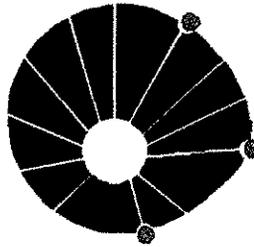


**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



**UNICAMP**

**HALBERT VILLALBA**  
*cirurgião-dentista*

**CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DA  
PARACOCCIDIOIDOMICOSE BUCAL**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do Título de Doutor  
em Biologia e Patologia Buco-Dental.

**Piracicaba**

**2002**

i

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

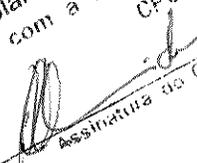
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**HALBERT VILLALBA**  
*cirurgião-dentista*

**CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DA  
PARACOCCIDIOIDOMICOSE BUCAL**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do Título de Doutor  
em Biologia e Patologia Buco Dental.

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCPG-036/83  
CPG. 5 / 07 / 02

  
Assinatura do Orientador

**ORIENTADOR: PROF. DR. OSLEI PAES DE ALMEIDA**  
**Banca Examinadora: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório**  
**Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes**  
**Prof. Dr. Nicolau Tortamano**  
**Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas**

**Piracicaba**

**2002**

UNIDADE 80  
Nº CHAMADA TJUNICAMP  
V711c  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BCI 50274  
PROC 16-837102  
C \_\_\_\_\_ DA \_\_\_\_\_  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 13/08/02  
Nº CPD \_\_\_\_\_

CM00171947-3

BIB ID 250715

### Ficha Catalográfica

V711c Villalba, Halbert.  
Características ultraestruturais da paracoccidioidomicose bucal.  
/ Halbert Villalba. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.  
x, 87f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida.  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Boca – Doenças – Diagnóstico. 2. Microscopia eletrônica de varredura. 3. Microscopia eletrônica. 4. Infecção. 5. Homem. 6. Patologia bucal. I. Almeida, Oslei Paes de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

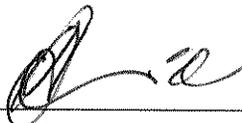
Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

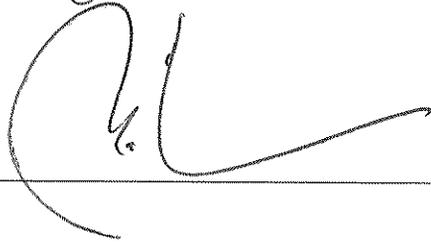


FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

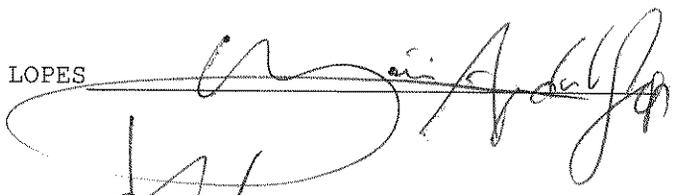


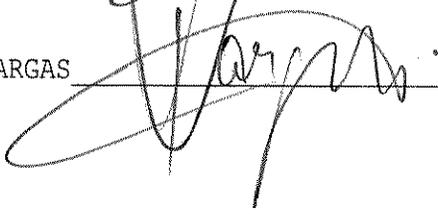
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 21 de Fevereiro de 2002, considerou o candidato HALBERT VILLALBA aprovado.

1. Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA 

2. Prof. Dr. NICOLAU TORTAMANO 

3. Prof. Dr. LUIS CARLOS SPOLIDÓRIO 

4. Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES 

5. Prof. Dr. PABLO AGUSTIN VARGAS 

790762002

*Dedico este trabalho,*

*aos meus pais, Olga Franulovic Villalba (in memóiriam) e Hedio Ruben Tedesco Villalba, pelo amor, exemplo, incentivo e oportunidades dada.*

*A minha esposa **Cristiane Gentile Villalba**, pelo companheirismo, paciência, amor e dedicação.*

*Aos meus irmãos, **Karin, Kristiane e Hebert**, amigos e exemplos de alegria e generosidade.*

## *Agradecimentos*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida**, pela dedicação profissional, incentivo, competência, apoio e exemplo de vida.*

*À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Wilson Sallum, pelo acolhimento e pela oportunidade de intensificar e aprimorar meus conhecimentos.*

*A Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury, coordenadora do curso de pós-graduação da FOP/UNICAMP, pelo apoio e amizade.*

*A Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello, coordenadora do curso de pós-graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP, pelo apoio e amizade.*

*Ao Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas, do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela amizade de vários anos, estímulo, companheirismo, apoio e generosidade que faz parte de seu caráter.*

*Ao Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório, do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelo apoio, amizade, orientação, estímulo, exemplo de luta e generosidade.*

*Ao Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes, do Departamento de Diagnóstico Oral, área de Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelas orientações profissionais e pessoais dadas para engrandecer minha formação.*

*Ao Prof. Dr. Elliot W. Kitajima, do Núcleo de Apoio à Pesquisa e Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”. Pelos ensinamentos valiosos prestados em microscopia eletrônica.*

*Ao Prof. Dr. Nicolau Tortamano, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Odontologia de São Paulo – USP, e Coordenador da Saúde da Universidade Paulista – UNIP, pelas oportunidades e voto de confiança.*

*Aos Professores Drs.: Lourenço Bozzo, Edgard Graner, Ricardo Dela Colleta e Jacks Jorge Júnior, da Patologia da FOP/UNICAMP, pela amizade e apoio constantes.*

*Aos Professores Drs: Carlos Benatti Neto, Carlos Alberto de Souza Costa, Raphael Carlos Comelli Lia e a Profa. Dra. Maria Rita de Oliveira Brancini, do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelo estímulo, apoio, amizade e iniciação no meio científico.*

*Ao Dr. Paulo S. Saiki pela grande amizade, paciência, companheirismo e valorosas orientações profissionais e de vida.*

*Ao Dr. Celso Rubens Vieira e Silva, pela amizade, ensinamentos profissionais e de vida.*

*Ao Dr. Walter Stefanuto, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da PUC – Sorocaba e colega de trabalho, pela valorosa amizade e auxílio constante.*

*A senhora Sivia Maria Piacentine Paes de Almeida, pela amizade, orientação e valioso auxílio prestado na obtenção dos resultados.*

*Aos funcionários da Disciplina de Patologia Adriano Luís Martins, Ana Cristina do Amaral, Maria Helena de V. Perón e Rosa Maria Fornasier, pela convivência, amizade e colaboração no meu desenvolvimento científico.*

*A bióloga Silvania Machado do Núcleo de Apoio à Pesquisa e Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”. Pelos ensinamentos valiosos prestados em microscopia eletrônica, apoio e amizade.*

*Aos amigos do curso de pós-graduação em Biologia e Patologia Buco Dental e à todos, que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.*

## SUMÁRIO

<i>Capítulo</i>	<i>Página</i>
1. Resumo.....	01
2. Summary.....	02
3. Introdução.....	03
4. Revisão da Literatura.....	04
4.1. Células Fagocitárias na Paracoccidiodomicose.....	11
4.2. Paracoccidiodomicose Bucal.....	15
4.3. Histopatologia da Paracoccidiodomicose.....	17
4.4. Ultraestrutura da Paracoccidiodomicose.....	21
5. Objetivos.....	26
6. Material e Métodos.....	27
7. Resultados.....	29
8. Discussão.....	49
9. Conclusões.....	61
10. Referências Bibliográficas.....	62-87

## Resumo

### **Características Ultraestruturais da Paracoccidioidomicose Bucal**

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica que freqüentemente envolve a mucosa bucal, provocando lesões de aspecto granular, eritematoso e ulcerado, chamado de moriforme. Embora as características ultraestruturais da Paracoccidioidomicose têm sido estudadas desde a década de 60, não há descrições de seus aspectos ultraestruturais nas lesões bucais. O objetivo deste trabalho foi descrever as características ultraestruturais das lesões bucais da paracoccidioidomicose em microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Material de 14 biópsias de paracoccidioidomicose bucal foram processadas para observações em microscopia eletrônica de transmissão e 06 biópsias para observações em microscopia eletrônica de varredura. Os achados ultraestruturais em microscopia eletrônica de transmissão mostraram fungos viáveis, pequenos no interior de macrófagos e com interface larga entre o parede do fungo e o fagossomo. Fungos com brotamentos eram maiores, com vários vacúolos e circundados por macrófagos epitelióides e/ou células gigantes no interior de granulomas. No centro dos granulomas observamos inúmeras projeções de membrana circundado fungos maiores com ou sem brotamentos. Fungos destruídos mostravam íntimo contato com as células de defesa e estavam presentes no interior dos fagossomos, os quais mostravam alterações da membrana celular e perda de seu conteúdo, permanecendo apenas a parede externa no interior do fagossoma. Eosinófilos foram observados em contato com fungos viáveis, mostrando interface larga entre o fungo e a célula. Raramente observamos fungos no interior das células epiteliais, com ou sem brotamento, sendo importante na patogenia dos microabscessos intraepiteliais. A microscopia eletrônica de varredura revelou a superfície das lesões bucais, mostrando alterações apenas nas áreas com microabscessos. Os microabscessos em formação alteram a superfície das células epiteliais envolvidas, elevando a região central que torna-se ovalada com conteúdo escurecido e recoberta fina membrana translúcida. A região periférica é lisa e deprimida. Microabscessos próximos formam lesão coalescente com posterior rompimento resultando em micro-erosões e liberação de seu conteúdo, possibilitando a coleta do fungo nos exames citopatológicos.

