR): definiu-se como índice de amiloidose renal a soma dos índices de amiloidose glomerular, interstício tubular e parede vascular, isto é, $IAR = IAG + IAIT + IAV$.

3.5.3. Documentação Fotográfica

A documentação histopatológica apresentada foi obtida em fotomicroscópio automático Zeiss-Standard RA. As cópias em branco e preto são ampliações 9,0 x 6,0 cm de negativos de 35 mm obtidos em film Kodak, Plus-X-Pan, 125 ASA.

3.6. Microscopia Eletrônica

3.6.1. Obtenção e fixação dos fragmentos

O material para microscopia eletrônica foi colhido de rins dos animais do grupo 1 e 2, recortados em fragmentos cúbicos de 0,1 a 0,2 cm, com gilete desparafinada.

A fixação foi realizada observando o seguinte esquema:

Glutaraldeído - solução aquosa a 2%, 0,32 M em tampão fosfato (fosfatos, mono e bibásico de sódio) (MILLONIG, 1961), 0,22 M, pH 7.2, por 4 horas.

Lavagem em salina tamponada (NaCl 0,85% e sacarose 0,54%), 0,32 M, por 3 vezes.

Tetróxido de Osmio - solução aquosa a 1%, 0,32 M por 4 a 12 horas.

3.6.2. Desidratação e embebição

A desidratação foi realizada por meio de 9 passagens em álcool etílico de 30% a 100% e 2 passagens em óxido de propileno.

A embebição foi feita em óxido de propileno e "Resina"*, em partes iguais durante 12 horas com agitação contínua.

"Resina" pura - 1 hora a 45° C.

3.6.3. Inclusão e corte

Para a inclusão, o material foi colocado em cápsulas de gelatina contendo "Resina" pura e assim mantido no mínimo por 48 horas em estufa a 60° C.

Os blocos assim obtidos foram aparados e posteriormente cortados em ultramicrotomo Sorval (Porter-Blum) .

3.6.4. Coloração

3.6.4.1. Cortes grossos

Os cortes grossos (cêrca de 0,2 micra de espessura) foram corados com uma mistura de solução aquosa de Azur II a 1% e Azul de metileno a 1% dissolvido em solução aquosa de Borax a 1%, em partes iguais. A coloração foi realizada a

* "Resina": 1. Araldite ^(R) Cy 145 (CIBA) - 10 ml.

2. Acelerador B - 0,5 ml.

3. DDSA (anidrico dodecil succínico) - 8 ml.

4. Dibuthylftalato - 0,1 m.

As substâncias são misturadas nessa ordem e agitadas por 10 minutos em misturador elétrico.

quente, até que o corante começasse a secar. Destes cortes, foram escolhidos os blocos dos fragmentos correspondentes, para se efetuar os cortes finos.

3.6.4.2. Cortes finos

Os cortes finos (cêrca de 90 milimicra de espessura) a serem usados para observação ao microscópio eletrônico, foram tratados com solução aquosa saturada de acetato de uranila a 2% e em seguida com solução aquosa de citrato de chumbo a 2,6% (REYNOLDS, 1963).

3.6.5. Exame das telas e material fotográfico

As telas, contendo os cortes finos de rins com amiloidose, foram examinadas e fotografadas em microscópio eletrônico Zeiss, EM9S-2, usando-se film Agfa-Gevaert (7 x 7). As cópias, com ampliações, foram feitas em papel fotográfico Kodabromide nº 3 ou 4.

3.7. Provas da função renal

3.7.1. Proteinúria

As proteínas urinárias foram dosadas, em duplicatas, através do método de MEULEMANS (informação do laboratório LABTEST *). Os resultados foram expressos em mg de proteína por 100 ml.

* LABTEST S/A - Belo Horizonte - MG.

3.7.2. Proteinemia

As proteínas séricas foram dosadas em duplicata pela reação do Biureto, usando o "Kit" do laboratório WIENER* para proteínas totais. O método é baseado no princípio de que as ligações peptídicas das proteínas, reagem com o ion cuprico em meio alcalino, formando um complexo violeta que é determinado fotométricamente em 540 nm e cuja intensidade é proporcional a concentração proteica total.

O espectro fotômetro usado foi o SPECTRO-NIC 88 (BAUSCH-LOMB) e os resultados foram expressos em g de proteina por 100 ml.

3.7.3. Uréia e creatinina no sôro

Para determinar a uremia, usados o "Kit" para uréia do mesmo laboratório WIENER. O método é baseado no princípio da decomposição específica da uréia pela urease, produzindo dióxido de carbono e amoníaco; este reage com o fenol e hipoclorito em meio básico produzindo azul de indofenol que é determinado fotometricamente em 540 nm. Os resultados foram expressos em mg de uréia por 100 ml de sôro.

A creatinina foi dosada, usando o "Kit" para creatinina do laboratório LABTEST. O método é baseado no princípio de que a creatinina e outros componentes do sôro, reagem com solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de côr vermelha que é medido fotometricamente. A adição de um acidificante, baixa o pH, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a côr derivada dos cro

* WIENER Lab. - Rosário, Sta. Fé - Argentina.

mogênios, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras, fornece o valor da creatinina.

Ambas as leituras são efetuadas em 510 nm. Os resultados foram expressos em mg de creatinina por 100 ml.

3.8. Eletroforese e imunoeletroforese de proteínas

3.8.1. Eletroforese

Foi utilizado o método de eletroforese em lâminas de vidro de 2,5 cm x 9,7 cm, recobertas com gel de agar a 1% (CAWLEY, 1969).

O gerador de tensão foi da marca BOSKAMP PHEROSTAT, mod. 20.

Para migração eletroforética dos sôros, foi aplicada uma corrente constante de 15 mili-Amperes por lâmina, durante 65 minutos. As lâminas foram submetidas a leitura no densitômetro ZEISS e os resultados integrados no mesmo aparelho, para se obter o perfil eletroforético.

A fixação das proteínas na lâmina foi realizada com solução alcoólica acética e coloração com o amido-Black 10 B, usando como diferenciador o ácido acético a 4%.

3.8.2. Imunoeletroforese

Foi utilizado o método de microimunoeletroforese preconizado por SCHEIDEGGER (1955). A cuba de eletroforese empregada foi usada com tampão veronal pH 8.2, 0,05 M. O gerador de tensão, foi o mesmo empregado para a eletroforese.

Para a migração eletroforética, os sôros, diluídos a 1 : 3, foram colocados em 2 poços periféricos, perpendiculares a uma goteira longitudinal, moldados em lâminas de 2,5 x 7,5 cm, recobertas com gel de agar solidificado. Uma corren-

te constante de 15 mA por lâmina, era aplicada durante 65 minutos. Para a fase seguinte de imuno difusão, com duração de 24 horas, colocava-se na goteira longitudinal o antígeno específico.

A seguir as lâminas eram lavadas em solução fisiológica durante 48 horas e colocadas para secar em estufa a 37° C. A coloração seguiu o mesmo procedimento descrito em 3.8.1.

3.9. Animais controles

3.9.1. Animais normais

O estudo da histologia dos órgãos normais de hamster foi efetuado com lâminas constantes do nosso arquivo de material de pesquisa.

3.9.2. Animais inoculados com solução de meio de cultura em salina estéril

Treze hamsters foram inoculados pela via intratesticular com 0,2 ml de solução de meio de cultura, obtida por suspensão em salina estéril, de raspado de meio de cultura.

O material colhido destes animais foi processado e examinado da mesma forma que descrito nos itens 3.4.3., 3.5., 3.5.1., 3.6., 3.7. e 3.8.

4. RESULTADOS

4.1. Generalidades: Grupos 1 e 2

Os animais do Grupo 1, mantiveram-se com bom aspecto até cerca do 70º dia após a inoculação de P.brasiliensis. Depois deste período, vários deles, passaram a apresentar sinais de perda de vitalidade que era caracterizada por eriçamento e perda de brilho da pelagem e diminuição da motilidade.

No período do experimento, apenas 1 animal morreu espontaneamente, aos 137 dias, não tendo sido aproveitado para exame anátomo-patológico por ter sido devorado pelos companheiros de gaiola. Por este motivo o índice de amiloidose renal e a intensidade, relativa aos 140 dias pós-inoculação, foi baseado na análise de um animal.

No mesmo período, foram sacrificados 25 animais dos quais, 7 desenvolveram anasarca (Fig. 1) e 3 apenas apresentavam edema sub-cutâneo.

Na Tabela 2, estão expressos a média e o desvio padrão dos pesos dos animais dos Grupos 1 e 2, assim como a época da pesagem. Na Fig. 2 podemos observar graficamente a evolução dos pesos destes animais, durante o período do experimento.

4.2. Macroscopia dos Rins

Os rins mantiveram-se com aspecto normal até o 70º dia de evolução. Desta época para diante, os rins dos animais sacrificados com edema sub-cutâneo, apresentavam-se com volume, discretamente aumentado, de cor rósea. Os rins dos animais em anasarca, eram moderadamente aumentados de volume, bastante pálidos, (Fig. 3), às vezes com a superfície discretamente granulosa. Aos cortes, mostravam diminutos focos translúcidos na cortical e medular (Fig. 4).

FIG. 2

= 41 =

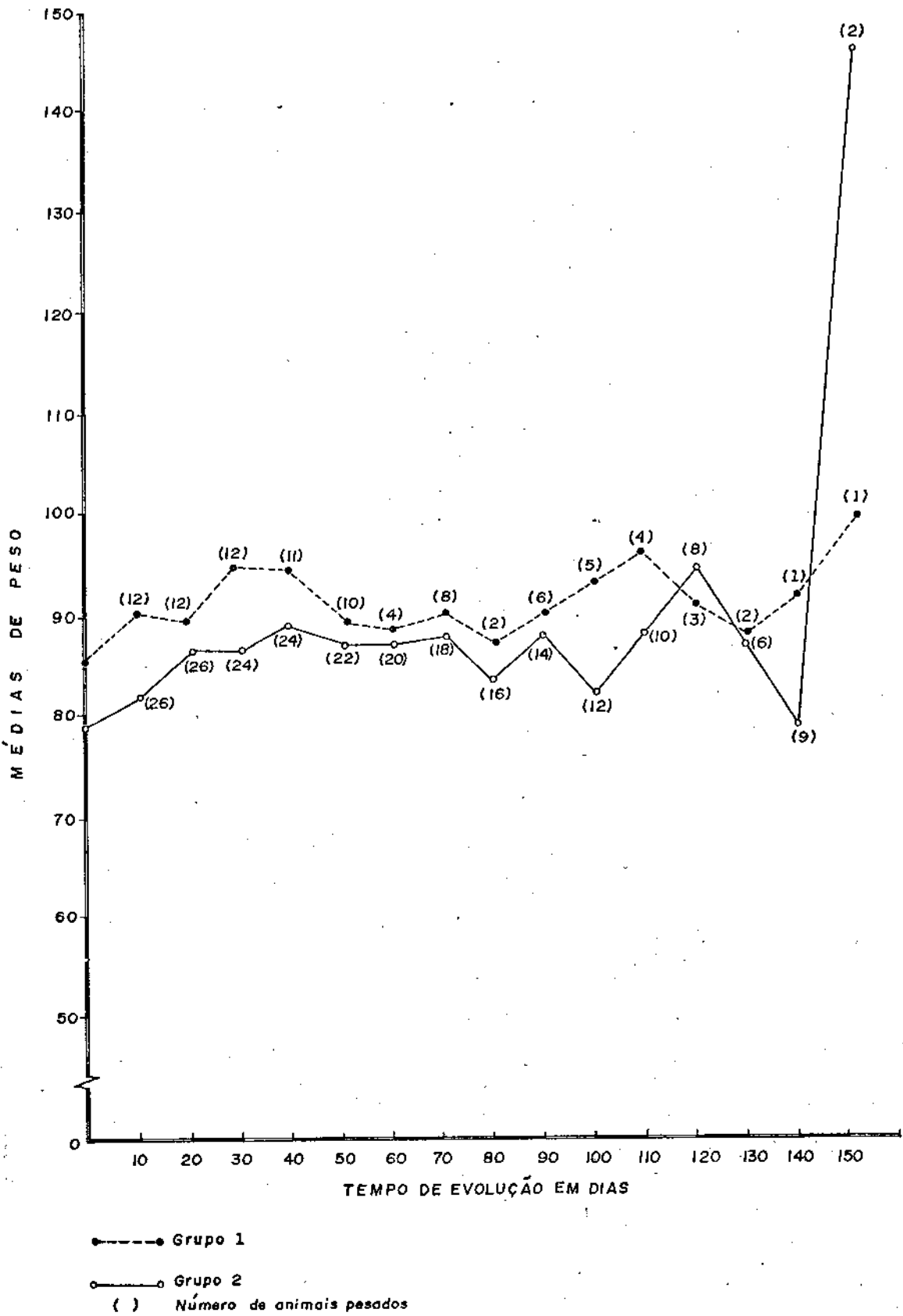


TABELA 2

Médias ($\bar{x}$) e desvios padrões (s) do peso, expresso em gramas, dos animais dos Grupos 1 e 2, durante a evolução do experimento.

Días	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Grupos																
1	$\bar{x}$	79	82	87	86	90	87	88	84	89	82	89	96	88	79	147
	S	$\pm 6,1$	$\pm 6,4$	$\pm 7,1$	$\pm 6,5$	$\pm 7,6$	$\pm 6,5$	$\pm 7,7$	$\pm 6,3$	$\pm 6,0$	$\pm 16,1$	$\pm 17,3$	$\pm 10,0$	$\pm 13,4$	$\pm 17,0$	$\pm 10,6$
	$\bar{x}$	86	91	90	96	95	90	89	91	87	91	94	98	91	89	97
2	S	$\pm 18,2$	$\pm 18,8$	$\pm 17,3$	$\pm 17,3$	$\pm 16,1$	$\pm 9,8$	$\pm 6,8$	$\pm 8,3$	$\pm 7,4$	$\pm 11,0$	$\pm 11,8$	$\pm 14,1$	$\pm 10,3$	$\pm 12,7$	-
																-

Os rins dos animais contrôles, inoculados com solução de meio de cultura em salina estéril, não mostraram alterações, no período do experimento.

4.3. Microscopia Óptica dos Rins

As lesões renais dos hamsters do grupo 1, foram catalogadas em:

a) Hiperplasia de células mesangiais - Representados pelo aumento de celularidade do tufo glomerular, às custas da proliferação das células situadas no eixo glomerular, (Fig. 6 e 7) (comparar com figura 5, glomérulo normal e com a figura 20, glomérulo com amilóidose). Esta proliferação, tornava-se marcada em torno do 40º ao 70º dia após a inoculação. Era representada ou por fileiras de células que se estendiam desde o polo vascular até às alças capilares mais periféricas (Fig. 7) ou por conglomerados formando um arranjo nodular (Fig. 8). Alguns glomérulos mostraram uma celularidade aumentada, sem arranjos específicos.

Em alguns glomérulos havia lobulação do tufo glomerular (Fig. 9), sinequias entre o folheto visceral e parietal (Fig. 10) e, em raros, pode-se observar hiperplasia das células parietal e epitelial da cápsula de Bowman (Figs. 11,12).

b) Amiloidose - Representada por depósitos de amiloide nos glomérulos, interstício tubular e parede vascular.

Os depósitos se iniciavam em torno do 70º dia da inoculação e sempre foram os glomérulos, a estrutura primeiramente atingida.

As lesões iniciais eram representadas por pequenos focos de espessamento hialino (Fig. 13) na região mesangial. A medida que os depósitos progrediam, ou determinavam um espessamento difuso do mesangio (Fig. 14) ou tendiam a assumir

uma forma nodular (Fig. 15). Estes depósitos coravam-se com o Vermelho-Congo alcalino: em rosa, ao M.O., birrefringente esverdeado, sob luz polarizada e vermelho alaranjado, sob luz ultravioleta (Fig. 16); com a Tioflavina-T, adquiriam cor verde-maçã e com o violeta de cristal coravam-se, metacromaticamente, em carmin.

Os depósitos de amiloide, quando intensos, embora localizados na região mesangial, comprimiam a parede do capilar diminuindo a sua luz (Fig. 14).

A membrana basal dos capilares glomerulares, já nos depósitos iniciais, mostrava-se espessada, de cor rósea e aspecto hialino ao H.E. (Fig. 13). A coloração pela prata-urotropina demonstrou que a mesma persiste, junto aos depósitos iniciais e à medida que estes progridem, torna-se aparentemente fragmentada, imersa na massa de amiloide (Fig. 17), quando comparada com a de glomérulo de animal normal (Fig. 18).