## Summary

### Ultrastructural features of the buccal Paracoccidioidomycosis

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis that frequently involves the buccal mucosa, causing granular, erythematous and ulcerated lesions, called mulberry-like (framboesiform). Although the ultrastructural features of paracoccidioidomycosis have been studied since 1960, there are no detailed descriptions of ultrastructural characteristics of the oral lesions. The aim of this work was to describe the main ultrastructural aspects by transmission and scanning electronic microscopy of the oral paracoccidioidomycosis lesions.

Ten biopsies of buccal paracoccidioidomycosis were analyzed by transmission electronic microscopy and six biopsies were observed in scanning electron microscopy. Ultrastructural findings in transmission electronic microscopy showed viable and small fungi inside of macrophages and with wide interface between fungus wall and phagosomes. Fungi presenting budding were large, with numerous vacuoles and circumscribed for epithelioid macrophages and/or giant cells in the granulomas. In the center of the granulomas numerous membrane projections circumscribing large fungi with or without budding were observed. Disruptive fungi displayed intimate contact with the white cells and they were presented inside of phagosomes, which showed cellular membrane alteration and lose of your content, enduring only the exterior wall inside of phagosome. Eosinophiles were detected in contact with viable fungi, showing wide interface between the fungus and the cell. Scanning electron microscopy revealed the buccal lesions surface, displaying alteration only in the microabscess areas. Microabscess in formation change a epithelial cell, and your peripheral and central surface shows crowned forming a valley between this two surfaces. Central region still exhibited a tenuous and dark cell surface. The disruptive microabscess constitute microulcerations, with the presence of desquamatives and irregular or destroyed epithelial cells and with the presence in the surface of inflammatory cells and erythrocytes. We observed in the microulcerations reparation areas the formation of subjacent epithelial layer with common features. Therefore, the fungus affects simultaneously different regions of the buccal lesions occurring formation and reparation of microulcerations, constituting the mulberry-like aspect.

## INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose é uma micose profunda, com ampla gama de manifestações clínicas e patológicas, conseqüentes a penetração do *Paracoccidioides brasiliensis* no hospedeiro, representando sério problema de doença infecciosa no Brasil e em outros países da América Latina (FRANCO et al., 1989). O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico que nos tecidos humanos mostra-se na forma de levedura, geralmente com múltiplos brotamentos (SAN BLAS & SAN BLAS, 1985; LACAZ, 1994).

Está bem estabelecido que as características da reação inflamatória dependem da interação do agente agressor com o hospedeiro. Um mesmo agente agressor pode estimular uma resposta predominantemente celular ou humoral, que pode ser modificada em casos de imunossupressão, com quadros clínicos e microscópicos variados (de BRITO et al., 1994). A formação de granulomas representa uma resposta de defesa efetiva do organismo, resultando na presença de poucos microorganismos, como ocorre na hanseníase tuberculóide (FRANCO et al., 1994). A manifestação bucal da paracoccidioidomicose ocorre na forma mucocutânea da doença, com envolvimento inicial dos pulmões, predominantemente em adultos do sexo masculino (de ALMEIDA et al., 1991). Na boca, as lesões geralmente envolvem várias áreas simultaneamente, com aspecto granular, eritematoso e ulcerado, chamado de moriforme. Muitas vezes o diagnóstico da doença é feito pelas lesões bucais e, embora os aspectos clínicos sejam bastante sugestivos, geralmente a confirmação é feita por citologia, biópsia (de ALMEIDA et al., 1991; de ARAÚJO M.S.; 2001) ou sorologia (BLOTTA et. al., 1999). O quadro microscópico caracteriza-se por hiperplasia pseudoepiteliomatosa, microabscessos intraepiteliais, infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear, presença de células gigantes e granulomas, além de quantidade variável do fungo na forma de levedura (SCULLY et al., 1992; VILLABA, H., 1998). Embora as características microscópicas das lesões sejam bem conhecidas, há poucas descrições ultraestruturais dos parâmetros bucais da paracoccidioidomicose.

## Revisão da Literatura

A paracoccidioidomicose foi descrita inicialmente por LUTZ (1908a, 1908b) sendo sua denominação consagrada apenas em 1970 após reunião dos micólogos das Américas, na Colômbia (Lacaz C.S., 1982). É uma micose profunda, que apresenta uma ampla gama de manifestações clínicas e patológicas, todas elas iniciadas por penetração do fungo no hospedeiro. O homem parece ser o único hospedeiro susceptível à infecção natural, e seu estudo assume importância cada vez maior, dado o aumento crescente dessa micose e, principalmente devido à gravidade de algumas de suas formas clínicas.

A paracoccidioidomicose se manifesta de forma endêmica na maioria dos países da América Latina como Argentina, Colômbia, Venezuela e principalmente no Brasil, onde se encontram cerca de 80% dos casos relatados (RESTREPO, 1985; FRANCO, 1987b; FRANCO et al., 1989). A paracoccidioidomicose é rara na Amazônia e no nordeste brasileiro, regiões úmidas e áridas respectivamente. Entretanto, 17 casos da doença foram descritos na região Amazônica durante o período de 1992-1994, e foi considerada a micose mais comum da região, quando comparada com outras micoses pulmonares (FERREIRA et al., 1995). Com exceção de um caso em Trinidad, a micose não tem sido relatada nas ilhas do Caribe, nas Guianas, Suriname e no Chile. Na América Central, a paracoccidioidomicose tem sido descrita em todos os países, exceto Belize e Nicarágua (BRUMMER et al., 1993). Casos fora da América Latina foram relatados em pessoas que permaneceram durante algum período em áreas endêmicas (CHIKAMORI et al., 1984; PADILHA-GONÇALVES, 1985; MANNS et al., 1996; TOMIMORI-YAMASHITA et al., 1997; BURNS et al., 2000). Nas áreas endêmicas no Brasil, a doença causa aproximadamente 200 mortes ao ano (COUTINHO et al., 1998).

Seu agente etiológico, o *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), classificado de forma definitiva por ALMEIDA (1930), é um fungo dimórfico, que cresce a 37°C na forma de levedura, com parede dupla e múltiplos brotamentos em forma de roda de leme e à temperatura ambiente na forma de finos filamentos septados, sem estruturas típicas, dando origem ao micélio (SAN BLAS & SAN BLAS, 1985; KASHINO et al., 1987).

Nos tecidos é encontrado na forma de levedura, com aspecto arredondado, esférico ou oval e dupla membrana refringente. Na maioria das vezes exibem célula mãe com

brotamentos múltiplos, ligados por um pedúnculo, que é sua característica mais evidente (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1977; LACAZ, 1994; TOLEDO et al., 1995). A impregnação pela prata (Gomori-Grocott) e pelo ácido periódico de Shiff (P.A.S.) passaram a ser utilizados para melhor detectar o fungo nas lesões. Técnicas histoquímicas auxiliam no entendimento dos componentes estruturais do fungo e nas suas implicações quanto virulência e resposta do hospedeiro. Sabe-se que não há melanina na parede do *P. brasiliensis*, sendo evidente porém na doença de Jorge Lobo, onde a presença de melanina parece estar relacionado com a virulência e resistência do fungo contra as células de defesa (TABORDA et al., 1999).

Seu habitat ainda é desconhecido, o que dificulta o esclarecimento da história natural desta micose. Fortes evidências mostram que, como outros agentes de micoses sistêmicas, o *P. brasiliensis* penetra no organismo humano por inalação, provocando um complexo primário no pulmão, sendo que vários autores chamam a atenção para a frequência com que este órgão é comprometido (MACKINNON, J.E., 1959, GONZÁLEZ-OCHOA, A., 1971; GIRALDO R. et al., 1979; CHIKAMORI T. et al., 1984; BHASKAR, 1989; BRETANA A., 1995, LONDERO et al., 1996), podendo ocorrer disseminação hematogênica e/ou linfática (GONZÁLEZ-OCHOA, A., 1971; FRANCO et al., 1989; LACAZ C.S., 1994; LONDERO et al., 1996).

O fungo já foi cultivado em diferentes substratos naturais (RESTREPO, M.A., 1978; MOSCARDI-BACCHI et al., 1989) e pelo menos em uma ocasião isolado de uma área rural da Argentina (NEGRONI, R., 1968) e da Venezuela (ALBORNOZ, M.B. & CABRAL, N.A., 1976). Recentemente, SILVA-VERGARA ET. AL. (1998) isolaram uma espécie de *P. brasiliensis* em solo cultivado por plantação de café na cidade da Ibia no estado de Minas Gerais - Brasil e concluiu que os solos cultivados por café podem ser mais um habitat natural do *P. brasiliensis*, suportando a hipótese de infecção adquirida em atividades rurais.

A paracoccidioidomicose com isso, tem um impacto econômico e social importante pois afeta, principalmente, trabalhadores rurais, em contato constante com a vegetação e o solo (RESTREPO et al., 1970; MARQUES et al., 1983; FRANCO, 1994; BERNARD et al., 1997). Na forma aguda, apesar de uma menor frequência, jovens de ambos os sexos são afetados em igual proporção e a doença geralmente é severa e disseminada, indicando

que o *P. brasiliensis* infecta tanto homens como mulheres, envolvendo principalmente o sistema reticuloendotelial com envolvimento ósseo nos casos mais avançados (MIGLIARI et al., 1998). Entretanto, na doença crônica do adulto há predominância de homens infectados em relação às mulheres na faixa etária entre 30 a 49 anos, chegando à proporção de 25 homens para cada mulher afetada. BLOTTA et. al. (1999) revisou 584 casos atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – UNICAMP, Brasil e verificou que 84% dos pacientes eram homens com idade entre 41 a 50 anos de idade, afetando preferencialmente trabalhadores rurais totalizando 46%, mostrando proporção entre homens e mulheres em 5.4:1. Nesse trabalho, o número elevado de mulheres afetadas foi justificada pelo aumento da atividade rural de mulheres pós-menopausa na região e pelo local de tratamento ser Ponto de Referência na região de Campinas. Recentemente, analisamos 64 pacientes com paracoccidioidomicose bucal, atendidos na Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP e verificamos que 93% dos pacientes infectados eram homens com idade média de 43 anos, mostrando uma proporção entre homens e mulheres de 15:1.