Observamos amiloidose glomerular em 13 hamsters, sacrificados entre o 70º e o 151º dias, do inóculo de P.brasiliensis, correspondendo a 84% dos animais sacrificados - neste intervalo de tempo. As figuras 19, 20 e 21, demonstram glomérulos com depósitos extensos de amiloidose. Nelas se observa que a medida que o amiloide se deposita, não mais se nota a hiperplasia celular mesangial (Fig. 20), nos glomérulos mais comprometidos, observa-se aderência quase total do glomérulo à cápsula de Bowman (Fig. 21) ou, em outros casos, notava-se material amorfo no espaço de Bowman (Fig. 19).

O interstício tubular, apresentou em torno do 40º dia, hiperplasia das células intersticiais tubulares (Fig. 22), que normalmente estão em aposição à membrana basal tubular e que nos animais normais, são discretamente visualizadas (Fig. 23).

À medida que os depósitos de amiloide se iniciavam nesta região, o aspecto hiperplásico destas células ia

desaparecendo, sendo comprimidas pela massa de amiloide, (Figs. 24 e 25).

Na Fig. 26 pode ser observada a fluorescência dos depósitos intersticiais de amiloide.

Dos 13 animais que desenvolveram amiloidose renal, em 3 (23%) não havia concordância entre a intensidade dos depósitos no glomérulo e no interstício.

Na parede dos vasos, raramente pode-se observar focos isolados de depósitos de amiloide (Fig. 27). O envolvimento da parede vascular, ocorria mais por uma continuidade com os depósitos intersticiais, sendo mais frequentemente observado naqueles casos onde havia intensa amiloidose no interstício tubular.

O envolvimento vascular, geralmente era dos vasos de pequeno calibre e paredes delgadas. Em nenhum dos animais que apresentaram amiloidose, observamos depósitos na parede de artérias renais de médio ou grande calibre. Quando existiam depósitos nas paredes dos vasos, havia uma perda da estrutura vascular, sendo então difícil identificá-los como artéria ou veia; por este motivo, preferimos a denominação de parede vascular.

O envolvimento vascular por amiloide foi bem caracterizado em apenas 3 hamsters, sacrificados a partir do 102º dia da inoculação.

A quantificação dos depósitos de amilóide, nas estruturas citadas, segundo o número de dias após a inoculação e tomando como média 2 animais, está expressa na Tabela 3.

c) Dilatação tubular contendo cilindros hialinos - Em alguns animais foi observada dilatação tubular, de tamanho variável, geralmente contendo a luz material hialino (Fig. 28). Estes cilindros, coravam-se pelo método do P.A.S. e raras vezes, aparentaram uma coloração semelhante ao amiloide, nos mé-

TABELA 3

Intensidade dos depósitos de amiloide* (média de 2 animais, A e B), nos glomérulos, interstício tubular e arteríolas de 25 hamsters, inoculados com 0,2 ml da suspensão de P. brasiliensis, segundo o número de dias após a inoculação. Índice de amiloidose renal**.

Índice de	NÚMERO DE DIAS APÓS A INOCULAÇÃO															
	29		40		50		61		70		81		90		102	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Amiloidose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glomerular (IAG)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5	0,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Interstício tubular (IAIT)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++	++	+++	+++
Parede Vascular (IAV)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Índice de amiloidose renal (IAR)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	1,0	4,5	5,5	5,5	6,0	7,0

* Avaliados de acordo com os critérios expostos no item 3.5 de MATERIAL E MÉTODOS

** Definido no mesmo item referido acima.

todos para sua identificação. Eram mais frequentes e maiores a medida em que os depósitos de amiloide, no glomérulo, eram mais intensos, como pode ser observado na Tabela 4.

d) Específicas - Representadas por lesões contendo fungos envolvidos por células macrofágicas e neutrófilos (Fig. 29) ou em lesões granulomatosas. Estas lesões foram observadas em 4 animais sacrificados a partir do 29º dia da inoculação e eram geralmente de localização intersticial.

e) Inespecíficas - Representadas por pequenos focos isolados de infiltrado linfocitário, contendo macrófagos e às vezes neutrófilos (Fig. 30) ou por granulomas isolados, sem células gigantes ou fungos. Estas lesões eram normalmente localizadas no interstício tubular, associadas a destruição tubular, focal e discreta.

Foram observados em hamsters, sacrificados à partir do 29º dia da inoculação.

Os hamsters do grupo 2, não apresentaram nenhuma das lesões descritas para o grupo 1.

A síntese e a quantificação dos achados de microscopia óptica dos hamsters do Grupo 1, estão expostas na Tabela 4.

4.4. Microscopia Eletrônica dos Rins

Pelas colorações à microscopia óptica, já sabíamos com antecedência que os rins a serem observados à microscopia eletrônica, apresentavam amiloidose.

O estudo ao M.E., teve por finalidade, documentar a substância amiloide, bem como observar o seu padrão de distribuição dentro do glomérulo, afim de compará-lo com os dados de literatura, obtidos em animais experimentais com outros agentes indutores.

TABELA 4

Intensidade das alterações renais, observadas nos hamsters do Grupo 1, segundo o número de dias após a inoculação de 0,2 ml de suspensão de P.brasilienensis.

Nº de dias após inoculação	Hamsters	Hiperplasia de células mesangiais	A M I L O I D O S E			Cilindros na luz tubular	LESÕES RENAIS	
			Glomerular	Interstício tubular	Parede vascular		Específicas	Inespecíficas
29	A	-	-	-	-	-	+	-
	B	-	-	-	-	-	-	+
40	A	-	-	-	-	-	-	+
	B	+	-	-	-	-	-	-
50	A	++	-	-	-	-	-	+
	B	+++	-	-	-	-	-	-
61	A	+	-	-	-	-	-	+
	B	+	-	-	-	-	-	+
70	A	++	+	-	-	-	-	+
	B	-	-	-	-	-	-	-
81	A	++	+	+	-	+	-	-
	B	+	-	-	-	-	-	-
90	A	-	++	++	-	+	-	-
	B	-	+++	++	-	++	-	-
102	A	-	++	++	-	-	-	+
	B	-	+++	+++	+	+++	-	++
110	A	++	-	-	-	-	-	+
	B	-	-	-	-	-	-	+
123	A	-	++	++	-	++	-	+
	B	-	+++	+++	-	++	-	+
130	A	+++	+	+	-	+	++	+
	B	-	+++	++	-	++	+	-
140	A	-	+++	+++	-	+++	++	-
	B	-	+++	+++	+	+++	-	+
151	A	-	+++	+++	+	+++	-	+
	B	-	+++	+++	+	+++	-	+

- ausente + pouca ++ moderada +++ muita

Ultraestruturalmente, pudemos observar que o amiloide mostrou-se característico. Era constituído por aglomerados de fibrilas, dispostas desordenadamente (Fig. 31). Nos casos onde havia, ao M.O., depósitos iniciais, à M.E. observava-se aglomerados restritos principalmente à região mesangial estendendo-se para a membrana basal glomerular. Esta com frequência, mostrava-se volumosa, às custas de fibrilas de amiloide na sua espessura (Figs. 32 e 33), outras vezes, quando os depósitos eram extensos, ou se perdiam, ou ainda com dificuldade podiam ser identificados, em meio à massa de amiloide (Fig. 34). Um aspecto interessante observado na membrana basal glomerular, foram pequenos espessamentos nodulares, na face epitelial, isto é, voltados para os espaços urinários, permanecendo a face endotelial com características normais (Fig. 32). Em meio à massa de amiloide, podiam ser vistos restos de processos podálicos das células epiteliais (Fig. 31). Pudemos observar também fibrilas de amiloide, entre a face endotelial da membrana basal glomerular e a membrana citoplasmática da célula endotelial (Fig. 35).

Não observamos amiloide nos espaços urinários ou na luz de capilares glomerulares.

Com relação ao interstício, a substância amiloide mostrou-se com característica semelhantes à descrita para os glomérulos. Havia depósitos nas proximidades das células intersticiais, envolvendo fibras colágenas autoctones (Fig. 36). As células tubulares eram íntegras. No material examinado não observamos amiloide na luz tubular.

Os rins dos animais contrôles, submetidos ao M.E., não mostraram alterações.

4.5. Provas de Função Renal

4.5.1. Dosagens de proteínas no soro

As médias e os desvios padrões da proteinemia e das frações proteicas, determinadas em 3 hamsters, do Grupo 3, aos 30 e 60 dias e com edema, após a inoculação com 0,2 ml de suspensão de P.brasiliensis e em 10 hamsters do Grupo 4, aos 0, 30, e 60 dias após a inoculação com 0,2 ml de solução de meio de cultura, encontram-se especificados nas Tabelas 5 e 6 respectivamente.

TABELA 5

Médias ($\bar{x}$) e desvio padrão (S) da proteinemia e frações proteicas de sôros, expressos em g%, de 3 hamsters, do grupo 3, aos 30 e 60 dias e com edema, após a inoculação com 0,2 ml de suspensão de P.brasiliensis.

Mo- mentos	Protei- nas	Albu- mina	Globulinas					Protei- nemia
			α_1	α_2	β_1	β_2	γ	
30		$\bar{x}$ 3,3	0,9	0,2	0,1	0,7	0,5	5,9
		S $\pm 0,7$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,2$	$\pm 0,2$	$\pm 0,7$
60		$\bar{x}$ 3,2	1,0	0,2	0,2	0,6	0,5	5,5
		S $\pm 0,4$	$\pm 0,3$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$
EDEMA		$\bar{x}$ 1,1	1,6	0,2	0,1	0,2	0,1	3,4
		S $\pm 0,4$	$\pm 0,7$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,2$

TABELA 6

Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (S) da proteinemia e frações proteicas, expressas em g%, de sôros de 10 hamsters do Grupo 4, aos 0, 30 e 60 dias após a inoculação com 0,2 ml de solução de meio de cultura.

Mo- mentos	Protei- nas	Albu- mina	Globulinas					Protei- nemias
			α_1	α_2	β_1	β_2	γ	
0	$\bar{x}$	4,0	1,0	0,2	0,3	1,0	0,3	6,7
	S	$\pm 0,6$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,1$	$\pm 0,3$
30	$\bar{x}$	3,2	0,8	0,2	0,1	0,5	0,4	5,4
	S	$\pm 0,2$	$\pm 0,2$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,6$
60	$\bar{x}$	3,7	0,7	0,2	0,1	0,5	0,2	5,3
	S	$\pm 0,5$	$\pm 0,3$	$\pm 0,2$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$

4.5.2. Dosagens de proteínas na urina

As médias e os desvios padrões da proteinúria de 48 horas e das frações proteicas, determinadas em 3 hamsters do Grupo 3, aos 30 e 60 dias e com edema, após a inoculação com 0,2 ml de suspensão de P.brasiliensis e em 10 hamsters do Grupo 4, aos 0, 30 e 60 dias após a inoculação com 0,2 ml de solução de meio de cultura, encontram-se especificados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

TABELA 7

Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) da proteinúria de 48 horas e frações proteicas, expressas em mg% determinadas na urina de 3 hamsters, do Grupo 3, aos 30 e 60 dias e com edema, após a inoculação com 0,2 ml de suspensão de P.brasiliensis.

Mo- mentos	Protei- nas	Albu- mina	Globulinas			Protei- nuria
			$\alpha_1 + \alpha_2$	$\beta_1 + \beta_2$	γ	
30	$\bar{x}$	69,0	92,0	69,0	0,0	72,0
	s	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 42,3$
60	$\bar{x}$	59,5	66,3	42,5	1,7	51,0
	s	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 58,6$
EDEMA	$\bar{x}$	2564,1	1220,9	1343,2	670,4	4350,0
	s	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 2050,6$

TABELA 8

Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) da proteinúria de 48 horas e frações proteicas da urina, expressas em mg% de 10 hamsters, aos 0, 30 e 60 dias após a inoculação com 0,2 ml de solução de meio de cultura.

Mo- mentos	Protei- nas	Albu- mina	Globulinas			Protei- nuria
			$\alpha_1 + \alpha_2$	$\beta_1 + \beta_2$	γ	
0	$\bar{x}$	93,6	67,6	83,2	15,6	23,0
	s	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 19,6$
30	$\bar{x}$	96,4	69,3	79,2	17,4	207,0
	s	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 40,1$
60	$\bar{x}$	90,8	70,9	85,1	13,7	235,0
	s	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 96,2$

4.5.3. Ureia e Creatinina no Soro

As médias e o desvio padrão da ureia e creatinina, determinadas no soro de 3 hamsters do Grupo 3, aos 30 e 60 dias e com edema e no soro de 10 hamsters do Grupo 3, aos 0, 30 e 60 dias, estão expressas nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

TABELA 9

Médias ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) de ureia e creatinina determinados nos sôros, expressos em mg%, de 3 hamsters do Grupo 3, aos 30 e 60 dias e com edema, após a inoculação com 0,2 ml de suspensão de P.brasiliensis.

Momentos Metabolitos		30	60	EDEMA
UREIA	$\bar{x}$	41,0	71,0	91,0
	s	$\pm 5,0$	$\pm 18,3$	$\pm 7,0$
CREATININA	$\bar{x}$	0,7	0,5	0,6
	s	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$

TABELA 10

Médias ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) de ureia e creatinina determinados nos soros, expressos em mg% de 10 hamsters do Grupo 4, aos 0, 30 e 60 dias após a inoculação com 0,2 ml de solução de meio de cultura em sali na estéril.

Momentos Metabolitos		0	30	60
UREIA	$\bar{x}$	65,0	46,0	57,0
	s	$\pm 7,2$	$\pm 10,4$	$\pm 5,2$
CREATININA	$\bar{x}$	0,8	0,6	0,5
	s	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$

4.6. Eletroforese

4.6.1. Proteínas séricas

Os resultados da eletroforese do sôro dos animais do Grupo 3, quando comparados com os dos animais do Grupo 4, mostraram que até o 60º dia, após a inoculação, existe um aumento progressivo de gamaglobulinas e que numa fase posterior, com o edemaciamento do animal, há uma elevação de alfa globulinas, principalmente alfa 2 globulina, enquanto que a albumina de cai consideravelmente.

O padrão da eletroforese e do perfil eletroforético das proteínas do sôro dos hamsters edemaciados e de hamsters normais são mostrados nas Figs. 37 e 38, respectivamente.

4.6.2. Proteínas urinárias

Como observado na Tabela 7, os hamsters edemaciados desenvolvem grave proteinúria.

Os resultados da eletroforese da urina, dos animais do Grupo 3, quando comparados com os dos animais do Grupo 4, mostraram que até o 60º dia após a inoculação de P.brasiliensis, as alterações urinárias são discretas. Quando os animais edemaciam a eletroforese mostra que a proteinúria é constituída, com predominância, de albumina, encontrando-se também todas as frações de imunoglobulinas.

4.7. Imunoeletroforese

4.7.1. Proteínas séricas

A imunoeletroforese dos sôros, dos animais edemaciados, corroboraram os dados eletroforéticos, mostrando uma diminuição de imunoglobulinas (Fig. 39) e dentre elas, especificamente, imunoglobulinas G (Fig. 40). Este método, mostrou também que existe uma diminuição da fração C_3 do complemento (Fig. 41).

4.7.2. Proteínas urinárias.

Para as mesmas proteínas, a eletroforese da urina, demonstrou a presença de imunoglobulinas, destas, especificamente IgG, além da fração C_3 do complemento.

4.8. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRAFICA

Fig. 1 - Hamster apresentando edema generalizado.

Fig. 3 - Rins.-Comparação do aspecto macroscópico dos rins de hamster normal (acima) e com amiloidose (em baixo).

Fig. 4 - Rim.-Superfície de corte de um rim de hamster com amiloidose; a cortical mostra-se espessada e pálida; existem fócos translúcidos melhor visíveis na medular.

Fig. 5 - Rim - Glomérulo normal. (HE - 500x).

Fig. 6 - Rim - Hiperplasia de células mesangiais. (HE - 200x).

Fig. 7 - Rim - Hiperplasia de células mesangiais, axial. (HE - 500x).



FIG . 1

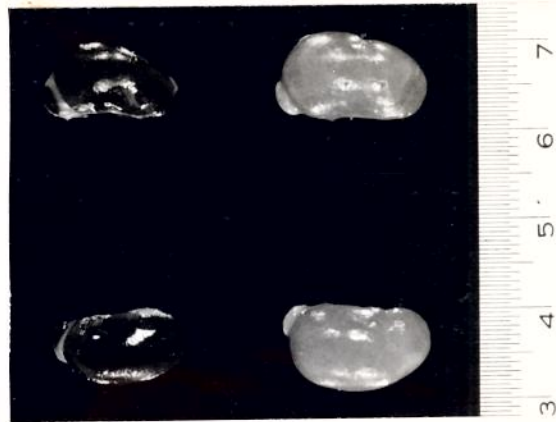


FIG . 3

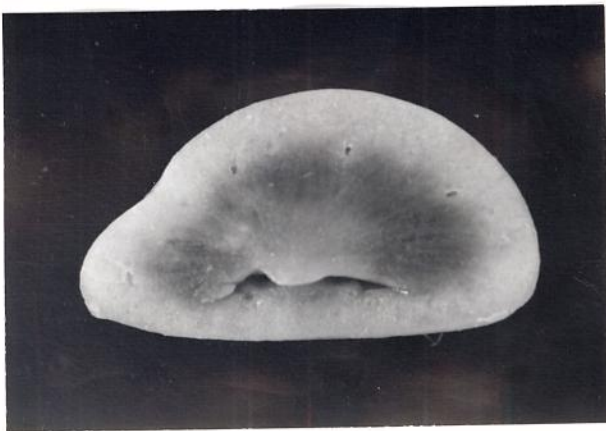


FIG . 4

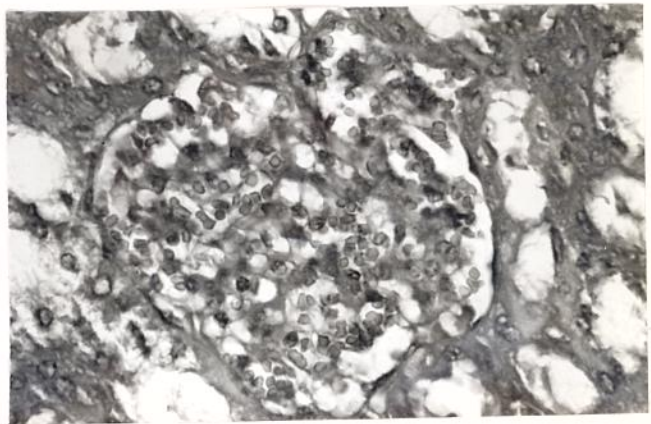


FIG . 5

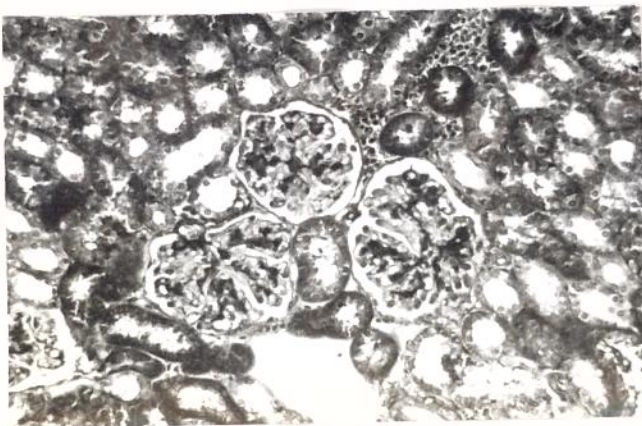


FIG . 6

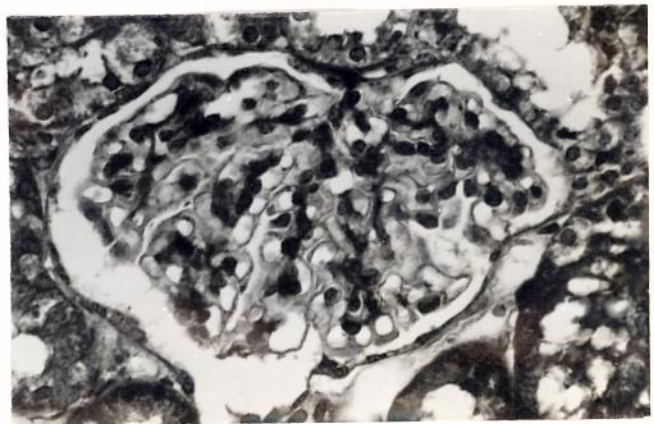


FIG . 7

Fig. 8 - Rim - Hiperplasia de células mesangiais, difusa. (HE - 500x).

Fig. 9 - Rim - Hiperplasia de células mesangiais, difusa com acentuação da lobulação do tufo glomerular. (HE - 500x).

Fig.10 - Rim - Hiperplasia de células mesangiais, difusa; sinequia do tufo glomerular com a cápsula de Bowman. (HE - 500x).

Fig.11 - Rim - Depósito de amiloidose em glomérulo com lobulação evidente; notar sinequia de lóbulo com a cápsula de Bowman e a hiperplasia de células do folheto parietal da cápsula de Bowman. (HE - 500x).

Fig.12 - Rim - Correspondendo ao segmento mais inferior do glomérulo, existem 3 células epiteliais com núcleos volumosos e irregulares. (HE - 500x).

Fig.13 - Rim - Depósito de amiloide difuso no me-sangio, acentuando a lobulação; notar aumento do glomérulo e sinequias.

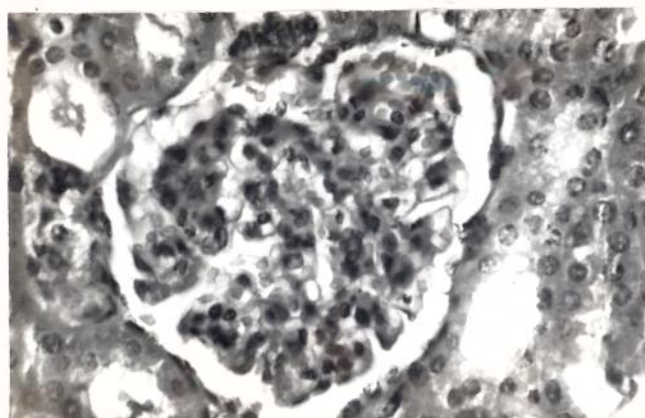


FIG . 8

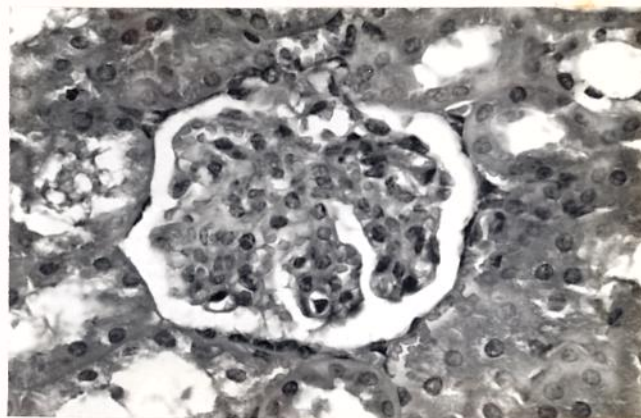


FIG . 9

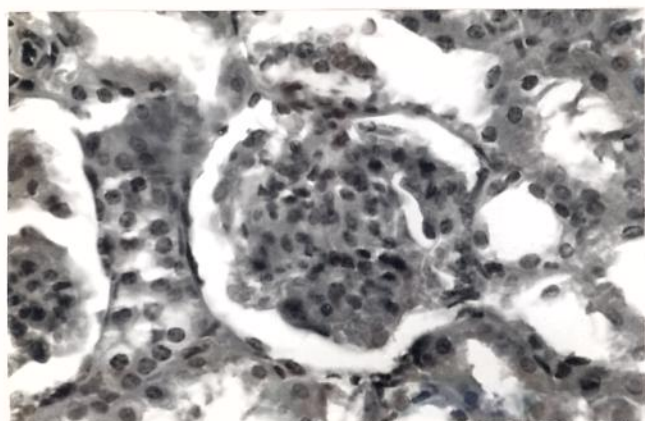


FIG . 10

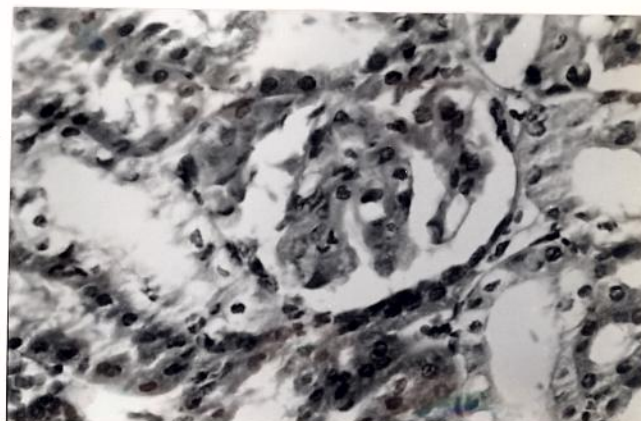


FIG . 11

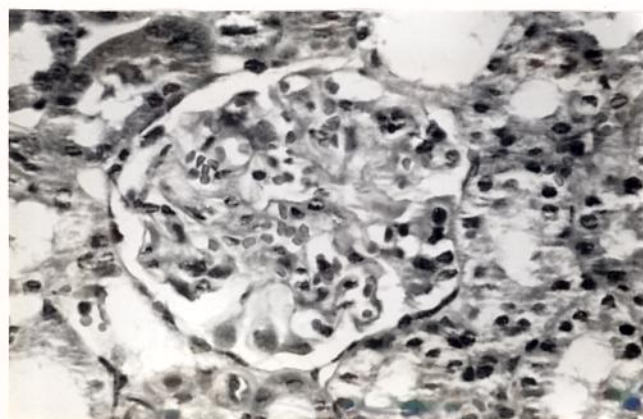


FIG . 12



FIG . 13

Fig. 14 - Rim - Glomérulo apresentando extensos depósitos mesangiais de amiloide; notar a pobreza celular e no segmento inferior direito, alça capilar com parede espessada. (HE - 500x).

Fig. 15 - Rim - Glomérulo muito aumentado, poucas células com numerosos focos de depósitos nodular de amiloide; diminuição acentuada do espaço de Bowman. (HE-500x)

Fig. 16 - Rim - Glomérulo com amiloidose. Notar a fluorescência positiva ao longo do mesangio, envolvendo as alças capilares (vermelho-congo alcalino - luz ultravioleta - 500x).

Fig. 17 - Rim - Glomérulo com amiloidose, mostrando numerosos pontos em que a membrana basal se mostra interrompida. (prata-metanamina - 500x).

Fig. 18 - Rim - Glomérulo normal onde se observa continuidade da membrana basal (prata - metanamina - 500x).

Fig. 19 - Rim - Glomérulo com amiloidose; notar material amorfo (proteína) no espaço de Bowman. (HE - 500x).

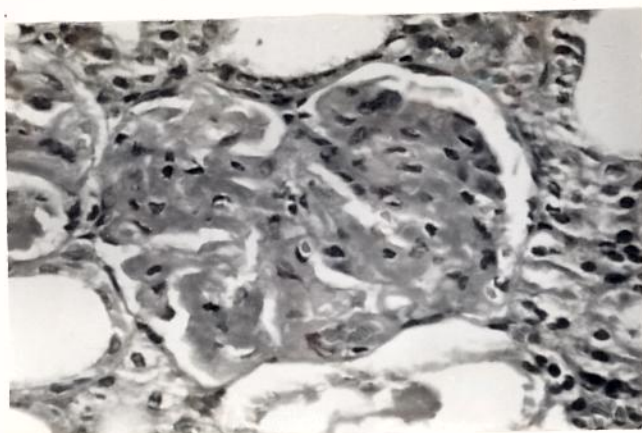


FIG . 14

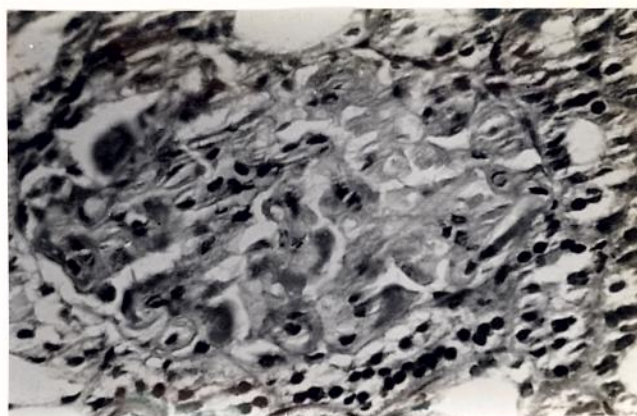


FIG . 15

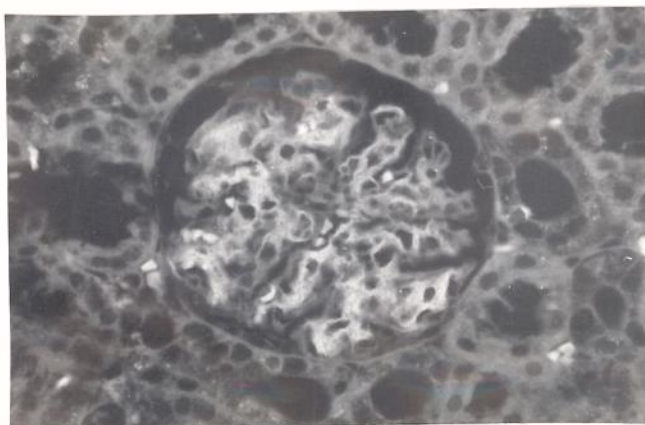


FIG . 16

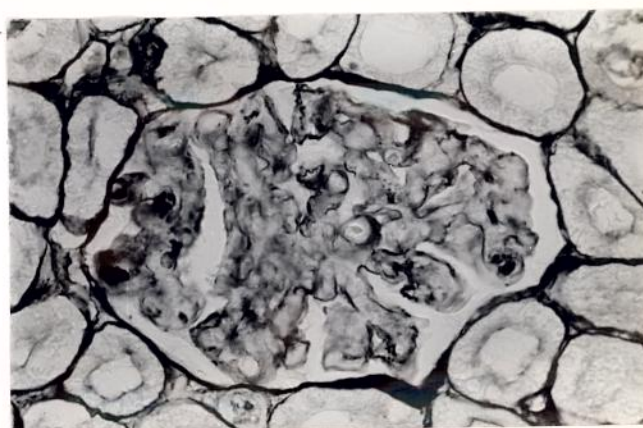


FIG . 17

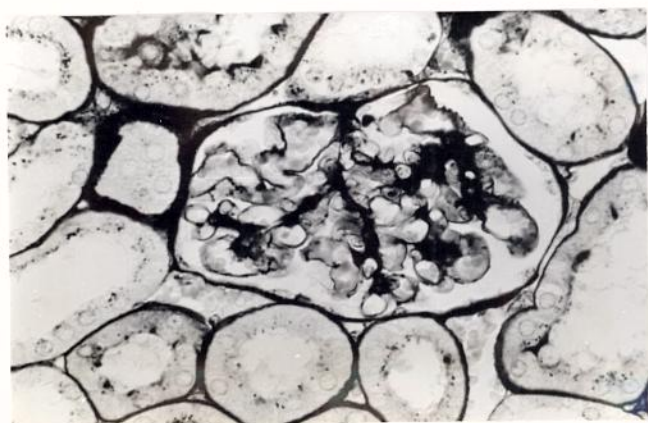


FIG . 18

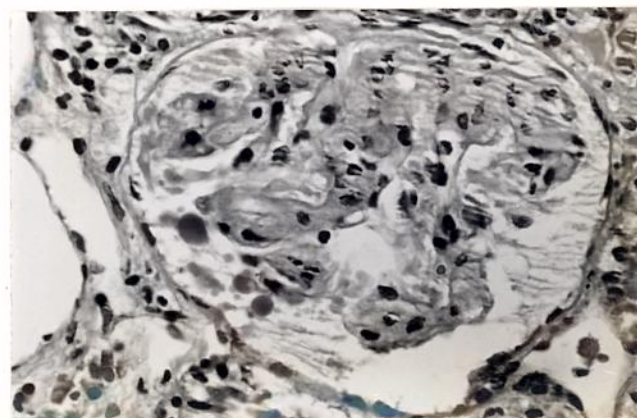


FIG . 19

Fig. 20 - Rim - Amiloidose depositada no mesangio; chama a atenção a pobreza de células mesangiais; notar o aumento de volume do glomérulo. (HE - 500x).

Fig. 21 - Rim - Grandes massas de amiloide, espasando o mesangio; aderência quase total do glomérulo à cápsula de Bowman.