Estudos “*in vitro*” demonstraram que estrógenos atuam inibindo a transformação de micélio ou conídea em levedura, evento fundamental na instalação da infecção (RESTREPO et al., 1984; SALAZAR et al., 1988). Paralelamente, foi demonstrada a presença de uma glicoproteína de 60Kda, identificada como receptor para o estradiol na membrana citoplasmática de *P. brasiliensis* tanto na fase micelial como leveduriforme, evitando a transformação da forma micelial em levedura (LOOSE et al., 1983). Decorrente ao efeito protetor do hormônio feminino a incidência desta micose em mulheres com atividade hormonal é baixa, chegando à proporção de 25 homens para cada mulher afetada (ARISTIZABAL et al., 1998).

A paracoccidioidomicose, como outras micoses profundas, manifesta-se sob a forma de infecção ou doença. A paracoccidioidomicose-infecção caracteriza-se pela ausência de sinais ou sintomas clínicos, embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica, evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioiodina (LACAZ et al., 1956). Apesar deste teste não responder em pacientes com a forma severa da doença (MENDES et al., 1971), devido à deficiência da imunidade celular (MENDES, 1975) associada ao aumento supressor da atividade das células T (MOTA et al., 1988).

O foco de infecção pode regredir com a destruição do fungo, permanecer na forma latente com fungos viáveis ou, dependendo das condições do hospedeiro e da virulência do fungo, progredir comprometendo diferentes órgãos ou sistemas, levando ao aparecimento de sintomas (FRANCO, 1987a). RESTREPO, A. (2000) sugere ainda, nos casos latentes com fungos viáveis, que esta micose deva necessitar de muitos anos para manifestar de forma clínica de doença, fato este observado em pacientes que desenvolvem a doença fora das áreas endêmicas, muitos anos depois de terem estado nestas áreas, os quais mostram fungos viáveis porém com poucos brotamentos e pequenos. Mais raramente pode ocorrer apenas à formação de uma lesão pulmonar solitária assintomática em forma de um nódulo paracoccidioidal, chamado de paracoccidioidoma. Há apenas dez casos relatados na literatura, sendo que comprovados com investigação histológica apenas quatro (ALVES DOS SANTOS et al., 1997).

As manifestações clínicas da micose são as de doença granulomatosa crônica apresentando uma gama de sinais e sintomas agrupados em dois padrões principais que definem as suas formas aguda e crônica (FRANCO et al., 1987b). A forma aguda é habitualmente severa, de evolução rápida, afetando predominantemente o sistema fagocitário mononuclear (baço, fígado, linfonodo e medula óssea). Nesta forma clínica, o envolvimento da mucosa é pouco freqüente acometendo 17 a 20% dos pacientes, sendo raro nos pulmões onde é observado em apenas 5% dos casos (BARBOSA, 1991). A forma crônica tem duração prolongada, freqüentemente excedendo seis meses, instalação lenta e gradual e as lesões permanecem localizadas (forma unifocal) ou envolvem mais de um órgão ou sistema (forma multifocal), como pele, mucosas, gânglios linfáticos, medula óssea, supra-renais, baço, fígado, intestinos, articulações, ossos, sistema nervoso (PADILHA-GONÇALVES, 1985; LONDERO et al., 1986; COLOMBO et al., 1994; MOURA et al., 1994; BLOTTA et al., 1999), sendo que em mais de 90% dos casos encontram-se lesões pulmonares, evidenciando um quadro grave e, algumas vezes fatal. Nos tecidos desses pacientes observa-se tendência à formação de granuloma organizado (FRANCO et al., 1993; MENDES, 1994). A forma aguda e crônica da doença é difícil de ser determinada em pacientes com imunossupressão pela infecção por HIV, os quais mostram indicativos clínicos de uma infecção descontrolada com disseminação linfohematogênica, semelhante à forma aguda da doença, porém, esta infecção

provavelmente resulta de foco latente reativado, semelhante a forma crônica da doença com lesões de mucosa (**BERNARD & DUARTE, 2000**).

Entre estes dois extremos, diversos quadros clínicos podem ocorrer, sendo os pulmões, linfonodos, tecido mucocutâneo e glândulas adrenais os mais comumente envolvidos (**GIRALDO et al., 1976; FRANCO et al., 1987a; COLOMBO et al., 1994**), podendo ainda afetar mais raramente a bolsa escrotal **TOMIMORI-YAMASHITA et al., (1997)**.

As diferentes formas clínicas não devem estar relacionadas somente a fatores inerentes ao hospedeiro, mas também às características do agente infectante, principalmente sua virulência (**KERR I.B., 1988**). **SAN-BLAS & SAN-BLAS (1977)**, mostraram com auxílio de técnicas citoquímicas, que a virulência do parasito está relacionada com a presença de  $\alpha$ -1-3-glucana na parede celular do fungo, enquanto que mutantes do mesmo, com  $\alpha$ -manana perdem seu poder patogênico.

É bem conhecido que as amostras de *P.brasiliensis* variam quanto à virulência, fato este que pode auxiliar na explicação quanto à existência de diferentes manifestações clínicas da doença (**FRANCO et al., 1989**). Resultados experimentais têm demonstrado claramente esta variabilidade entre as amostras de *P.brasiliensis*, e que esta virulência é influenciada pela estocagem e passagem “*in vitro*” dos isolados (**ZACHARIAS et al., 1986; BRUMMER et al., 1990; KASHINO et al., 1990**). De fato, **SVIDZINSKI et al. (1999)**, mostraram que isolados de *P.brasiliensis* obtidos de pacientes com doença crônica e aguda exibem diferenças morfológicas após passagem animal, confirmando o polimorfismo exibido por este fungo e evidencia mais um fator que pode contribuir para sua patogenicidade após passagem animal, pois sabe-se que subcultivos sucessivos de *P.brasiliensis* acarretam a perda de sua patogenicidade que pode ser revertida pelo reisolamento do agente após passagem animal (**BRUMMER et al., 1990; KASHINO et al., 1990; FINQUELIEVICH et al., 1993; SINGER-VERMES et al., 1994**).

Embora já tenham sido descritos diferentes padrões de virulência, definidos pela infecção experimental em camundongos B10A, **SINGER-VERMES et al. (1989)** estudaram amostras de *P.brasiliensis* recém isoladas de pacientes com diferentes formas clínicas, para avaliar se a gravidade da doença humana estava associada à virulência da amostra isolada. A patogenicidade de cada isolado avaliado não mostrou associação entre a

forma clínica da doença e o padrão de virulência observado em camundongos. Observou-se, contudo, associação apenas em isolados fúngicos obtidos de casos brandos quando comparados aos isolados obtidos de casos mais severos. (SINGER-VERMES et al., 1994).

XIDIEH et al. (1999), avaliaram a influência genética no padrão das lesões desenvolvidas em ratos resistentes e suscetíveis infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*, e observaram que os animais resistentes mostravam um padrão inflamatório rico em neutrófilos nos meses iniciais, passando após o segundo mês, para um infiltrado predominantemente mononuclear, com macrófagos tipo-xantomatosos, os quais predominavam durante os períodos restantes, com formação de lesões granulomatosas e colágeno do tipo I, mostrando um provável controle da infecção. Já os animais suscetíveis, mostraram apenas um padrão inflamatório rico em plasmócitos, com lesões não granulomatosas, durante todos os períodos avaliados (6 meses após infecção inicial), concluindo que a análise histopatológica comparativa demonstrou a influência do padrão genético do hospedeiro nas lesões desenvolvidas por ratos resistentes e suscetíveis a infecção por *P. brasiliensis*.

Mais recentemente, KASHINO et. al. (2000) demonstrou que a produção prolongada de Interferon-gama, IL-2 e secreção predominante de anticorpos IgG2a estão associados com resistência para *P. brasiliensis*. Em contraste, a produção de baixos níveis de Interferon-gama, secreção prematura de altos níveis de IL-5 e IL-10, eosinofilia, e secreção preferencial de isotipos IgG2b e IgA caracterizam doença progressiva em animais susceptíveis. Além destes fatores, cura ou progressão da doença podem também estar relacionados com a efetiva ativação ou não de diferentes populações de linfócitos T por macrófagos e/ou das células apresentadoras de antígenos (ALMEIDA & LOPES, 2001).

Portanto o estabelecimento da doença, sua disseminação e gravidade dependem tanto de fatores inerentes ao próprio fungo, como virulência e composição antigênica, como das condições ambientais e principalmente dos fatores ligados ao hospedeiro, como idade, sexo, estado nutricional, patrimônio genético e capacidade de resposta imunológica. Em relação a este último fator, estudos clínicos e experimentais têm sugerido a interação entre mecanismos inespecíficos e específicos de defesa que atuam na resistência ao *P. brasiliensis* (FRANCO et al., 1993; CALICH et al., 1994; PERAÇOLI et al., 1995), como respostas imunes do tipo humoral e celular (MOK & GREER, 1977; MENDEZ, 1975; ARANGO

et al., 1982; SASSINE et al., 1985), levando a produção de anticorpos específicos que geralmente refletem a severidade da doença. Distúrbios imunorregulatórios associados a paracoccidiodomicose, podem acarretar em uma disseminação do fungo pelos tecidos, efeito este ocasionado principalmente pela depressão das células “*natural Killer*”, ocorrendo principalmente na fase tardia da infecção (PERAÇOLI et al., 1995).