Fig. 22 - Rim - (Medular) - Notar a hiperplasia de células intersticiais fusiformes (HE - 500x).

Fig. 23 - Rim - (Medular) - Contrôile; notar a pobreza em células intersticiais fusiformes.

Fig. 24 - Rim - (Medular) - Abundante depósito de amiloide no interstício (HE - 200x).

Fig. 25 - Rim - (Cortical) - Depósito de amiloide, peritubular (vermelho-congo alcalino - 500x).

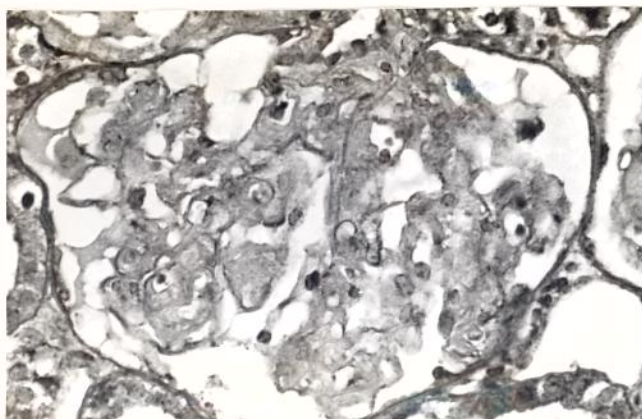


FIG . 20

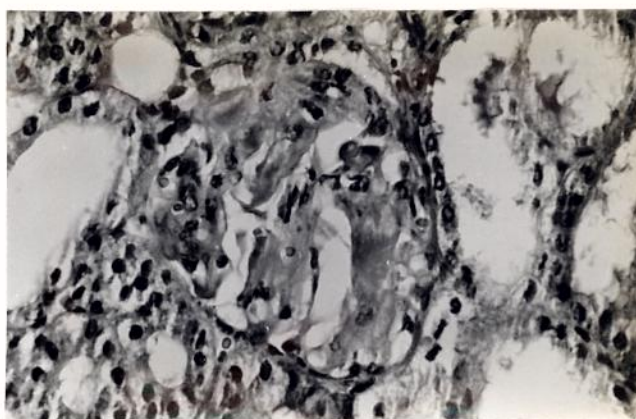


FIG . 21

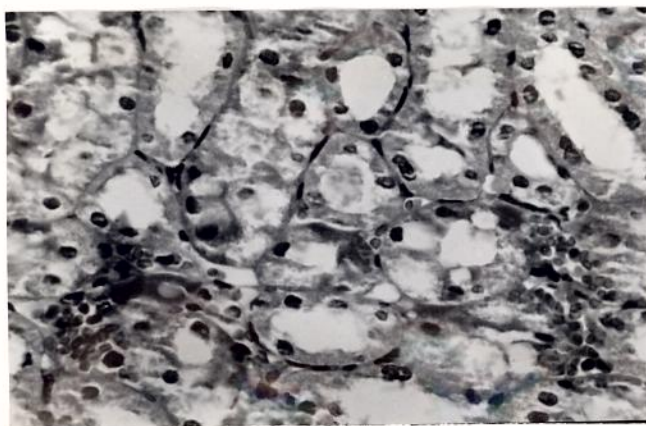


FIG . 22

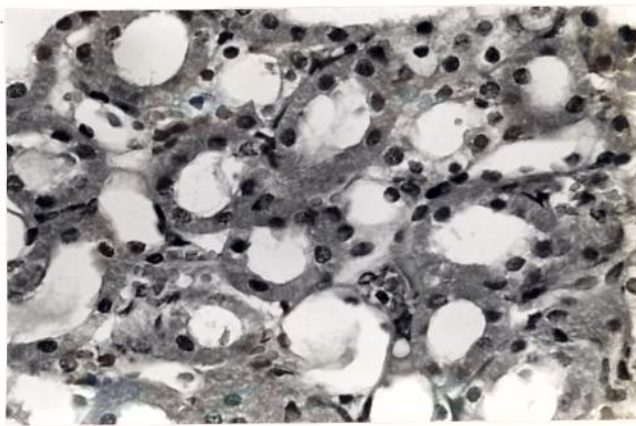


FIG . 23

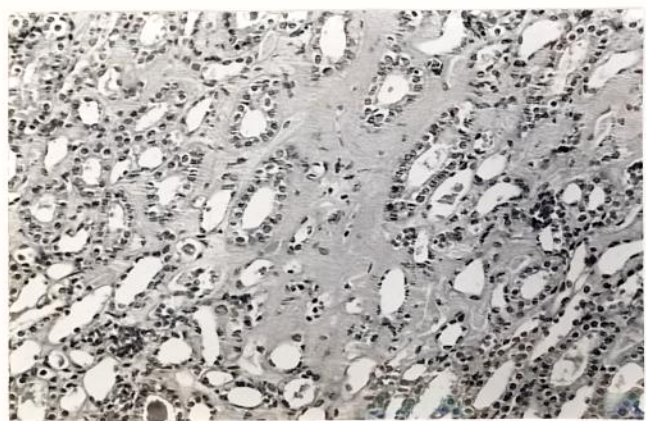


FIG . 24

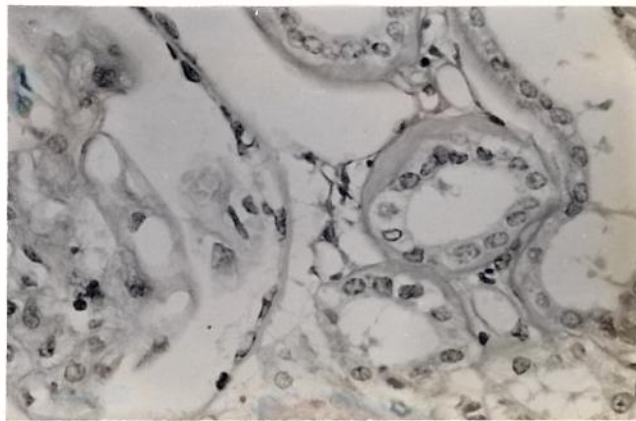


FIG . 25

Fig. 26 - Rim - (Interstício tubular) depósito
fluorescente de substância amiloide
(vermelho-congo alcalino - luz ultra-
violeta - 500x).

Fig. 27 - Rim - Amiloidose; depósito de substân-
cia amiloide nos glomérulos e na parede
de um vaso.

Fig. 28 - Rim - Amiloidose; notar dilatação tubu-
lar e presença de cilindros hialinos
(HE - 78x).

Fig. 29 - Rim - Fóco nodular intersticial conten-
do P. brasiliensis envolvido por macró-
fagos (HE - 500x).

Fig. 30 - Rim - Infiltrado inflamatório crônico
no interstício. (HE - 200x).

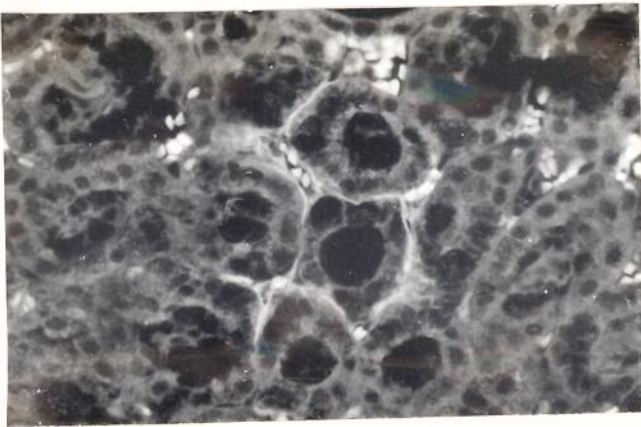


FIG . 26

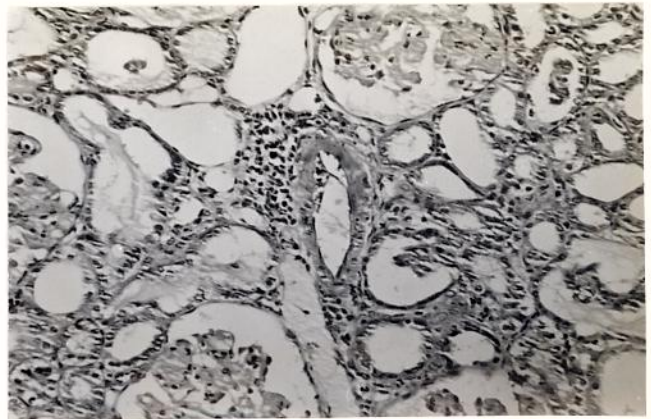


FIG . 27

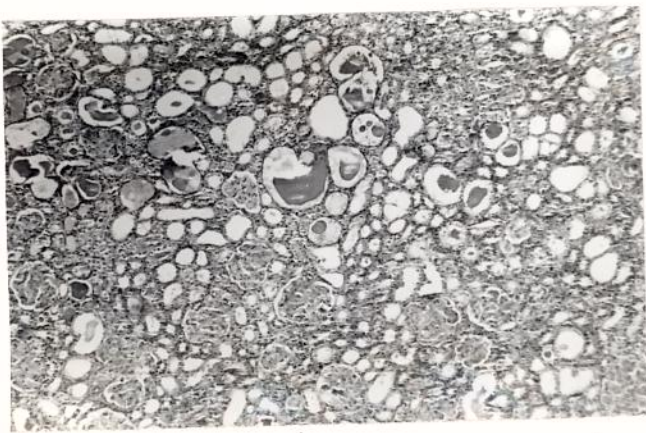


FIG . 28

FIG . 29

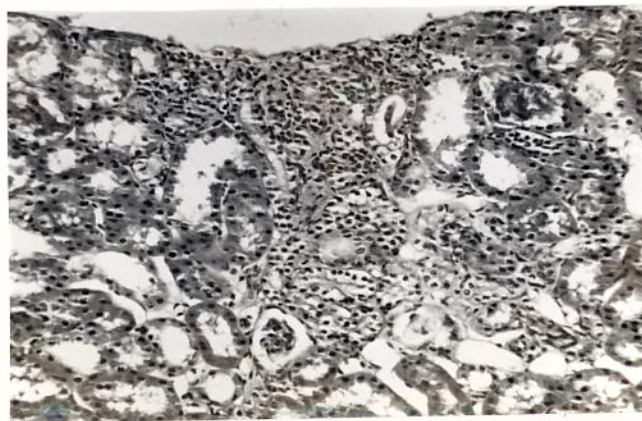


FIG . 30

Fig. 31 - Rim - Amiloidose. Fibrilas de amiloide (A) caoticamente dispostas. Observa-se fragmento de processo podálico de célula epitelial (seta) envolvido pela massa de amiloide (25.700x).

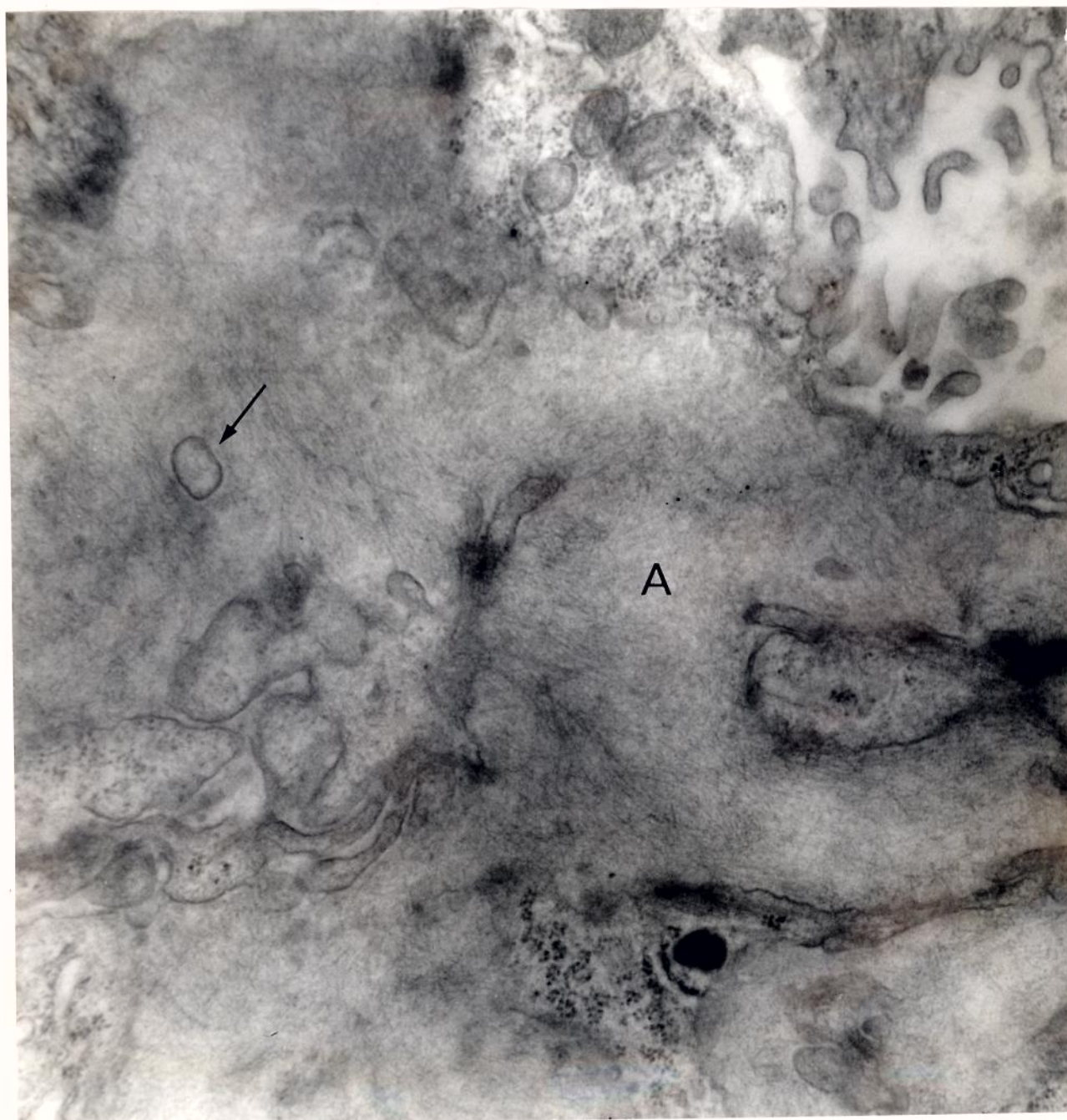


FIG. 31

Fig. 32 - Rim - Acúmulo de amilóide na região mesangial (M). Observa-se espessamentos nodulares (seta), na face epitelial da membrana basal glomerular (MB); (5.000x).