O diagnóstico da paracoccidiodomicose depende da demonstração do agente etiológico em espécimes obtidos do paciente, tais como escarro, pus, raspados de lesão e biópsia (HIRSH et al., 1984; de ALMEIDA et al., 1991; VILLALBA H., 1998; de ARAÚJO M.S.; 2001). A visualização do fungo no material biológico, seu cultivo e a inoculação em animais de laboratório são conclusivos para o diagnóstico da doença (MEYER, 1986; de ALMEIDA et al., 1991).

Todavia, nem sempre é possível obter-se com facilidade material para exame micológico, principalmente em pacientes com manifestações somente em órgãos internos. Nestes casos, as provas sorológicas são de grande valor diagnóstico fornecendo evidências indiretas da infecção ou conduzindo à pesquisa do fungo (MARIAT, 1982; SIQUEIRA, 1982). Em 467 pacientes BLOTTA et al. (1999) mostrou que 80% dos casos apresentaram teste sorológico positivo para paracoccidiodomicose, mostrando a importância da análise sorológica como auxiliar diagnóstico.

A avaliação da imunidade pode ser feita por testes tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” (MENDEZ, 1975; MOK & GREER, 1977). A realização destas provas, na paracoccidiodomicose, permitiu identificar dois pólos clínico-imunológico da doença (MUSATTI et al., 1976; MENDES, 1980; YARZABAL et al., 1980), as formas polares anérgicas, processos graves e de mau prognóstico e as forma hiperérgicas, processos localizados e com boa resposta terapêutica, onde o comprometimento da imunidade é mínimo.

Nas formas localizadas da doença existe hipersensibilidade cutânea retardada e baixos títulos de anticorpos específicos. Ao contrário, nas formas progressivas, observam-se vários graus de anergia cutânea e altos títulos de anticorpos (SASSINE et al., 1985). A resposta timo-dependente está freqüentemente deprimida em pacientes com processos graves e de longa duração. A causa desta imunodeficiência é pouco conhecida, porém a

recuperação da atividade das células T, após o tratamento sugere que seja adquirida e reversível (MOK & GREER, 1977; SASSINE et al., 1985).

Embora a presença dos anticorpos não tenha efeito protetor, é de grande importância médica, uma vez que decresce sob efeito da terapia antifúngica, o que está associado à melhora clínica do doente.

### **Células Fagocitárias na Paracoccidioidomicose.**

As células fagocitárias desempenham papel essencial na resistência do *P.brasiliensis*, assim como ocorre em outras doenças infecciosas, atuando como as principais células efetoras frente a essas infecções.

Estudos têm demonstrado que, após a instalação dos fungos nos tecidos, os leucócitos polimorfonucleares são rapidamente atraídos para o local por ação de substâncias quimiotáticas resultantes de ativação do sistema complemento. Além disso, o fungo interagindo com macrófagos alveolares induz à liberação de peptídeos, que atraem neutrófilos ao foco de infecção (CALICH et al., 1994).

Neutrófilos de pacientes com paracoccidioidomicose, apesar de fagocitarem o *P.brasiliensis* "in vitro", são incapazes de digerir o fungo (GOHMAN-YAHR et al., 1989). Esse defeito parece ser específico para o *P.brasiliensis* uma vez que estas células conseguem digerir *C.albicans* (JENSEN et al., 1994). Esse defeito no processo de digestão foi observado em relação a microorganismos vivos ou autoclavados, mas não para fungos mortos por Anfotericina B. Esse processo poderia explicar, em parte, os efeitos terapêuticos da droga que, destruindo a membrana celular da célula fúngica, a tornaria mais suscetível à fagocitose (GOHMAN-YAHR et al., 1989). A ultraestrutura dos neutrófilos mostra grânulos intracitoplasmáticos eletrodensos arredondados chamados de azurófilos, grânulos específicos pouco eletrodensos e ovalados, por ser polimorfonuclear seu núcleo mostra-se em três a quatro partes separadas, mitocôndrias, retículo endoplasmático e Golgi são menos proeminentes e difíceis de serem vistos (BAINTON DF, 1999 e 1993; BORREGAARD et al., 1993; BAINTON et al., 1971).

A atividade fagocítica de polimorfonucleares é normal em pacientes com paracoccidioidomicose, todavia estas células apresentam menor capacidade de digerir

células leveduriformes de *P. brasiliensis*, assim como macrófagos peritoneais e pulmonares de camundongos normais são incapazes de limitar a multiplicação de leveduras do *P. brasiliensis* fagocitadas (GOIHMAN-YAHR et al., 1979; BRUMMER et al., 1989; GOIHMAN-YAHR et al., 1980; GOIHMAN-YAHR et al., 1990; GOIHMAN-YAHR et al., 1992).

As células fúngicas apresentaram intensa multiplicação no interior dos macrófagos, podendo destruí-los. Este fato pode ter implicações importantes na patogênese da doença, sugerindo que, “*in vivo*”, provavelmente, o fungo se multiplica intracelularmente após a ingestão por macrófagos não ativados, levando à destruição das células e a liberação de inúmeras formas de *P. brasiliensis*. Assim, os macrófagos poderiam servir como meio de disseminação para o fungo (MOSCARDI-BACCHI et al., 1994).

Embora monócitos e macrófagos sejam inicialmente permissivos à multiplicação intracelular de alguns patógenos, estas células eventualmente se tornam ativadas e podem interferir com o crescimento desses microorganismos (MOSCARDI-BACCHI et al., 1994). Macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  ou linfocinas não purificadas adquirem a capacidade de digerir o *P. brasiliensis*, podendo desempenhar funções efetoras importantes contra o fungo (BRUMMER et al., 1988b; BRUMMER et al., 1989). CANO et al. (1992) verificaram que macrófagos cultivados em presença de linfocinas obtidas de células do baço de animais imunizados aumentaram a sua capacidade de destruir conídeos.

A importância dos macrófagos na destruição do fungo também têm sido demonstrada em modelos experimentais. KASHINO (1990), utilizando linhagens de camundongos resistentes (A/Sn) e suscetíveis (B10.A) à infecção pelo *P. brasiliensis*, estudou o efeito prévio dos macrófagos com suspensão de carvão coloidal, observando que ambas as linhagens tornam-se mais sensíveis à infecção pelo *P. brasiliensis* após tratamento. Ainda, referente ao processo de ativação dos macrófagos neste modelo isogênico, os resultados demonstraram que células peritoneais e broncoalveolares de animais A/Sn apresentaram maior liberação de peróxido de hidrogênio quando comparados a dos animais B10.A (TEIXEIRA, 1991; CANO et al., 1995). Os mecanismos, pelos quais os macrófagos ativados são capazes de restringir a multiplicação do *P. brasiliensis*, ou mesmo destruí-lo, ainda são pouco conhecidos. Um mecanismo que pode ser importante,

envolve a ação de produtos do metabolismo oxidativo, processo que se estabelece durante a fagocitose.

**McEWEN et al. (1987)** demonstraram que neutrófilos de camundongos sensibilizados com *P. brasiliensis* e estimulados com o fungo morto, por via intraperitoneal, apresentavam maior atividade fungicida “*in vitro*”. Essa atividade se correlacionou com uma intensa produção de metabólitos do oxigênio, confirmando resultados anteriores de que produtos do metabolismo oxidativo, como a produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos, juntamente com a mieloperoxidase e íons iodo, parecem estar envolvidos na destruição das formas de levedura do fungo (**McEWEN et al., 1984**). **BRUMMER et al. (1988a)** observaram que a atividade fungicida apresentada por macrófagos murinos ativados não era inibida na presença de superóxido dismutase, catalase, dimetil-sulfoxida ou azida. Estes resultados indicam que formas de levedura de *P. brasiliensis* podem ser digeridas por macrófagos ativados por um mecanismo independente dos produtos do metabolismo oxidativo. **NICHOLS et al., (1971)**, descreveu os aspectos ultraestruturais dos macrófagos, observando núcleo claro, geralmente excêntrico, ovalado ou irregular, com dois ou mais nucléolos (região mais eletrodensa), grânulos azurófilos eletrodensos, retículo endoplasmático pouco desenvolvido, grande quantidade de mitocôndrias e complexo de Golgi bem desenvolvido.

Eosinófilos têm sido relatados com frequência nos achados celulares da resposta inflamatória frente a paracoccidioidomicose. **URIBE et al., (1987)** relatam terem encontrado a presença de eosinófilos em 50% dos casos analisados. **BURGER et al. (1996)** verificaram aumento na presença de eosinófilos após a quarta semana de infecção pelo *P. brasiliensis* no seu modelo de estudo em camundongos, porém estas células foram observadas em todos os períodos do experimento. **BAINTON & FARQUHAR (1970)** descreveram a ultraestrutura dos eosinófilos, evidenciando grânulos intracitoplasmáticos ovalados que mostravam região central eletrodensa e com aspecto cristalóide (*internum*) envolvida por área clara eletrodensa (*externum*), por apresentar núcleo biolobulado verificou duas partes separadas com cromatina finamente granulosa e eletrodensa. Os grânulos ocupavam quase a totalidade do citoplasma sendo maiores do que os grânulos dos neutrófilos.