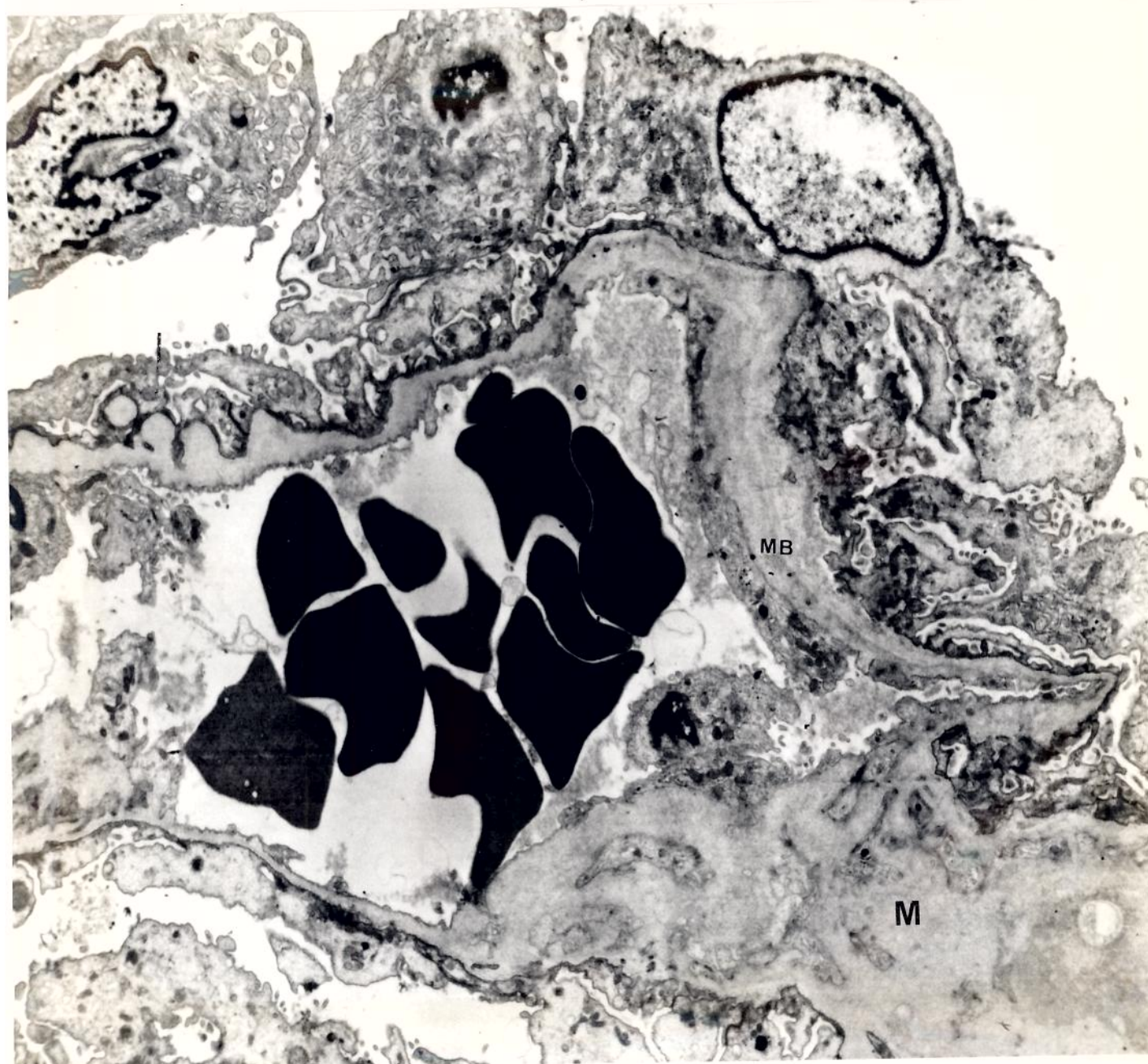


FIG. 32

Fig. 33 - Rim. Detalhe da figura anterior, mostrando fibrilas de amiloide na espessura da membrana basal glomerular (MB) (17.600x).

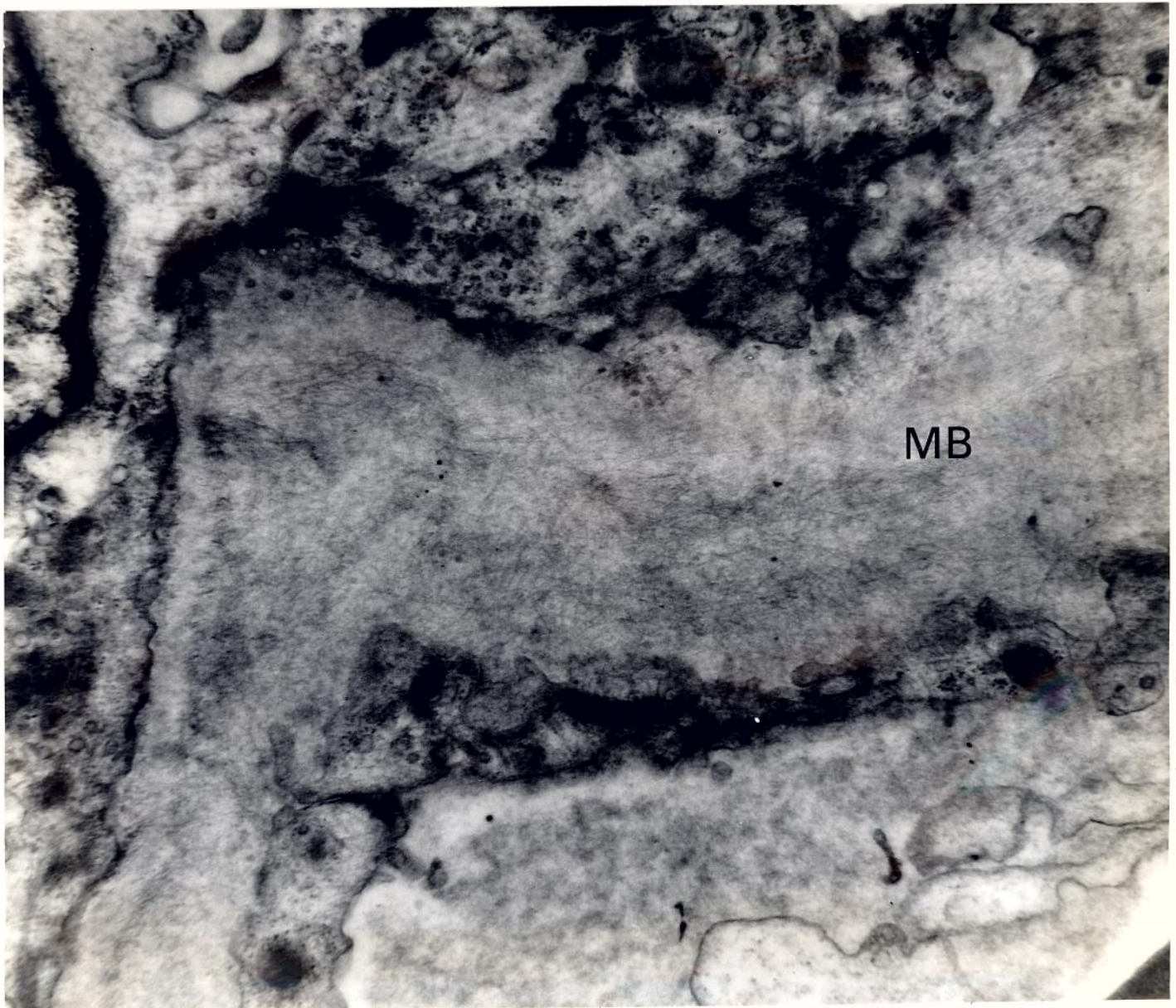


FIG. 33

Fig. 34 - Rim - Membrana basal glomerular com
espessamento nodular, (seta) envol-
vida por massa de amiloide (A)
(13.500x).

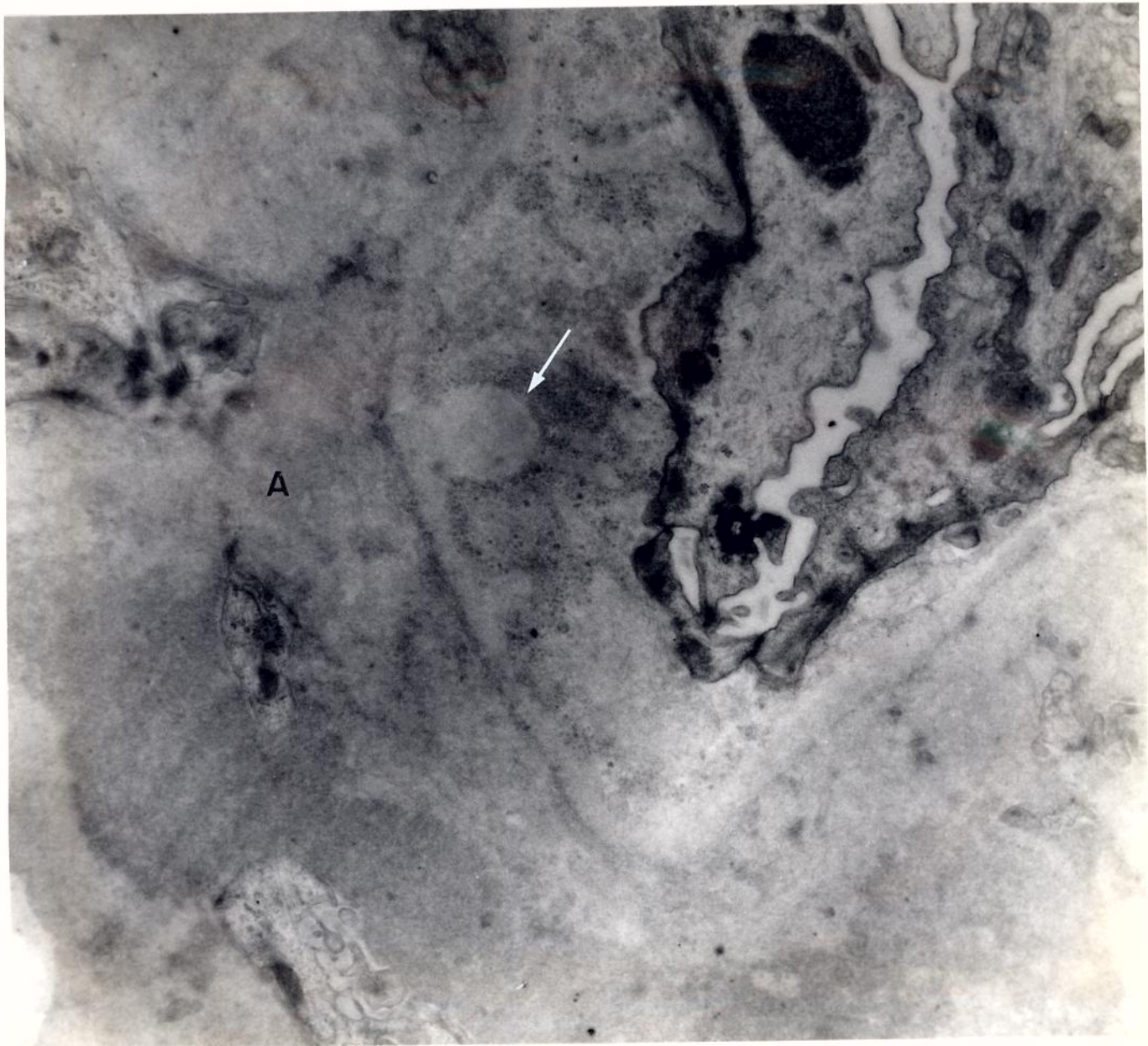


FIG. 34

Fig. 35 - Rim - Fibrilas de amiloide (A) na es
pessura da membrana basal glomerular
e entre esta e a membrana citoplasmá
tica de célula endotelial (setas)
(25.700x).

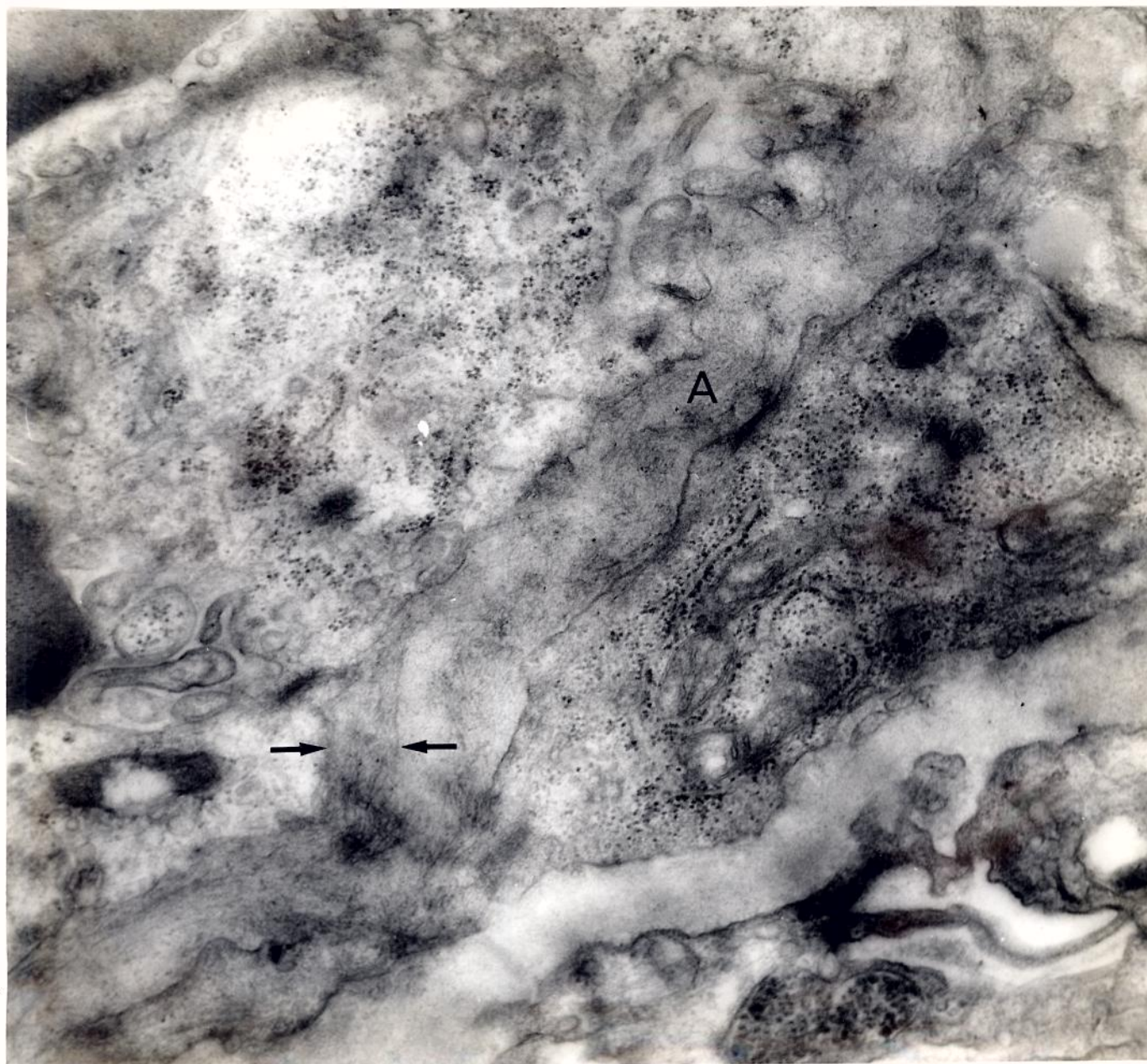


FIG. 35

Fig. 36 - Rim - Interstício tubular com amilói
de (A) envolvendo fibras colágenas
(seta). (13.500x).



FIG. 36

Fig. 37 - Padrão da eletroforese e do perfil eletroforético das proteínas do sôro observado nos animais edemaceados.

Fig. 38 - Padrão da eletroforese e do perfil eletroforético das proteínas do sôro observado nos animais do grupo controle.

L - 626

Albumina	- 30
Alfa-1	- 55
Alfa-2	- 4
Beta-2	- 7
Gama	- 4
TOTAL	100%

PROT.Total(g/100 ml): 3,7

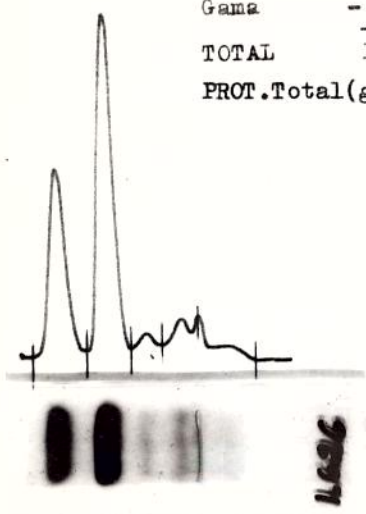


FIG . 37

L - 635

Albumina	- 58
Alfa-1	- 18
Alfa-2	- 3
Beta-1	- 2
Beta-2	- 12
Gama	- 7
TOTAL	100%

PROT.Total(g/100 ml): 5,3

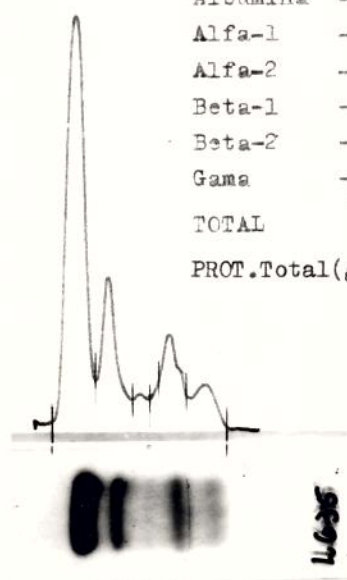


FIG . 38

Fig. 39 - Comparação entre a imunoeletroforese de um sôro normal e de um sôro de animal e demaceado, contra anti-gamaglobulina tal de Hamster.

Fig. 40 - Comparação entre a imunoeletroforese de um sôro normal e de um sôro de animal edemaceado, contra imunoglobulina G de Hamster.

Fig. 41 - Comparação entre a imunoeletroforese de um sôro normal e de um sôro de animal e demaceado, contra fração C_3 do complemento.

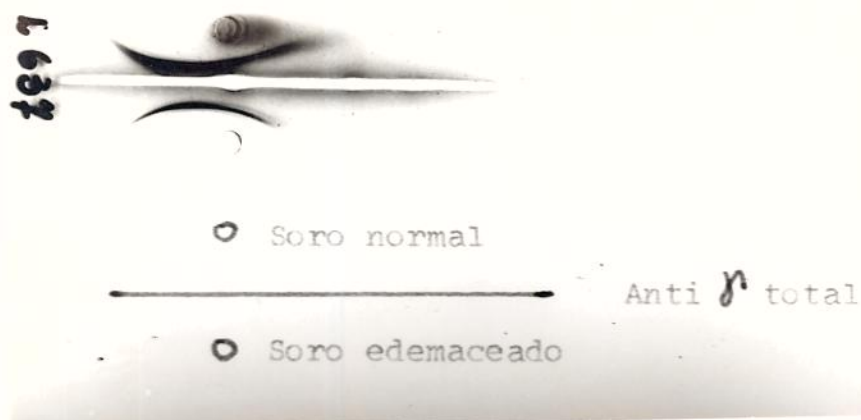


FIG . 39

FIG. 40

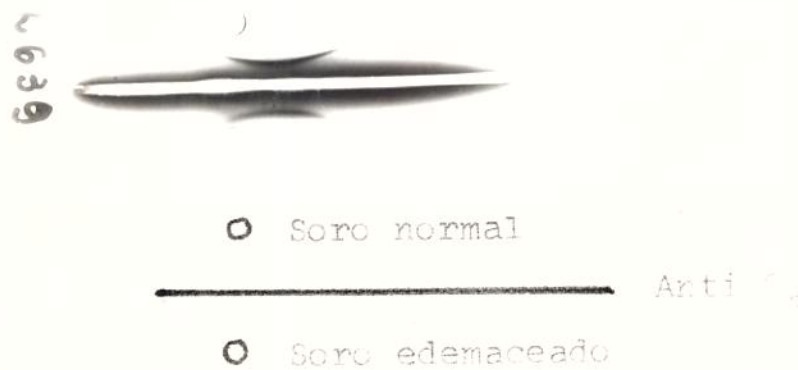


FIG . 41

5. COMENTÁRIOS

A descoberta da grande susceptibilidade do hamster a uma série de agentes infecciosos, determinou o seu uso como o modelo experimental de várias moléstias infecciosas.

Foi IABUKI (1973) quem primeiro chamou a atenção para o desenvolvimento de amiloidose no hamster, induzida pelo P. brasiliensis, quando estudou este animal, como modelo experimental para a Blastomicose sul-americana.

Em comparação com a Leishmania donovani, que é o agente indutor mais comumente empregado para a produção de amiloide no hamster, no P. brasiliensis, por nós usado, notamos que para o aparecimento dos primeiros depósitos no rim, à M. O., o tempo decorrente após inoculação é maior. Este dado vem de encontro à idéia de que a intensidade do estímulo é um fator importante para o aparecimento de amiloidose. Outro dado que vem corroborar esta afirmação foi o fato de que usando 2 cepas de P. brasiliensis, com antigenicidade diferente pudemos notar que o tempo de aparecimento de amiloidose renal não foi concordante. Enquanto que a com a cepa 18, os hamsters, levaram cêrca de 70 dias para edemaciar, com a cepa 192, levaram cêrca de 200 dias. Também, SALFELDER e col., (1968) notaram diferenças na doença experimental em hamsters inoculados com amostras diferentes de P. brasiliensis. A antigenicidade das cepas é importante para se conseguir um tempo de indução de amiloidose menor. Este é um dado fundamental quando se quer trabalhar com Blastomicose sul-americana experimental (FAVA NETTO, C.: informação pessoal).

Para KENNEDY (1962) a leishmanióse visceral em hamster, constitui o melhor e mais fácil meio de indução de amiloidose em animais de laboratório. No entanto, não tem sido este o modelo preferido pela maioria dos autores que a estudam, sendo a indução pela caseína, em ratos, o modelo mais utilizado.

Os dados macroscópicos do rim dos hamsters com amiloidose, não fugiram daqueles descritos na literatura. Alguns autores têm relatado o encontro de trombose de veia renal na vigência de amiloidose. Experimentalmente, ZOLTOWSKA e WRZOL-KOWA (1973), trabalhando com hamsters e vacina tríplice relatam o aparecimento de trombozes da veia renal em 2 hamsters que desenvolveram amiloidose e síndrome nefrótica, sem no entanto concluir sobre sua patogênia.

Evidências clínicas e experimentais sugerem que os mecanismos de coagulação são importantes na história natural de certas doenças glomerulares (VASSALI e col., 1963). Assim, as trombozes de veia renal podem ser encontradas também na amiloidose glomerular na companhia de síndrome nefrótica (S.N.). A verdade é que não se sabe ao certo se a S.N. leva a trombose ou se pacientes com S.N. são mais propensos a desenvolverem trombose da veia renal (HEPTINSTALL, 1974).

Observando o gráfico do peso médio dos animais do grupo 1, observamos que o peso médio dos animais aumentam até o 40º dia, provavelmente pelo fato de termos inoculados hamsters ainda jovens, em fase de crescimento. Houve concordância deste grupo com os animais contrôles. Do 40º ao 80º dia, os animais de ambos os grupos perderam peso, por alguma razão que nos escapou à observação. Este fato se repetia com o grupo controle aos 110º e 130º dias, enquanto que os pesos médios do grupo 1, aumentaram consideravelmente dos 100 aos 120 dias para cair em torno dos 140º e novamente subir aos 150º dias. A oscilação observada no grupo 1, a partir do 100º dia foi em decorrência do aparecimento de hamsters edemaciados que faziam aumentar bastante a média do grupo ou decair quando eram sacrificados; este fato é visível ao se observar o gráfico aos 140º e 150º dias na curva dos animais do grupo 1.

Quando submetido a um estímulo antigênico, todo o SRE do organismo, tende a se hiperplasiar. As células mesangiais, representante do SRE no rim não fogem à regra. Estas células foram descritas por ZIMMERMANN (APUD SUZUKI e col., 1963) que no entanto, não teve seu trabalho prontamente aceito pelos pesquisadores. Com os trabalhos posteriores de M. E., hoje os autores são concordes quanto à sua existência. Em nosso material pudemos observar existir nas fases que precedem a deposição de amiloide, uma intensa hiperplasia das células mesangiais, bem como, das células do interstício tubular. Este dado está de acordo com o trabalho de DUARTE (1975) que demonstra por morfometria a hiperplasia das células mesangiais, em hamsters com amiloidose, induzida pela Leishmaniôse visceral.

A hiperplasia destas células pode ser bem caracterizada a partir do 40º dia de inoculação, quando passamos a observá-la com maior nitidez. Daí para frente, a hiperplasia destas células foi se acentuando até atingir um ponto máximo em torno dos 60º-70º dias, quando então passavamos a observar os primeiros depósitos de amiloide com decrescimento progressivo das células.

O comportamento destas células, pode se superpor ao das células do baço e do fígado de ratos com amiloidose induzida pela caseína, estudada por TEILUM (1964). Neste modelo experimental, após uma série de outros trabalhos, este autor concebeu a teoria bifásica de secreção local de amiloide.

Numa fase inicial, haveria uma proliferação de células pironinofílicas e no sêro aumento de gamaglobulinas; a outra fase, mais tardia, caracteriza-se por queda de globulinas séricas e deposição de amiloide.

Aceitando a teoria bifásica de TEILUM, a fase proliferativa, seria introduzida em nosso material pela hiperplasia das células mesangiais e o depósito de amiloide traduziria a disfunção das células mesangiais, após estímulo antigêni

co prolongado.

Não é portanto de estranhar que, sendo as células mesangiais, o SRE do rim, estas células respondendo a um estímulo possam "produzir" amiloide. Aliás persiste aí a grande dúvida da amiloidogênese, isto é, ou o amiloide seria produzido "in situ", com secreção local de gamaglobulinas e polissacarídeos que se polimezariam no interstício ou as células do SRE captariam proteínas estranhas (por exemplo, fragmentos de imunoglobulinas segundo a hipótese de GLENNER, 1973) que seriam digeridas pelos lisosomas sendo o material final, depositado no interstício sob a forma de fibrilas de amiloide. Este dado nos parece importante na gênese de amiloide quando associado ao fato de que SHIRAHAMA e col., (1973), conseguiram mostrar que fragmentos de imunoglobulinas de cadeia leve, têm uma arranjo fibrilar.

A deposição de amiloide nos glomérulos foi patente a partir do 70º dia, tendo aumentado progressivamente até o 151º dia. Chamou-nos atenção o fato de que aos 110 dias, do inóculo, nenhum dos animais sacrificados, apresentasse amiloidose. Este dado vem ao encontro da idéia da susceptibilidade individual (SALFELDER e col., 1968), já que estes animais também não apresentaram manifestação da doença.

O hamster "A" aos 130º dias da inoculação, apresentava pouca amiloidose, no entanto mostrava uma grande disseminação visceral por fungos. Este fato, fala a favor de que a amiloidose, começa a se depositar na vigência de resposta anômala, não protetora do SRE. Aqueles animais que apresentam disfunção de células imunocompetentes e que portanto parecem não responder regularmente ao estímulo antigênico, desenvolvem amiloidose e têm sua doença disseminada. Portanto o amiloide se depositaria numa fase de tolerância imunológica ao antígeno, como supõe CATHCART e col., (1970).

Segundo MENDES e col., (1971), PADILHA GONÇALVES (1972) e MUSSATI (1974), a resposta imune-celular é o

principal componente da imunidade que está deprimido na Paracoccidiodomicose; aliás IABUKI (1973) também é concordante com esta idéia quando relata o afrouxamento e necrose de granulomas bem constituídos, quando da disseminação da B.S.A. no hamster, chamando atenção para a possibilidade de uma queda da resistência imunológica responsável pela disseminação, semelhante a que ocorre no homem, em várias doenças infecciosas.

PERIASSU (1946) quando inoculou cobaios com P. brasiliensis notou o aparecimento de reações inflamatórias distintas. Uma reação constituída de microabscessos contendo fungos e outra constituída por granulomas.

BRITO e FAVA NETTO (1963), descreveram lesões renais em 20,8% dos cobaios com B.S.A. disseminada. As lesões eram representadas por nefrite embólica com aderências fibrosas focais de alças glomerulares, infiltrado intersticial focal de linfócitos e plasmócitos e pequenos granulomas epitelioides contendo raros fungos.

Transpondo estas observações para os nossos achados, encontramos no rim dois padrões distintos de lesões, semelhantes às descritas por PERIASSU (1946). Havia lesões inespecíficas, em 15 dos 25 hamsters do grupo 1. É sabido que antígenos metabólicos do P. brasiliensis podem ser difusíveis no meio de cultura, inclusive servindo para provas de imunodifusão e imunoeletroforese (RESTREPO, 1972). Este fato nos faz supor que estes antígenos, injetados juntamente com a suspensão da cultura, podem ter sido carregados por macrófagos - como sugerido por FRANCO (1972) na miocardite Chagásica, IABUKI (1973) na B.S.A. experimental do hamster e MONTENEGRO e col., (1974) com o antígeno polissacarídico do P. brasiliensis - determinando, quando de sua liberação, reações inflamatórias à distância.

Não encontramos as lesões nefríticas embólicas, descritas por BRITO e FAVA NETTO (1963), porém encon

tramos aderências focais e inespecíficas de alças glomerulares com espessamento de membrana basal glomerular bem como sinequias entre os folhetos visceral e parietal da cápsula de BOWMAN, além de acentuada lobulação glomerular e hiperplasia de células mesangiais. Este aspecto histológico, semelhante ao das glomerulites membrano-proliferativa, leva-nos a pensar em uma provável glomerulopatia, semelhante aquela descrita para a Esquistossomose hepatoesplênica (BRITO e col., 1969; ANDRADE e col., 1971; ANDRADE e SUSIN, 1974). Nesta patologia são descritas condensações eletrodensas na matriz mesangial bem como na membrana basal glomerular, levando os autores a sugerir o depósito de complexos imunes nestas regiões.

Estas alterações também têm sido descritas para o Calazar humano por BRITO e col., (1975), porém não foi encontrada experimentalmente no hamster com Leishmaniíose visceral (DUARTE, informação pessoal).

Nos fragmentos de rins, estudados, também não observamos as alterações ultraestruturais descritas para o Calazar humano e a Esquistossomose hepatoesplênica.

Aqui, queremos salientar, que não temos conhecimento de casos humanos de B.S.A. que tenham desenvolvido a amiloidose renal. DILLON (1972), estudando o comportamento terapêutico da anfotericina B1 em 119 pacientes com Paracoccidioidomicose, durante um período de 10-14 anos, não encontrou em nenhum dos casos que foram a óbito com necropsia, o desenvolvimento de amiloidose. Estes dados levam-nos a conjecturar, que nossos hamsters, ao contrário do homem teriam uma sobrecarga maior do SRE, com rápida tolerância imunológica (?) aos antígenos de P. brasiliensis.

Confrontando nossos achados com os achados de BRITO e FAVA NETTO (1963), apenas em 3 animais (12%) observamos lesões renais específicas, correspondendo à disseminação.

Com relação as alterações tubulares obser-

vadas, nossos dados foram concordantes com a maioria dos autores, (COHEN, 1967) que não conseguiram documentar por colorações específicas, a presença de amiloide na luz. Os cilindros hialinos observados, provavelmente se constituem de proteínas, já que somente nos animais com graus avançados de amiloidose e proteinúria, eram eles observados.

O estudo ultraestrutural, demonstrou que a deposição do amiloide, iniciava-se pela região mesangial. Este dado é concorde com o descrito na literatura, (COHEN e CALKINS, 1960; HINGLAIS e col., 1964; DUARTE, 1975). Nos casos mais avançados, havia comprometimento da membrana basal glomerular e somente nestes casos pudemos documentar fibrilas de amiloide entre o citoplasma da célula endotelial e a face endotelial da membrana basal glomerular. Este é um fato interessante, já que alguns autores, descrevem os primeiros depósitos de amiloide, iniciando-se neste local do glomérulo, sugerindo que deveria existir um precursor circulante cujo depósito inicialmente seria na primeira barreira encontrada, isto é, na face endotelial da membrana basal. Realmente isto não parece acontecer; os nossos dados também sugerem, que a célula mesangial é que desempenha um papel fundamental no aparecimento do amiloide e este somente aparece na membrana basal glomerular quando os depósitos são abundantes na região mesangial.

Segundo RANLOV e WANSTRUP (1967), a deposição de amiloide no mesangio se compatibiliza com o conceito de que o amiloide teria uma substância precursora no plasma e que a influência de "fatores" celulares da célula mesangial ou intersticiais, da matriz mesangial, induziriam a fibrilogênese extracelular.

Os mesmos autores, observaram feixes de fibrilas de amiloide se irradiando da invaginação da membrana celular da célula mesangial, sugerindo a possibilidade da secreção

local de uma substância pré-amiloide, posteriormente polimerizada no meio ambiente extracelular; fato este concordante com a teoria de TEILUM (1964), sobre a patogênese do amiloide.

Para MENEFEE e col., (1964) a matriz mesangial pode ter contacto direto com o lumen capilar por pequenas descontinuidades da membrana basal dos capilares glomerulares. Assim sendo, podem passar partículas do lumen capilar para a célula mesangial, sem atravessar a membrana basal. Salientamos aqui que há concordância entre os autores quanto as propriedades fagocíticas da célula mesangial. Com relação a função da célula mesangial BERGSTRAND e BUCHT não encontraram aumento da função destas células em rins amiloidóticos; no entanto KENNEDY (1962) observou que as células mesangiais apresentam aumento de atividade secretora em amiloidose experimental.

Pelos nossos achados, também não nos foi possível observar aumento de função destas células. Muito provavelmente porque observamos rins com amiloidose desenvolvida quando então a célula mesangial encontra-se já exausta.

No trabalho de DUARTE, (1975) pudemos observar que durante a fase de indução ou pré-amiloide, e mesmo nos depósitos iniciais, as células mesangiais exibem uma acentuada proliferação de retículo endoplásmico rugoso, indicando um aumento da atividade secretora. É nosso objetivo futuro, observar ao M.E. os rins que histologicamente não apresentam amiloidose, afim de conferir os dados de KENNEDY (1962) e DUARTE (1975).