Eosinófilos são células sanguíneas que se acumulam em grande número em tecidos como nasofaringe, pulmões, pele, intestino e trato genito-urinário (FOOT, 1965; HUDSON, 1968; SPRY, 1971). Sabe-se que estas células participam como moduladores de reações de hipersensibilidade do tipo I (Tipo anafilática) (ROBINS et al., 1994) e aumentam em número em doenças de origem desconhecida como na úlcera eosinofílica, mas principalmente em doenças parasitárias com na esquistossomose (VADAS et al., 1979) e na doença de chagas (MOLINA et al., 1989). Estudos efetuados por SARAN (1975), demonstraram que a atividade fagocítica do eosinófilo para *Staphilococcus aureus* é aumentada, quando esses microorganismos estão associados a anticorpos. Poucos estudos porém descrevem o papel do eosinófilo nas resposta imunes contra infecções fúngicas. DRUTZ & CATANZARO (1978) verificaram aumento de 3-10% de eosinófilos no sangue de paciente infectado com Coccidiodomicose, causada pelo fungo *Coccidioides immitis*, porém há poucos casos na literatura de pacientes portadores de coccidiodomicose com elevado aumento de eosinófilos no sangue periférico ou líquido cerebro-espinhal, como mostra os trabalhos de SCHERMOLY & HINTHORN (1988) e HARLEY & BLASSER (1994). Três casos de pacientes portadores de paracoccidiodomicose com envolvimento da medula óssea foram descritos na literatura com eosinofilia de sangue periférico (SHIKANAI-YASUDA et al., 1992). Em microscopia óptica geralmente pode-se observar a presença de eosinófilos em meio ao processo inflamatório. Recentemente mostramos que em 64 biópsias de pacientes portadores de paracoccidiodomicose bucal, 92,18% dos pacientes apresentaram a presença de eosinófilos em meio ao processo inflamatório, sendo que em 20% dos casos estavam presentes de forma intensa, porém não houve correlação entre a quantidade de eosinófilos e quantidade de fungos nas biópsias avaliadas.

Recentemente, WAGNER et al. (1998) através de imunofluorescência com anticorpo policlonal anti-MPB e imunofluorescência de coloração dupla, determinaram a presença de eosinófilos e depósitos extracelulares de proteína básica maior em biópsias de pacientes com paracoccidiodomicose. Os autores observaram associação entre *P.brasiliensis*, presença dos eosinófilos e depósitos de proteína básica maior sobre o fungo, podendo estas células então estarem relacionadas com o prognóstico e tratamento, porém ainda não esclarecido.

## **Paracoccidioidomicose Bucal.**

Desde a descrição de estomatite ulcerosa moriforme de **MOTTA & PUPO (1936)**, as lesões de mucosa têm chamado a atenção e em muitos casos são o motivo da suspeita da Paracoccidioidomicose, estando a teoria da porta de entrada do fungo através de traumatismo envolvendo as mucosas (**BOGLIOLO et al., 1946a, 1946b; 1950**) hoje descartada.

A avaliação clínica da boca é muito importante, uma vez que 30 a 50% dos casos apresentam manifestações bucais como queixa principal (**GONZAGA et al., 1995**), sendo comum o aparecimento de lesões inflamatórias granulomatosas crônicas e progressivas que envolvem várias áreas simultaneamente, com aspecto granular, eritematoso e ulcerado, chamado de moriforme, afetando principalmente os lábios, bochechas, soalho da boca, língua e faringe (**BHASKAR, 1989; de ALMEIDA et al., 1991; SPOSTO et al., 1993**). Na paracoccidioidomicose juvenil pode haver envolvimento ósseo devido a disseminação do fungo para a medula óssea, promovendo lesões destrutivas evidenciadas em exames radiográficos, afetando principalmente periodonto de sustentação (**MIGLIARI et al., 1998**), podendo ainda provocar, de forma mais rara, lesões perfurantes no palato (**CASTRO et al., 2001**)

As lesões bucais são consideradas como secundárias do envolvimento pulmonar e muitas vezes o diagnóstico da doença é feito por citologia ou biópsia destas lesões (**SPOSTO et al., 1994**). Estudos mostram que ocorre eliminação do fungo via formação de microabscessos no tecido epitelial, sendo possível sua visualização em preparados citológicos para microscopia óptica (**FRANCO & MONTENEGRO, 1982; URIBE et al., 1987**). Geralmente os pacientes acabam procurando ajuda médica ou odontológica devido às ulcerações bucais, associadas a dor bucal ou de garganta, tosse com expectoração e dispnéia **BLOTTA et al., (1999)**. Portanto é importante a atuação do cirurgião-dentista frente a paracoccidioidomicose, uma vez que as lesões bucais são em geral o motivo principal da procura por tratamento (**MOTTA & PUPO 1936**).

Evidências indicam que *P.brasiliensis* nas lesões bucais são conseqüência da disseminação do fungo no organismo (**FRANCO et al., 1994**). Porém deve-se considerar que os tecidos gengivais geralmente apresentam-se alterados, devido a constantes injúrias

causadas pela placa bacteriana e traumatismos, alterando a permeabilidade dos vasos, que podem facilitar a instalação do fungo. Deve-se também considerar que o escarro contaminado pode trazer o fungo para áreas ulceradas da boca. De fato, **BOOP (1955)**, **SOARES & IABUKI (1974)** e **CASTRO et al. (1975)** descreveram casos em que a micose se desenvolveu a partir de traumatismos.

Em 1963, **FONSECA** publicou trabalho de revisão de literatura a respeito das lesões dentárias e periodontais e apresentou estudo histopatológico em material de biópsias de 25 casos de paracoccidioidomicose. Encontrou *P. brasiliensis* em 11 casos, com lesões clinicamente diagnosticadas como periodontite, e em 4 de 19 com diagnóstico de granulomas periapicais. Embora o autor não tenha proposto que em seus casos a porta de entrada fosse a dentária (bucal), chamou a atenção para a frequência com que o fungo foi encontrado em tais lesões.

**LAUANDE (1975)** estudou as lesões orais da paracoccidioidomicose, concluindo ser “o tecido periodontal o de maior receptividade ao desenvolvimento e reprodução do parasita”. Nesse estudo o autor avaliou 25 pacientes, dos quais 11 com biópsias de periodonto e em 8 destas encontrou fungos nas lesões. Apesar de ter encontrado fungos em lesões caracteristicamente periodontais e ter referido o isolamento do *P. brasiliensis* do periodonto de pacientes sem qualquer manifestação clínica da doença, não conseguiu descartar a hipótese de uma contaminação por via inalatória.

Poucos trabalhos de paracoccidioidomicose bucal, na literatura inglesa, são relatados. **de ALMEIDA et al. (1991)** revisaram 5 trabalhos, da literatura inglesa, que relataram manifestações bucais de paracoccidioidomicose em pacientes residentes fora das áreas endêmicas, mas que residiram durante algum tempo nestas áreas. Os mesmos autores ainda relataram a importância do conhecimento da história pregressa do paciente, podendo auxiliar no diagnóstico conclusivo da doença.

Em nosso estudo recente, observamos as características clínicas e microscópicas da Paracoccidioidomicose bucal. Em 64 pacientes avaliados e biopsiados encontramos geralmente múltiplas lesões na cavidade oral, que variavam seu aspecto desde lesões tipicamente moriformes, com superfície granuloso com pontos hemorrágicos até lesões ulceradas com bordos elevados, importante no diagnóstico diferencial com carcinoma espinocelular. Os locais freqüentemente biopsiados em nossos casos correspondiam às

áreas de maior incidência, predominando na região de mucosa jugal, seguida do palato, mucosa alveolar, lábios e gengiva. Na língua e assoalho bucal foram os locais menos freqüentes.

Vários autores chamam a atenção para o diagnóstico diferencial desta doença com outras doenças infecciosas ou neoplásicas como carcinoma, tuberculose, leishmaniose, coccidioidomicose, histoplasmose, linfoma de Hodgkin, sífilis, granulomatose de Wegner, sarcoidose, granuloma inguinal, actinomicose e outras desordens granulomatosas (COLOMBO et al., 1992; SCULLY et al., 1992; SPOSTO et al., 1993).

O tratamento pode ser feito com antifúngicos sistêmicos como o cetoconazol 200mg, sendo prescrito inicialmente 1 comprimido três vezes ao dia durante 2 meses (fase inicial do tratamento), sendo após administrado 1 comprimido duas vezes ao dia totalizando um período de 24 meses, produzindo resolução das lesões sistêmicas e orais com muita eficiência (VARGAS & RECACOECHEA, 1988; de ALMEIDA et al., 1991; SPOSTO et al., 1993). Atualmente o tratamento inicial de escolha é a base de sulfonamidas, decorrente do baixo custo e utilizada principalmente na fase aguda da doença com bons resultados (RESTREPO et al., 1983; Hospital da UNICAMP – protocolo de tratamento 2002). Porém são utilizados também outros agentes antimicrobianos como Anfotericina B, 40 mg/dia - intravenosa, Sufadiazine, 6mg/dia, ou Sulfisoxazole, 8mg/dia, mas recidivas ocorrem sem o uso de uma terapia contínua (ABERNATHY, 1973; LONDERO & RAMOS, 1978).

### **Histopatologia da Paracoccidioidomicose.**

De acordo com DORLAND (1951), o termo “granulomatoso” foi expresso inicialmente por Virchow para descrever uma massa tipo tumoral ou nódulo do tecido de granulação. A histopatologia da paracoccidioidomicose foi inicialmente estudada por MOTTA (1935), seguido por FIALHO em (1946), o qual utilizou impregnação argêntica para o estudo do parasita.

A resposta granulomatosa pode ser definida como uma reação imunológica especializada, caracterizada por uma coleção localizada de células epitelióides, macrófagos

e linfócitos. Ela é filogeneticamente uma resposta primitiva, vista como sendo um método de ingestão e remoção de patógenos e irritantes persistentes (SHIEFFIELD, 1990).

O granuloma é uma área focal da inflamação granulomatosa. Consiste de um agregado de macrófagos que se transformam em células tipo epitelióides circundados por um colar de leucócitos mononucleares, principalmente linfócitos e ocasionalmente plasmócitos. Outros granulomas mostram um “manto” externo de fibroblastos e fibras colágenas. Frequentemente, células epitelióides se fundem formando células gigantes na periferia ou algumas vezes no centro dos granulomas. Estas células gigantes podem atingir cerca de 40 a 50 µm de diâmetro, com grande massa citoplasmática contendo 20 ou mais pequenos núcleos arranjados na periferia das células (célula gigante tipo Langhans) ou distribuídos ao acaso (células gigantes tipo corpo estranho) (LEWIS, 1925; MARIANO & SPECTOR, 1973; MARIANO et al., 1975; ADAMS, 1976; WILLIAMS et al., 1983; HIRSH & JOHNSON, 1984; ROBBINS, 1999).

Granulomas de corpo estranho se formam pela presença de corpos estranhos relativamente inertes. Granulomas imunológicos ativos são formados a partir de dois fatores, presença de partículas não digeridas de organismos como o bacilo da tuberculose, e por imunidade mediada por células T (WARREN, 1977; ROBBINS et al., 1999). Em 1984, HIRSH & JOHNSON descreveram o granuloma inflamatório misto, onde apresentaram elementos agudos e crônicos, em processos granulomatosos. Observaram também que neste tipo de reação havia presença de hiperplasia pseudoepiteliomatosa com áreas de atrofia. No tecido conjuntivo havia presença de infiltrado composto por neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, histiócitos e células gigantes multinucleares em meio a uma proliferação fibrocapilar e necrose ocasional. Para diferenciar o granuloma inflamatório misto dos granulomas presentes em lesões de paracoccidioidomicose, URIBE et al. (1987) em estudo de lesões bucais e de pele não evidenciaram diferenças quanto aos seus aspectos microscópicos e descreveram o granuloma micótico misto, subdividindo o seu desenvolvimento em duas formas. Uma com granuloma organizado mostrando três zonas concêntricas, como formalmente descrito para a esporotricose (BEURMAN & GOUGEROT, 1912) e o segundo tipo contém todos os elementos acima citados, mas aparecem distribuídos ao acaso em uma formação desorganizada, provavelmente como o resultado do longo decurso da doença. KERR et al. (1988) dividiram os granulomas em

apenas duas zonas, uma central contendo o fungo, e outra periférica. A zona central foi dividida em duas áreas, uma interna e afibrilar, e outra externa e fibrilar, bem definida pelo método de polarização com coloração de picosírius, onde células fúngicas mostravam polarização semelhante ao das fibras colágenas tipo III. A zona periférica consistia de colágeno tipo I e que era responsável pela forma concêntrica do granuloma na porção mais externa.

O granuloma *P. brasiliensis* é geralmente centrado ao redor de uma ou mais partículas fúngicas, é composto por células gigantes e células epitelióides; portanto é um granuloma epitelióide (**KERR et al., 1988**). Leucócitos polimorfonucleares podem ser observados próximos ao fungo na área central; ao redor do granuloma, há um halo de células mononucleares. Os granulomas podem mostrar necrose por coagulação em adição a supuração central (**FRANCO et al., 1988**). O pólo hiperérgico da doença é caracterizado por infecção localizada, resposta imune celular persistente e um granuloma epitelióide compacto, já o pólo anérgico é representado por infecção disseminada, decréscimo na imunidade celular e, rico em parasitas, com granulomas pouco definidos (**de BRITO & FRANCO, 1994; SOARES et al., 2000**). O pólo anérgico com poucos granulomas não possui a capacidade de matar células fúngicas, como o que ocorre em pacientes com AIDS (**MIYAJI & NISHIMURA, 1983; FRANCO et al., 1989; FRANCO et al., 1993; de LIMA et al., 1995; BERNARD & DUARTE, 2000**).

Vários estudos estabeleceram, em animais de laboratório, correlação entre o tipo de lesão histopatológica com a imunidade humoral e celular (**IABUKI, 1973; PERÇOLI, 1978; DEFAVERI, 1979; REZKALLAH IWASSO, 1981; SOARES et al., 2000**).

As características da resposta inflamatória, bem como o tipo de células envolvidas, mostram a existência de quatro estágios na paracoccidioidomicose: (1) estágio neutrofilico ou monócito-neutrofilico, com predomínio de neutrófilos acompanhados por linfócitos e macrófagos, esta resposta inicial dura de dois a três dias; (2) fase pré-granulomatosa, também curta, em geral ocorrendo entre sete a dez dias, caracterizada por um aumento no fluxo de linfócitos e macrófagos; (3) período granulomatoso, com a formação de granulomas epitelióides compactos com área central mostrando graus diferentes de necrose caseosa, supuração e fungos, este sendo envolvido por células gigantes e epitelióides, e por fibroblastos e fibras colágenas do tipo I e II, e (4) estágio crônico com aumento de

granulomas compactos, poucos fungos e aumento do grau de fibrose (McEWEN, 1987; KERR et al., 1988; RESTREPO et al., 1992).

MOSCARDI-BACCHI et al., (1989) mostraram a existência de linfócitos T-helper (CD4) circundando os granulomas e os vasos do tecido envolvido, semelhante ao que é visto na lepra-tuberculóide e coccidioidomicose.

BURGER et al. (1996), através de uma análise histológica seqüencial e comparativa das lesões desenvolvidas pelo *P. brasiliensis*, em camundongos BALB/c atímicos e eutímicos, verificaram que para ambos os grupos, neutrófilos e macrófagos foram às células predominantes, observando também a presença de macrófagos em transição para células gigantes e células epitelióides. O *P. brasiliensis* estava sempre microenvolvido por uma matriz extracelular.

A morfogênese da reação granulomatosa desenvolvida nesta doença não está bem estabelecida. Entretanto, esta reação tem sido associada com muitos fatores, alguns relacionados ao fungo e outros a resposta do hospedeiro (MONTENEGRO et al., 1994).

Nos homens, a lesão essencial é um granuloma supurativo com células gigantes. Outras características como acantoses proeminentes, com formação de hiperplasia pseudoepiteliomatosa e um granuloma tipo tuberculóide são vistos (URIBE et al., 1987; de ALMEIDA et al., 1991; VILLALBA H., 1998). Os fungos aparecem com duplo contorno, com aproximadamente 30 µm de diâmetro, circundados por múltiplos brotamentos (MOORE, M. 1955). São observados em H/E, porém são mais bem visualizados em colorações com o ácido periódico de Schiff (P.A.S.) e pela impregnação argêntica (Gomori Grocott) (BERTOLINI et al., 1981). Achados semelhantes foram descritos por URIBE et al. (1987), onde também não observaram diferenças histológicas marcantes entre lesões de pele e de mucosa oral. Mais recentemente IOVANNITTI et al. (1999) descreveram a evolução dos aspectos histopatológicos da paracoccidioidomicose em diferentes órgãos e tecidos, mostrando que os aspectos das lesões granulomatosas são semelhantes nestas diferentes estruturas.

Estudos como o de FRANCO et al. (1997), relatam a formação de granulomas “*in vitro*” por células mononucleares do sangue periférico, obtidas de pacientes com forma aguda e crônica da doença, tratados a base de sulfonamidas e/ou anfotericina B. Os autores evidenciam uma melhor resposta granulomatosa, contra antígenos do *P. brasiliensis*, em

pacientes com tratamento, do que nos pacientes não tratados. Pacientes com forma aguda da doença desenvolveram menor intensidade de formação de granulomas quando comparados aos pacientes com forma crônica da doença, mostrando uma correlação entre os graus de reatividade granulomatosa e as formas clínicas da doença em modelos experimentais “*in vitro*”.

Em trabalho prévio mostramos as características microscópicas da paracoccidioidomicose bucal em 64 pacientes infectados, quantificando de forma subjetiva a presença de células gigantes, granulomas organizados e não organizados, a presença de fungos no interior das células gigantes e das células mononucleares, microabscessos e infecção em outras estruturas como glândulas salivares. A análise foi realizada através de métodos histoquímicos, onde os achados foram tabulados e correlacionando entre si, não verificando diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos. Verificamos, porém, que a presença dos fungos davam-se principalmente no interior das células gigantes e dos macrófagos, geralmente com múltiplos brotamentos, principalmente em lesões com infiltrado inflamatório intenso com granulomas pouco organizados.

### **Ultraestrutura da Paracoccidioidomicose**

As características ultraestruturais da Paracoccidioidomicose tem sido estudadas desde a década de 60, com os estudos de LACAZ em 1960, descritos no Manual de Micologia Médica e por CARBONELL & POLLAK (1963) os quais observaram a fase leveduriforme do fungo em meio de cultura. CARBONELL & RODRIGUES (1965) descreveram a transformação da fase micelial para levedura em meio de cultura e em inoculação em animais, onde mais tarde, CARBONELL (1969) em estudo comparativo entre a fase micelial e leveduriforme, evidenciou três camadas na parede do fungo, presentes tanto na fase micelial quanto leveduriforme, apresentando uma camada interna, composta por uma fina membrana plasmática, uma camada média, mais espessa e apresentando uma estrutura lamelar principalmente na fase micelial e uma camada fibrilar externa.