A amiloidose renal no curso da nossa infecção experimental, mostrou ser uma complicação importante, por se desenvolver no hamster uma grave proteinúria, levando-os a uma síndrome nefrótica. Em 1946, GELLHORN e col., observaram que hamsters infectados com Leishmania donovani, desenvolviam -

hipoalbuminemia, proteinúria, edema e amiloidose renal. Estes autores, concluem que a alteração primária seria a deposição de amiloide nos glomérulos levando a perda excessiva de albumina pela urina com redução da concentração da albumina plasmática e queda da pressão coloido-osmótica do plasma justificando assim os edemas.

De acôrdo com GELLHORN, observamos existir uma correlação entre a intensidade dos depósitos de amiloide no rim e a proteinúria, isto é, sòmente edemaciavam os hamsters com amiloidose avançada nos glomérulos. Provavelmente, não sòmente a hipoproteinemia é responsável pelo aparecimento do edema, porém outros fatores devem interferir como por exemplo o nível de aldosterona, pois, segundo EPSTEIN, quando o volume sanguíneo circulante cai 20-30% há diminuição do fluxo sanguíneo renal e do filtrado glomerular. Com isto existe uma secreção compensatória de aldosterona mediada pelo aparelho justa-glomerular, promovendo uma retenção de sal e água, com agravamento do edema.

É sabido que existe uma susceptibilidade a infecções na vigência da S.N. Não está claro ainda o mecanismo envolvido nesta vulnerabilidade, porém, pode ser imputada à perda de imunoglobulinas pelo filtrado glomerular.

Este é um fato existente e que foi observado na eletroforese e imunoeletroforese das urinas dos hamsters e demaciados. Chamamos atenção, de que um de nossos hamsters, edemaciados, desenvolveu durante o edema, alopecia e cujo exame anátomo-patológico revelou uma dermatite extensa, inespecífica. Nenhum dos nossos hamsters edemaciados, desenvolveu insuficiência renal até a época do sacrifício, como pode ser observado pelas taxas de ureia e creatinina expostas nas TABELAS 9 e 10 e pelos dados que temos de necropsia. É provável que se evoluíssem com edemia, entrariam em insuficiência renal. Este dado é encontrado, no trabalho de ZOLTOWSKA e WRZOLKOWA (1973) e na TABELA 9, podemos observar que a ureia nos animais edemaciados tende a se ele-

var, se comparada com as dos hamsters normais.

Observamos também, que os hamsters edemaciados, apresentaram aumento de alfa globulina no sôro. Segundo os dados da literatura, o componente "P" do amiloide migra também na região de alfa; é provável, que o componente "P" do amiloide (GATHCART e col., 1971), realmente represente uma absorção, nos depósitos de amiloide, de uma proteína plasmática como sugerido por GLENNER e col., (1973). Este dado é corroborado pelo encontro na eletroforese da urina dos animais edemaciados de uma faixa de alfa globulina.

Com relação ao complemento, observamos que os hamsters edemaciados, apresentaram uma queda da fração C_3 no sôro e a presença muito aumentada desta mesma fração na urina.

Os dados obtidos, em nossos hamsters, vêm confirmar a idéia de outros pesquisadores LACHMANN e col., (1962), MILGRON e col., (1966) e SCHULFZ e col., (1967) que trabalhando em imunoquímica com substância amiloide isolada, concluem que os componentes proteicos normais do sôro podem estar absorvidos nos depósitos de amiloide.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Inoculamos 26 hamsters (grupo 1) por via intra-testicular com 0,2 ml de suspensão de cultura de P. brasiliensis (cepa 18) a fim de produzir Paracoccidioidomicose experimental e com isto induzir o desenvolvimento de amiloidose nestes animais. Neste grupo, estudamos a microscopia óptica e ultra-estrutural dos rins com amiloidose.

Um outro grupo de animais foi inoculado de modo semelhante e em período diferente com a cepa 192 de P. brasiliensis (grupo 3), afim de se coletar destes animais urina e sôro para as provas de função renal e eletroforese e imuno-eletroforese de proteínas.

Dos 26 animais do grupo 1, 7 apresentaram anasarca e 3 apenas edema sub-cutâneo, na época do sacrifício.

A microscopia óptica dos rins dos animais deste grupo, demonstrou existir hiperplasia de células mesangiais a partir do 40º ao 70º dia do inóculo.

O aparecimento de amiloide renal, ao M. O. nos animais do grupo 1, deu-se em torno do 70º dia após o inóculo, e o edema se iniciou ao redor do 100º dia.

Nos animais do grupo 3, inoculados com a cepa 192 de P. brasiliensis, o edema ocorreu apenas em torno dos 200 dias após o inóculo.

Os achados de microscopia eletrônica, reproduziram os descritos na literatura, isto é, os depósitos a pareceram primeiramente na região mesangial. Nos casos mais avançados, comprometiam a espessura da membrana basal glomerular, e apareciam entre a face endotelial da membrana basal e a membrana citoplasmática da célula endotelial.

As provas de função renal realizadas, mostraram que os animais edemaciados, apresentavam grave proteinúria

ria e hipoalbuminemia.

Nossos animais não mostraram sinais de insuficiência renal provavelmente porque foram sacrificados antes que tal evento ocorresse.

A eletroforese e imunoeletroforese das proteínas do sôro e da urina dos animais edemaciados, demonstraram haver baixa de imunoglobulinas séricas pela perda das mesmas no filtrado renal.

A presença da fração C_3 do complemento e de gamaglobulinas na urina, bem como o decrescimo de ambos no sôro dos animais com amiloidose, são sugestivos de que estas substâncias possam ser adsorvidas nos depósitos da substância amilóide, porém, não fazendo parte da mesma.

A indução de amilóide pelo P. brasiliensis, com a cepa 18 ou 192, não se constitui em um bom modelo experimental para estudo da amiloidose em face do tempo necessário para o seu aparecimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIP - Laboratory Manual of Special Staining Technics. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1957.

ALMEIDA, D.B. - Reação de Imunofluorescência indireta em membrana basal glomerular isolada, aplicada ao estudo da nefrite nefrotóxica do rato. Tese, doutoramento, F.C.M.B.B. (São Paulo), 1972.

ALMEIDA, F.P. de - Estudos comparativos do granuloma coccidioi-dico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o para-sito brasileiro. An. Fac. Med. São Paulo, 5: 125, 1930.

ANDERSON, R.E. - Disseminated amyloidosis in germfree mice: spontaneous prevalence relationship to ionizing radiation and pathogenetic implications. Am. J. Path., 65: 43, 1971.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G. & SADIGURSKY, M. - Renal changes in patients with hepatosplenic schistosomiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 20: 77, 1971.

ANDRADE, Z.A. & SUSIN, M. - Renal changes in mice infected with Schistosoma mansoni. Am. J. Trop. Hyg, 23(3): 400, 1974.

AUERBACH, O. & STEMMERMAN, M.G. - Renal amyloidosis. Arch. Intern. Med., 74: 244, 1944.

AZULAY, R.D. - Amigdalitis paracoccidioidica. Arch. argent. Derm., 3: 1, 1953.

BARTH, W.F.; GORDON, J.K. & WILLERSON, J.T. - Amyloidosis induced in mice by Escherichia coli endotoxin. Science 162: 694, 1968.

BENDITT, E.P. & ERIKSEN, N. - Amyloid II. Starch gel electrophoresis of some proteins extracted from amyloid. Arch. Pathol., 78: 326, 1961.

BERGSTRAND, A.F. & BUCHT, H. - Electron microscopy and renal function in amyloidosis of the kidney. J. Path. Bact., 81: 495, 1961.

BENNHOLD, H. - Eine spezifische Amyloidfärbung mit Kongorot. München. Med. Wchnschr., 69: 1537, 1922.

BLADEN, H.A.; NYLEN, M.V. & GLENNER, G.G. - The ultrastructure of human amyloid as revealed by the negative staining technique. J. Ultrastruct. Res., 14: 449, 1966.

BRITO, T.; BONI, D.; LOPES, J.O. & SILVA, L.C. - Kidney biopsy in human schistosomiasis. An ultrastructural study. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 11: 62, 1969.

BRITO, T. & FAVA NETTO, C. - Disseminated experimental south american blastomycosis of guinea pig, a pathological and immunological study. Path. Microbiol. (Brasil) 26: 29, 1963.

BURNS, J.; PENNOCK, C.A. & STOWARD, P.J. - The specificity of staining of amyloid deposits with thioflavine - T. J. Path. Bact., 94: 337, 1967.

CALKINS, E. & COHEN, A.S. - Diagnosis of amyloidosis. Bull. Rheum. Dis., 10: 215, 1960.

CARBONELL, L.M. - Ultrastructure of human pathogenic fungi and their mycoses. In: Hand buch der Speziellen Pathologischen Anatomie and Histologie, III, 5, Baker, R.D. The Pathologic Anatomy of mycoses, Berlin, Springer Verlag, 38: 66, 1971.

CARBONELL, L.M. & POLLAK, L. - Ultraestructura del Paracoccidioides brasiliensis in cultivos de la fase levaduriforme. Mycol. Appl., 19: 184, 1963.

CATHCART, E.S.; MULLARKEY, M. & COHEN, A.S. - Amyloidosis: an expression of immunological tolerance? Lancet, 2: 639, 1970.

CATHCART, E.S.; RODGERS, O.G. & COHEN, A.S. - Amyloid-inducing factor and immunological unresponsiveness. Ann. Rheum. Dis., 31: 303, 1972.

CATHCART, E.S.; SKINNER, M. & COHEN, A.S. - Immunogenicity of amyloid. Immunology, 20: 945, 1971.

CAWLEY, L.P. - Electrophoresis and immunoelectrophoresis. Boston, Little, Brown and Company, 1969.

CLAUSON, M.H. & HARDT, F. - Quantitative studies on the decay of lymphoid cells during the development of casein-induced murine amyloidosis. Acta. Path. Microbiol. Scand (A), 80: 125, 1972.

CLERIGI, E.; MORARELLI, P.; PIERPAOLI, W.; PROVINI, L. & VILLA, M.L. - Induction of experimental amyloidosis in neonatally thymectomized mice. Clin. Exp. Immunol., 1: 425, 1966.

- COHEN, A. S. & CALKINS, E. - Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* (London), 183: 1202, 1959.
- COHEN, A. S. & CALKINS, E. - Study of fine structure of kidney in casein-induced amyloidosis in rabbits. *J. Exper. Med.*, 112: 479, 1960.
- COHEN, A. S. & CALKINS, E. - Isolation and characterization of amyloid fibrils by physical techniques. *J. Clin. Invest.*, 41: 1350, 1962.
- COHEN, A. S.; CALKINS, E. & LEVENE, C. - Studies on experimental amyloidosis I. Analysis of histology and staining reactions of casein-induced amyloidosis in rabbits. *Am. J. Path.*, 35: 971, 1959.
- COHEN, A. S. - Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.*, 277: 522, 1967.
- COHEN, A. S.; GROSSE, E. & SHIRAHAMA, T. - Light and electron microscopic autoradiographic demonstration of local amyloid formation in spleen explants. *Am. J. Path.*, 47: 1079, 1965.
- COHEN, A. S. & SHIRAHAMA, T. - Animal model for human disease: Spontaneous and induced amyloidosis. *Am. J. Pathol.*, 68: 441, 1972.
- CONTI-DIAZ, I. A. & FURCOLON, W. L. - Susceptibility of hamsters and mice to Paracoccidioidites brasiliensis using different routes of inoculation. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 47: 73, 1972.
- CORREA, L. A. & GIRALDO, M. R. - Study of immune mechanisms in Paracoccidioidomycosis. I. Changes in immunoglobulins (IgG, IgM and IgA). In: Paracoccidioidomycosis, Proceedings of the first Pan American Symposium, Medellin, Colombia, Pan American Health Organization, p. 245, 1972 (Scientific Publication nº 254).

- DAHLIN, D.C. - Classification and general aspects of amyloidosis. M. Clin. North America, 34: 1107, 1950.
- DE LELLIS, R.A.; SRIRAM, J. & GLENNER, G.G. - Amyloid IX. Further Kinetic Studies on experimental murine amyloidosis. Int. Arch. Allergy App. Immunol., 37: 175, 1970.
- DILLON, N.L. - Tratamento da paracoccidiodomicose pela anfoterina-B. Avaliação de 119 doentes num período de 14 anos. Tese de doutoramento. EPM (São Paulo), 1972.
- DUARTE, M.I.S. - Informação pessoal. Tese doutoramento, E.P.M. (São Paulo), 1975.
- EPSTEIN, F.H. - Renal excretion of sodium and the concepts of volume receptor. Yale J. Biol. Med., 29: 282, 1956-1957.
- FAVA NETO, C.-Estudos quantitativos de complemento na Blastomicose Sul-Americana, com antígeno polissacarídico. Arg.Cir.Clin.Exper., 18: 197, 1955
- FIELDS, M.; POLLIACK, A. & LAUFER, A. - Resorption of amyloid and enzymatic studies in amyloidosis. Isr. J. Med. Sci., 9: (7): 875, 1973.
- FORGET, B.G.; SQUIRES, J.W. & SHELDON, H. - Waldenstrom's macroglobulinaemia with generalized amyloidosis. Arch. Intern. Med., 118: 363, 1966.
- FRANKLIN, E.C. & PRAS, M. - Immunologic studies of water soluble human amyloid fibrils. J. Exp. Med., 130: 797, 1969.
- FRANKLIN, E.C. & ZUCKER-FRANKLIN, D. - Current concepts of amyloid. Adv. Immunol., 15: 249, 1972.

- FURTADO, J.S. & BRITO, T.de & FREYMULLER, E. - The structure and reproduction of Paracoccidioides brasiliensis in human tissue Sabouraudia, 5: 226, 1967.
- GELLHORN, A.; VAN DYKE, D.B.; PYLES, W.J. & TUPIKOVA, N.A. - Amyloidosis in hamsters with leishmaniasis. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 61: 254, 1946.
- GLENNER, G.G.; EIN, D.; EANES, E.D.; BLADEN, H.A.; TERRY, W. & PAGE, D.L. - Creation of "amyloid" fibrils from Bence-Jones proteins in vitro. Science, 174: 712, 1971a.
- GLENNER, G.G.; TERRY, W.; HARADA, M.; ISERSKY, C. & PAGE, D. - Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analyses. Science, 172: 1150, 1971b.
- GUIMARÃES, F.N. - Infecção do hamster (Cricetus auratus Waterhouse) pelo agente da micose de Lutz (Blastomicose Sul-Americana). Hospital (Rio de Janeiro), 40: 515, 1951.
- GUIMARÃES, F.N. - Inoculações em hamsters da blastomicose sul-americana (doença de LUTZ), da blastomicose queloidiforme (doença de LOBO) e da blastomicose dos índios do Tapajós-Xingu. Hospital (Rio de Janeiro), 66: 581, 1964.
- HARDT, F. - Acceleration of casein-induced amyloidosis in mice by immunosuppressive agents. Acta. Path. Microbiol. Scand., (A), 79: 61, 1971.
- HARDT, E. & CLAESSESON, M.H. - Graft-versus-host reactions mediated by spleen cells from amyloidotic and non-amyloidotic mice. Transplantation, 12: 36, 1971.

HARDT, F. & RANLOV, P. - Amyloidogenesis . Isr. J. Med. Sci., 9: 857, 1973.

HEEFNER, W.A. & SORENSON, G.D. - Experimental amyloidosis: I - light and electron microscopic observations of spleen and lymph nodes. Lab. Invest., 11: 585, 1962.

HELLER, H.; MISSMAHL, H.P.; SOHAR, E. & GAFNI, J. - Amyloidosis: its differentiation into perirreticulin and pericollagen types. J. Path. Bact., 88: 15, 1964.

HEPTINSTALL, R.H. - Pathology of the Kidney. Little, Brown - 2 Ed., pg. 750, Boston, 1974.

HINGLAIS, N. & MONTERA, H. - Étude au microscope électronique de six cas d'amylose rénale humaine. Path. Biol., 12: 176, 1964.

HINGLAIS, N.; ZWEIBAUM, A. & RICHET, G. - Les lésions précoces de l'amylose expérimentale du hamster. Etude au microscope électronique. Nephron, 6: 16, 1964.

HOBBS, J.R. & MORGAN, A.D. - Fluorescence microscopy with thioflavine-T in diagnosis of amyloid. J. Path. & Bact., 86: 437, 1963.

HOTKHISS, R.D. - A microchemical reaction resulting in the staining of Palyssacharide structures in fixed tissues preparations. Arch. Biochem., 16: 132, 1948.