VIEIRA e SILVA et al. (1974) avaliaram os aspectos ultraestruturais do *P. brasiliensis* em microscopia eletrônica de varredura quando cultivado em meio de cultura

a temperaturas ambiente e de 37° C, observando tanto a fase micelial quanto a leveduriforme. Na fase micelial ele comparou os micélios a estruturas semelhantes ao bambu, havendo a presença de múltiplos brotamentos, os quais apresentavam-se como “bolsas”. As leveduras eram arredondadas a ovaladas, com superfície levemente fibrilar, geralmente com brotamentos na periferia semelhantes às da forma micelial, chamando atenção para a presença de formas livres persistentes, espalhadas no meio de cultura, sem brotamentos e de tamanho reduzido, sugerindo formas quiescentes ou recém formadas, que desprendem-se tanto do micélio quanto da levedura e acometem o meio externo, considerando importante na epidemiologia do fungo.

**IABUKI & MONTENEGRO (1979)** estudaram as alterações locais e sistêmicas geradas em hamsters após a inoculação com *P.brasiliensis*, com microscopia óptica convencional, eletrônica e monitoramento dos níveis plasmáticos de anticorpos nas diferentes fases da infecção com imunofluorescência indireta. Os achados ultraestruturais revelaram a presença de fungos circundado por células inflamatórias, principalmente neutrófilos nas fases iniciais das lesões e após 3 a 5 dias com a presença predominantemente de macrófagos, portanto as lesões evoluíram de forma progressiva e crônica. Nas lesões iniciais, os neutrófilos próximos ao fungo mostraram degeneração citoplasmática e perda das membranas celulares, enquanto que neutrófilos à distância mostravam-se normais. Observaram ainda, espaços claros entre fungos intactos e as células inflamatórias, este espaço era inexistente quando havia destruição do fungo e o citoplasma dos neutrófilos penetravam na parede do fungo. Alguns destes espaços continham depósitos irregulares de material osmiofílico granular. Nas lesões crônicas a região central mostrava-se supurativa com fungos em atividade reprodutiva envoltos por PMNs e mais externamente haviam várias camadas de macrófagos. As alterações ultraestruturais nas células inflamatórias foram semelhantes tanto nas lesões agudas quanto crônicas. Após 10 dias as lesões mostravam a presença de linfócitos e plasmócitos principalmente ao redor dos granulomas epitelióides. Nestas lesões os fungos eram grandes e quiescentes, bem preservados, frequentemente com vacúolos centrais e organelas facilmente visíveis, com degeneração da interface fungo/macrófago leve ou ausente, a qual havia pequeno espaço preenchido por material finamente granuloso e osmiofílico não identificável e vacúolos aderidos a esta região. Este aspecto predominou nos granulomas epitelióides.

**MIGUETTI et al. (1985)** através da microscopia eletrônica de varredura, descreveu o aspecto ultraestrutural do *P. brasiliensis* em meio de cultura. A fase leveduriforme mostrou que o fungo era esférico a ovalado semelhante às células mães que mostravam grande número corpos emergindo de sua superfície, os quais mostravam-se com diferentes tamanhos e formas, porém, geralmente com formato esférico ou ligeiramente alongado. Os brotamentos mostravam-se firmemente ou ligeiramente aderidos à célula mãe. A superfície das leveduras eram cobertas com componentes microfibrilares formando uma delicada rede sobre a superfície da célula mãe e de seus brotamentos, sendo pouco aparentes nestes brotamentos, observado também previamente por **KANETSUNA F. (1981)**. Algumas leveduras apresentavam-se como formas livres, não aderidas à célula mãe. Esses achados conferem os achados previamente descritos por **VIEIRA E SILVA et al., (1974)**, e por **CARBONELL (1969)** o qual descreveu, em microscopia eletrônica de transmissão, presença de uma camada superficial formada por microfilamentos e composta por alfa e beta 1,6 glucana, importantes na patogenicidade do fungo (**CARBONELL et al., 1970**).

A descrição do *P. brasiliensis* em biópsias de tecido humano foram descritas inicialmente por **FURTADO et al. (1967)** sendo os mesmos achados posteriormente descritos por **KASHINO et al. (1987)** onde estudaram as curvas de crescimento, morfologia e ultraestrutura de dez isolados diferentes de *P. brasiliensis* obtidos de pacientes que viveram em diferentes áreas endêmicas. Seus resultados revelam que os aspectos morfológicos e ultraestruturais eram semelhantes em todos os isolados, havendo diferença apenas nas curvas de crescimento. Quanto ao aspecto ultraestrutural o *P. brasiliensis* apresentou parede com espessura de 0,1 a 0,2 $\mu$ , camada mais externa delgada e eletrodensa e depósitos eletro-opacos na superfície, segunda camada larga, homogênea e pouco eletrodensa foi observada em toda a sua extensão, evidenciando em alguns preparados uma sub-camada eletrodensa e terceira camada interna foi observada como unidade de membrana, mostrando estrutura trilaminar. Em alguns isolados, as células apresentavam múltiplas invaginações para o interior da membrana plasmática, constituindo vesículas e estruturas tubulares associadas a formação dos septos no processo de brotamento, sendo os mesmos achados descritos posteriormente por **BORBA et al., (1999)**. Havia ainda, grande quantidade de mitocôndrias nas leveduras, algumas próximas a superfície da célula. O retículo endoplasmático mostrava-se como uma longa cisterna não dilatada, sem

ribossomos, os quais estavam livres no interior do citoplasma do fungo. Frequentemente observaram vacúolos de diferentes tamanhos e formas, sendo que alguns deles continham grande quantidade de material eletro-denso. O Aparelho de Golgi não foi identificado. As leveduras de *P.brasiliensis* são multinucleadas, com dois a cinco núcleos envoltos por membrana nuclear porosa e conteúdo preenchido por eucromatina, porém nucléolos não foram descritos, sendo posteriormente descritos por **BORBA et al. (1999)** ao analisar o crescimento do *P.brasiliensis* em diferentes meios de cultura.

**KERR et al., (1988)** descreveu os aspectos morfológicos e ultraestruturais dos granulomas na paracoccidiodomicose, dividindo-os em duas zonas, uma central contendo fungos, e uma periférica, com presença de matriz composta por colágeno I e III, proteoglicanas, glicoproteínas e substância amorfa. A principal população celular foram os macrófagos, células epitelióides com núcleo volumoso, cromatina difusa, nucléolos eletrodensos, poucos grânulos azurófilos, muitas mitocôndrias e retículo endoplasmático proeminente, e células gigantes na zona central, com fibroblastos na periferia e fibrose.

**DEFAVERI et al. (1989)** induziram reação inflamatória em animais normais e previamente imunizados para *P.brasiliensis*. Através da injeção intravenosa de partículas de betonite cobertas com antígenos de *P.brasiliensis*. Os autores descreveram os aspectos morfológicos em microscopia óptica e eletrônica a evolução do processo inflamatório que envolvia os êmbolos nos capilares pulmonares dos animais, durante períodos de 2,4,6 e 8 dias. Os animais previamente imunizados mostraram uma reação inflamatória intensa já no segundo dia, evoluindo o processo inflamatória com formação de granulomas epitelióides no 6 dia. Este aspecto não foi observado para os animais não imunizados previamente. Nos animais previamente imunizados, o aspecto ultraestrutural dos granulomas mostrou a presença de grande quantidade de macrófagos, que mostravam núcleos alongados, nucléolos não evidentes, grande quantidade de mitocôndrias, Aparelho de Golgi desenvolvido e grande quantidade de ribossomos livres e aderidos sob o retículo endoplasmático, mesmas características descritas por **NABARRA et al. (1979)** e posteriormente por **BRUMMER et al. (1990)**. Estas células mostravam ainda grande quantidade de interdigitações de membrana, muitas delas envolvendo as partículas pré-injetadas. Nos animais não imunizados os macrófagos mostravam poucas organelas e interdigitação de membrana, não formando granulomas.

Em estudos ultraestruturais de leveduras de *P. brasiliensis* no interior de macrófagos ativados foi possível demonstrar que após 4 horas de interação, a destruição das células fúngicas ocorre no interior de fagossomos bem definidos, geralmente rodeados por vários lisossomos preenchidos por estrutura granular e intensamente eletrodensa, na qual há desintegração citoplasmática e esvaziamento das células fúngicas, restando apenas a parede celular (BRUMMER et al., 1990). Este último aspecto foi observado previamente por GOIHMAN-YAHR et al. (1989), que verificou deficiência fagocitária de neutrófilos provenientes de pacientes com Paracoccidioidomicose, descrevendo pequenas alterações na membrana celular do fungo quando submetido a tratamento com Anfotericina B, porém sua parede permanecia inalterada mesmo após tratamento.

Outros trabalhos mostraram de forma detalhada a presença de uma pequena interface entre o *P. brasiliensis* e as células inflamatórias quando o fungo está morto ou degenerado, ocorrendo principalmente em fungos maiores e multinucleados, porém esta interface é ampla em fungos viáveis, geralmente pequenos, com um único núcleo, mostrando que os diferentes padrões de interação do *P. brasiliensis* com células do hospedeiro podem ser decorrentes do afluxo de células inflamatórias funcionalmente diferentes ao local de inoculação ou à idade dos fungos ou ambos os fatores. Neste trabalho os neutrófilos foram as principais células presentes no início do processo inflamatório, sendo progressivamente substituídas por macrófagos a partir do segundo dia. A presença de eosinófilos ocorreu em menor quantidade quando comparadas com os neutrófilos e macrófagos, e foram observadas circundando células fúngicas viáveis nas lesões. Apesar de estarem comumente presentes neste tipo de lesões, não se sabe a função exata destas células frente a paracoccidioidomicose (COELHO et al., 1994).