IABUKI, K. - Blastomicose sul-americana experimental do hamster. Tese, doutoramento, F.C.M.B.B. (São Paulo), 1973.

Informe de um grupo científico da 1ª OMS. Inmunidad celular y resistênciã a las infecciones. Ginebra, Organization Mundial de la Salud, 63 p., 1973. (Série de informes técnicos nº 519).

ISOBE, T. & OSSERMAN, E.F. - Patterns of amyloidosis and their association with plasma-cell dyscrasia, monoclonal immunoglobulins and Bence-Jones proteins. N. Engl. J. Med., 290: 473, 1974.

JAO, W. & PIRANI, C.L. - Renal amyloidosis: electron microscopic observations. Acta. path. microbiol. Scand. (A), Suppl., 233: 217, 1972.

JONES, D.B. - Nephrotic glomerulonephrites. Am. J. Path., 33: 313, 1957.

KAZIMIERCZAK, J. - Ultrastructural observations on the first amyloid to be found in the spleen of casein treated mice. Acta. Path. Microbiol. Scand. (A), 80: suppl. 233: 141, 1972.

KENNEDY, J.S. - Sulfur-35 in experimental amyloidosis. J. Path. Bact., 83: 165, 1962.

KING, L.S. - Atypical amyloid disease, with observation on new silver stain for amyloid. Am. J. Path., 24: 1095, 1948.

KLATSKIN, G. - Nonspecific Green birefringence in Congo Red-Stained tissues. Am. J. Path., 56: (1): 1, 1969.

KYLE, R.A. & BAYRD, E.D. - Amyloidosis: review of 236 cases. Medicine, 54: 271, 1975.

- LACHMANN, P.J.; MULLER-EBERHARD, H.J.; KUNKEL, H.G. & PARONETTO, F. - Localization of in vivo-bound complement in tissue sections. J. Exp. Med., 115: 63, 1962.
- LARSEN, B. - Metachromasia of amyloid with toluidine blue. Acta. Path. Microbiol. Scand., 42: 265, 1958.
- LEHNER, T. - Juxtaglomerular apparatus staining with thioflavine-T fluorochrome and its confusion with amyloid. Nature (Lond.), 206: 738, 1965.
- LETTERER, E. - History and development of amyloid research. In Mandema, E., Ruinen, L.; Schilten, J.H.; Cohen, A.S. (Eds.): Amyloidosis. Amsterdam, Excerpta Médica Foundation, p.3: 1968.
- LEVINE, R.A. - Amyloid disease of the liver: correlation of clinical, functional and morphologic features in forty-seven patients. Am. J. Med., 33: 349, 1962.
- LINKE, R.P.; TISCHENDORF, F.W.; ZUCKER-FRANKLIN, D. & FRANKLIN, E.C. - The formation of amyloid-like fibrils in vitro from Bence-Jones proteins of the V & I subclass. J. Immunol., 111: 24, 1973.
- LONDERO, A.T. & RAMOS, C.D. - Paracoccidioidomycosis: a clinical and mycological study of 41 cases observed in Santa Maria. Am. J. Med., 52: 771, 1972.
- LUTZ, A. - Uma mycose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento dos hypoblastomicoses americanas. Brasil Med., 22: 121, 1908.

MACKENZINE, D.H. - Amyloidosis presenting as lymphadenopathy.
Brit. Med. J., 2: 1449, 1963.

MACKINNON, J.E. - Actualizaci6m sobre patogenia de la blastomycosis sudamericana. T6rax, 17: 40, 1968.

MACKINNON, J.E. - Geographical distribution and prevalence of paracoccidioidomycosis. In: Paracoccidioidomycosis, Proceedings of the first Pan-American Symposium, Medellin, Colombia, Pan American Health Organization, p. 45, 1972 (Scientific Publication n9 254).

MAGNUS-LEVY, A. - Bence-Jones eiweiss und amyloid. Z. Klin. Med., 116: 510, 1931.

MCKINNEY, B. & GRUBB, C - Non-specificity of thioflavine-T as an amyloid stain. Nature (London) 205: 1023, 1965.

MELLORS, R.C. & ORTEGA, L.G. - Analytical pathology. III - New observations on pathogenesis of glomerulonephrites, lipid nephrosis, periarteritis nodosa, and secondary amyloidosis in man. Am. J. Path., 32: 455, 1956.

MENDES, N.F.; MUSSATI, C.C.; LEÃO, R.C.; MENDES, E. & NASPITZ, C.K. - Lymphocyte cultures and skin allograft survival in patients with South American blastomycosis. J. Allergy, clin. Immunol., 48: 40, 1971.

MENEFEE, M.G.; MUELLER, C.B.; BELL, A.L. & MYERS, J.K. - Transport of globin by the renal glomerular. J. Exp. Med., 120: 1129, 1964.

- MERETOJA, J.; JOKINEN, E.J.; COLLAN, Y. & LAHDEVIRTA, J. - Renal biopsy findings in familial amyloidosis with corneal lattice dystrophy. *Acta. Path. Microbiol. Scand. (A)*, 80 suppl. 233: 228, 1972.
- MILGRON, F.; KASUKAWA, R. & CALKINS, E. - Studies on antigenic composition of amyloid. *J. Immunol.*, 96(2): 245, 1966.
- MILLONIG, G. - Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation. *J. Appl. Phys.*, 32: 1637, 1961.
- MISSMAHL, H.P. & HARTWIG, M. - Optical polarization studies of amyloid substance. *Virchow. Arch. Path. Anat.*, 324: 489, 1953.
- MONTENEGRO, J. - Acerca da inoculabilidade da blastomycose no Brasil. *Brasil-Med.*, 41: 808, 1927.
- MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M.F. & CHAMMA, L.G. - Identificação do antígeno polissacarídico do Paracoccidioides brasiliensis por imunofluorescência indireta. *Ciência*, 1: 3, 1974.
- MOTTA, L. da C. - Granulomatose paracoccidioidica "blastomicose brasileira". *An. Fac. Med. São Paulo*, 11: 293, 1935.
- MOTTA, L. da C. - Granulomatose paracoccidióidica (blastomicose brasileira): *An. Fac. Med. São Paulo*, 21: 205, 1945.
- MOTTA, L. da C. - Paracoccidioidal granulomatosis. Cardiac localization in a case of generalized form. *Am. J. Path.*, 24: 323, 1948.
- MOTTA, L. da C. - Granulomatose paracoccidióidica. Forma orgânica isolada. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 11: 353, 1956.

- MUSSATI, C.C. - Imunidade celular na paracoccidioidomicose. Tese, doutoramento, E.P.M. (São Paulo), 1974.
- OLSEN, S. - Mesangial thickening and nodular glomerular sclerosis in diabetes mellitus and other diseases. Acta. path. microbiol. Scand. (A) 80, suppl., 233: 203, 1972.
- OSSERMAN, E.F.; TAKATSUKI, K. & TALAL, N. - The pathogenesis of "amyloidosis". Studies on the role of abnormal gamma globulins and gamma globulin fragments of Bence-Jones type in the pathogenesis of "primary" and "secondary" amyloidosis associated with plasma cell myeloma. Semin. Hematol. 1: 3, 1964.
- PADILHA-GONÇALVES, A. - Adenopathy in paracoccidioidomycosis In: Paracoccidioidomycosis, Proceedings of the first Pan-American Symposium, Medellin, Colombia, Pan-American Health Organization, p. 189, 1972 (Scientific Publication nº 254).
- PAUL, W.E. & COHEN, A.S. - Electron microscopic studies of amyloid fibrils with ferritin conjugated antibody. Am. J. Path., 43: 721, 1963.
- PERIASSU, D. - O sistema restículo endotelial na blastomicose brasileira experimental do cobaio. Rev. bras. Biol., 6: 265, 1946.
- POLLIACK, A. & HERSHKO, C. - Spontaneous rupture of the spleen in amyloidosis. Isr. J. Med. Sci., 8: 57, 1972.
- PRAS, M.; ZUCKER-FRANKLIN, D.; RIMON, A. & FRANKLIN, E.C. - Physical, chemical and ultrastructural studies of water soluble human amyloid fibrils. J. Exp. Med., 130: 77, 1969.

PUCHTLER, H.; SWEAT, F. & LEVINE, M. - On the binding of congo-red by amyloid. J. Histochem. cytochem., 10: 355, 1962.

PUCHTLER, H.; SWEAT, F. & KUHN, J.G. - On the binding of direct cotton dyes by amyloid. J. Histochem. Cytochem., 12: 900, 1964.

RANLOV, P. & WANSTROP, J. - Ultrastructure investigation on the cellular morphogenesis of experimental mouse amyloidosis. Acta. Path. Microb. Scand., 71: 575, 1967.

REGO, A.P.; MANTA, M. & ANDRADE, E. - Falhas no diagnóstico de internação em hospitais de tuberculosos: a blastomicose sul-americana como causa de erro. Rev. Med. Guanabara, 35: 104, 1968.

REIMANN, H.A.; KOVCKY, R.F. & EKLUND, C.M. - Primary amyloidosis limited to tissues of mesodermal origin. Am. J. Pathol., 11: 977, 1935.

REINOLDS, E.S. - Use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microsc. pg. J. Cell. Biol., 17: 208, 1963.

RESTREPO, M.A. - La inmunodifusion en gel de agar y la inmunofluorescencia en el diagnostico de las mycoses pulmonares. Antioquia Medica, 22: 337, 1972.

ROBBINS, S.L. - Pathologic basis of disease. W.B. Saunders Company, pg. 289, Philadelphia, 1974.

ROGERS, D.R. - Screening for amyloid with the thioflavin-T fluorescent method. Am. J. Clin. Path., 44: 59, 1965.

- ROLLIER, R. & CHENEBAULD, J. - Sur un cas de paracoccidioidose brésilienne à localization pulmonaire, puis buccorhinopharyngée. Bull. Soc. Franc. Derm. Syph., 69: 446, 1962.
- ROMHANYI, G. - Über die submikroskopische structur des Amyloids. Schweiz. Ztschr. Path. u. Bakt., 12: 253, 1949.
- ROMHANYI, G. - Selective differentiation between amyloid and connective tissue structures based on the collagen specific topooptical staining reaction with Congo Red. Virchows Arch. (Pathol. Anat.), 354: 209, 1971.
- RUINEM, L.; SMIT-VAN DIJK, W.; PRAS, M.; SCHOLTEN, J.H. & MANDEMA, E. - The binding of congo-red and toluidine-blue to isolated amyloid. Acta. Path. Microbiol. Scand. (A), 80: suppl. 233: 122, 1972.
- SALFELDER, K.; SCHWARTZ, J. & JOHNSON, C.E. - Experimental cutaneous south american blastomycosis in hamsters. Arch. Derm., 97: 67, 1968.
- SCHEIDEGGER, J.J. - Une micro-methode de l'immunoelectrophorese. Int. Arch. Allergy, 7: 103, 1955.
- SCHEINBERG, M.A.; BENNET, M. & CATHCART, E.E. - Casein induced experimental amyloidosis V - The response of linphoid organs to T and B mitogens. Lab. Invest., 33: 96, 1975.
- SCHULTZ, R.T.; CALKINS, E. & MILGROM, F. - Antigenic components of human amyloid. Am. J. Path., 50: 957, 1967.
- SCHULTZ, R.T.; CALKINS, E.; MILGROM, F. & WITEBSKY, E. - Association of gamma globulin with amyloid. Am. J. Path., 48: 1, 1966.

- SHIBOLET, S.; MERKER, H.J.; SOHAR, E.; GAFNI, J. & HELLER, H. - Cellular proliferation during the development of amyloid electron microscopic observations on the kidneys of leishmania-infected hamsters. Brit. J. Exp. Path., 48: 244, 1967.
- SHIMAMURA, T. & SORENSON, G.D. - Experimental amyloidosis V - Relationship between experimental glomerular amyloid and the mesangial region. Am. J. Path., 46: 645, 1965.
- SHIRAHAMA, T.; BENSON, M.D. ; COHEN, A.S. & TANAKA, A. - Fibrillar assemblage of variable segments of immunoglobulin light chains: an electron microscopic study. J. Immunol., 110: 21, 1973.
- SHIRAHAMA, T. & COHEN, A.S. - A congo red staining method for epoxy-embedded amyloid. J. Histochem. Cytochem., 14: 725, 1966.
- SHIRAHAMA, T. & COHEN, A.S. - Fine structure of the glomerulus in human and experimental renal amyloidosis. Am. J. Path., 51: 869, 1967.
- SHIRAHAMA, T. & COHEN, A.S. - An analysis of the close relationship of lysosomes to early deposits of amyloid: Ultrastructural evidence in experimental mouse amyloidosis. Am. J. Pathol., 73: 97, 1973.
- SHIRAHAMA, T. & COHEN, A.S. - Intralysosomal formation of amyloid fibrils. Am. J. Path., 81(1): 101, 1975.
- SKINNER, M.S.; KATINE, A.A. & SPURLOCK, B.O. - Electron microscopic observation of early amyloidosis in human liver. Gastroenterology, 50: 243, 1966.

- SLAUSON, D.O.; GRIBBLE, D.H. & RUSSELL, S.W. - A clinico-pathological study of renal amyloidosis in dogs. J. Comp. Pathol., 80: 335, 1970.
- SORENSEN, G.D. & SHIMAMURA, T. - Experimental amyloidosis III - light and electron microscopic observations of renal glomeruli. Lab. Invest., 13: 1409, 1964.
- SPLENDRE, A. - Blastomycoses americanas. Brasil-Med., 24: 153, 1910.
- SRIRAM, J.; DE LELLIS, R.R.A. & GLENNER, G.G. - Amyloid III - A method for rapid induction of amyloidosis in mice. Int. Arch. Allergy. Appl. Immun., 34: 201, 1968.
- SUZUKI, Y.; CHURG, J.; GEISHMAN, E.; MAUTNER, W.; DACHS, S - The mesangium of the renal glomerulus: Electronmicroscopic studies of pathologic alterations. Am. J. Path., 43: 555, 1963.
- SYMMERS, W.St.C. - Primary amyloidosis: review. J. Clin. Path. 3: 127, 1956.
- TAN, M. & EPSTEIN, W. - Polymer formation during the degradation of human light chain and Bence-Jones proteins by an extract of lysosomal fraction of normal human kidney. Immunoch., 9: 9, 1972.
- TEILUM, G. - Periodic acid-schiff positive reticuloendothelial cell producing glycoprotein. Functional significance during formation of amyloid. Amer. J. Path., 32: 945, 1956.

- TEILUM, G. - Amyloidosis secondary to agammoglobulinaemia. J. Path. Bact., 88: 317, 1964a.
- TEILUM, G. - Pathogenesis of amyloidosis the two-phases cellular theory of local secretion. Acta. path. Microb. Scandinav., 61: 21, 1964b.
- TERRY, W.D.; PAGE, D.L.; KIMURA, S.; ISOBE, T.; OSSERMAN, E.F. & GLENNER, G.G. - Structural identity of Bence-Jones proteins and amyloid fibril proteins in a patient with plasma cell dyscrasia and amyloidosis. J. Clin. Invest., 52: 1276, 1973.
- VASSALI, P.; SIMON, G.; RUILLER, G. - Electronmicroscopic study of glomerular lesions resulting from intravascular fibrin formation. Am. J. Path., 43: 579, 1963.
- VASSAR, P.S. & CULLING, C.F.A. - Fluorescent stains with special reference to amyloid and connective tissues. Arch. Path., 68: 487, 1959.
- VASQUEZ, J.J. & DIXON, F.J. - Immunohistochemical analyses of amyloid by fluorescence technique. J. Exper. Med., 104: 727, 1956.
- VIEIRA E SILVA, C.R.; IWAMA DE MATTOS, M.C.F.; FUJIMORE, K. - Scanning electron microscopy of Paracoccidioides brasiliensis. Study with and Without pré-treatment with pooled sera from patients with "South american blastomycosis". Mycopath. Mycol. Appl., 54: 235, 1974.
- WALDMANN, T.A. & STROBER, W. - Metabolism of immunoglobulins. Prog. Allergy, 13: 1, 1969.

WOLMAN, M. & BUBIS, J.J. - The cause of the green polarization color of amyloid stained with Congo-red. Histochemie, 4: 351, 1965.

ZOLTOWSKA, A. & WRZOLKOWA, T. - Experimental amyloidosis in hamsters. J. Path., 109: 93, 1973.

ZUCKER-FRANKLIN, D. & FRANKLIN, E.C. - Intracellular localization of human amyloid by fluorescence and electron microscopy. Am. J. Path., 59: 23, 1970.