Apesar de alguns trabalhos terem mostrado os aspectos ultraestruturais da Paracoccidioidomicose “*in vitro*” e em experimentos animais de lesões em diferentes órgãos e tecidos, poucos são os relatos relacionados aos achados em tecidos humanos, não havendo relatos de lesões bucais quanto aos aspectos em microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Portanto, o presente trabalho objetiva avaliar os aspectos ultraestruturais das lesões bucais da Paracoccidioidomicose através da microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

## OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- Analisar em microscopia eletrônica de transmissão os padrões ultraestruturais do *Paracoccidioides brasiliensis* nas lesões bucais, bem como sua interação com as células inflamatórias, células gigantes e processo granulomatoso.
- Analisar em microscopia eletrônica de varredura os aspectos ultraestruturais superficiais das lesões bucais provocadas pelo *P. brasiliensis*.

## **Material e Métodos**

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Material de 14 biópsias de paracoccidioidomicose bucal foram processadas para observações em microscopia eletrônica de transmissão. Os fragmentos foram fixados em glutaraldeído (COH (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COH) 2,5%, pH 7,3, durante 4h a 4°C. A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1% a 0,1M, em tampão fosfato pH 7,3 por 2 horas. A desidratação foi realizada em concentrações crescentes de etanol: 50% (3x 5min), 70% (1x 50min), 90% (2x 10min), 100% (3x 5min) e Óxido de Propileno (2x 15min).

A inclusão foi feita em araldite + Óxido de propileno (1x 12horas), araldite pura a 3°C (1h) e estufa a 60°C durante três dias. Os cortes semifinos obtidos no ultramicrotomo foram corados com azul de toluidina a 2% e observados ao microscópio óptico. As áreas desejadas para análise ultraestrutural foram marcadas e os blocos trimados.

Cortes ultrafinos obtidos no ultramicrotomo com navalha de diamante foram recolhidos em tela de cobre circular de 3mm de diâmetro, com malha fina de 400 mesh (malhas/polegada). A contrastação foi feita com acetato de uranila e citrato de chumbo, para isso colocamos a grade com os cortes voltados sobre uma gota de acetato de uranila previamente depositado em parafina no fundo de uma placa de Petri, devidamente protegida da poeira ambiente. Deixamos por 20 a 30 minutos. Com auxílio de uma pinça lavamos diversas vezes em 3 banhos de água bidestilada. O excesso de água foi absorvido com um pedaço de papel de filtro que se insere entre as pontas da pinça; colocamos então a grade sobre uma gota de citrato de chumbo durante 5 a 10 minutos, lavamos novamente e secamos como descrito anteriormente.

As observações e documentações foram feitas com auxílio do microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM10 da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. As imagens obtidas foram reproduzidas inicialmente em papel fotográfico Kodak e posteriormente digitalizadas, com auxílio de scanner Genius com 600x1200dpi de resolução.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Material proveniente de 06 biópsias de paracoccidiodomicose bucal foram processados para observações em MEV. As superfícies das biópsias foram inicialmente limpas em soro fisiológico para remoção de resíduos de sangue. O fragmento foi fixado em dois banhos de glutaraldeído a 5% por 3 horas cada em temperatura ambiente.

Para a pós-fixação usamos ácido ósmico 1% em solução aquosa por 3 horas. A desidratação foi feita em concentrações crescentes de acetona: 10% (1h), 20% (1h), 30% (1h), 50% (1h), 70% (1h), 90% (1h) e 3x 100% (1h cada). Após a desidratação, os espécimens foram condicionados no aparelho de secagem ao ponto crítico da Palzers Union CDP 030, resfriado previamente a 6°C e seis banhos de CO<sub>2</sub>, aquecidos lentamente até alcançarem o ponto crítico a 28°C, sendo aquecidos até 42°C a uma pressão de 80bar, e libera-se o gás lentamente até a pressão atmosférica normal. Os espécimens foram montados nos suportes “stubs” (usando fita de cobre) com a superfície epitelial voltada para cima e inseridos no metalizador da Palzers Union MED 010, aparelho evaporador de carbono e ouro para a metalização. No metalizador, os espécimens foram submetidos à 50ms de evaporação de carbono e posteriormente 200ms de metalização com ouro.

As observações e documentações iniciais foram feitas com auxílio do microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo MEV DSM940A, do Núcleo de Apoio a Pesquisa da Escola Superior de Agronomia Luis de Queiróz – USP. As imagens foram capturadas simultaneamente em computador, digitalizadas e armazenadas em disquetes de ¼. Posteriormente os espécimens foram novamente analisados em microscópio eletrônico de Varredura Jeol JSM 5600 LV, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP do departamento de Patologia Bucal.

## RESULTADOS

### CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PACIENTES.

A idade média dos 20 pacientes com Paracoccidiodomicose bucal, cujas biópsias foram avaliadas em Microscopia eletrônica foi  $45,88 \pm 9,09$ , sendo que 95 % tinham mais de 30 anos e o mais jovem 25 anos (tab. 1). Houve predominância do sexo masculino, correspondendo a 18 casos (90%). Os locais mais freqüentemente biopsiados estão na tabela 1. Houve predominância de biópsias em lesões de mucosa jugal, seguida do rebordo alveolar sendo que nas outras áreas houve igual incidência.

**Tabela 1 – Grupos etários e localizações das lesões bucais dos 20 pacientes com Paracoccidiodomicose bucal.**

<b>Grupos de idade</b>	<b>Pacientes %</b>	<b>Localização</b>	<b>Total</b>
19 - 30	5 %	Mucosa jugal	7
31 - 40	30 %	Rebordo alveolar	4
41 - 50	35 %	Palato	3
51 - 60	15 %	Lábios	3
61 - 71	15 %	Gengiva	3

### CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS

Na análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de transmissão, observamos os diferentes aspectos entre as células inflamatórias, formação dos granulomas, disposição das células inflamatórias nos granulomas, presença de macrófagos epitelióides, células gigantes, neutrófilos, plasmócitos, eosinófilos, mastócitos e estruturas associadas como nervos, vasos sanguíneos, tecido epitelial, bem como as diferentes formas presentes de *P.brasiliensis*. Como são vários os parâmetros, estes serão descritos separadamente.

## Microscopia Eletrônica de Transmissão.

### Células

Os macrófagos e neutrófilos foram as principais células inflamatórias presentes nas lesões bucais de paracoccidioidomicose, seguidos por plasmócitos, linfócitos, eosinófilos e mastócitos. Os neutrófilos (fig. 1), por serem polimorfonucleares, apresentam núcleo com duas a quatro partes separadas, grânulos específicos (secundários) pequenos e pálidos (pouco eletrodensos), grânulos azurófilos (primários) maiores e mais eletrodensos, aparelho de Golgi rudimentar, poucas mitocôndrias, retículo endoplasmático discreto e poucos ribossomos livres.

Os macrófagos (fig. 2a) apresentam núcleo geralmente excêntrico, ovalado ou irregular, com cromatina pouco densa (pouco eletrodensa), com dois ou mais nucléolos (região mais eletrodensa), grânulos azurófilos eletrodensos, retículo endoplasmático pouco desenvolvido, grande quantidade de mitocôndrias e complexo de Golgi bem desenvolvido. Macrófagos epitelióides (fig. 2b) mostram núcleo volumoso, cromatina difusa, nucléolos eletrodensos, poucos grânulos azurófilos, muitas mitocôndrias e retículo endoplasmático proeminente. Ao se unirem formam células gigantes (fig. 2c).

Os linfócitos (fig. 3) mostram núcleo central ou levemente excêntrico, arredondado, com áreas de cromatina densa e difusa. Seu citoplasma é escasso mostrando cisternas de retículo endoplasmático. Os plasmócitos (fig. 3) mostram núcleo excêntrico, ovalado, nucléolo central com cromatina densa em forma piramidal na periferia, entremeada por cromatina difusa (aspecto em roda de leme). Seu citoplasma apresenta grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, mostrando em alguns casos, completamente preenchidos por material homogêneo eletrodensa, mitocôndrias e complexo de Golgi são pouco evidentes.

Eosinófilos (fig. 4) apresentam núcleo bilobado, com granulações intracitoplasmáticas maiores do que a dos neutrófilos, ocupando quase inteiramente o citoplasma, ovalados com cristalóides eletrodensos no seu interior (*internum*) envolvido por porção menos eletrodensa (*externum*). O aparelho de Golgi, mitocôndrias e retículo endoplasmático são pouco desenvolvidos e mais difíceis de serem observados.

Os mastócitos (fig. 5) mostram núcleo excêntrico, riniforme, com cromatina densa. Seus grânulos são arredondados com material eletrodense central em diferentes tamanhos. O aparelho de Golgi, mitocôndrias e retículo endoplasmático são pouco evidentes. Quando ativado, seu núcleo torna-se ovalado com cromatina difusa, os grânulos mostram-se volumosos e rompem na superfície celular.

As células epiteliais apresentam núcleo volumoso, cromatina difusa, pouco eletrodensa e nucléolo arredondado eletrodense. O citoplasma mostra grande quantidade de estruturas fibrilares eletrodensas dispostas em várias direções. A membrana plasmática forma pontes intercelulares unidas por desmossomos eletrodensos (fig. 6).

### ***Paracoccidioides brasiliensis***

A forma do *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) nas lesões bucais é leveduriforme (fig. 7). São células arredondadas ou ovaladas, núcleo com cromatina finamente granular, densa e nucléolo mais eletrodense do que a matriz nuclear. O retículo endoplasmático é discreto, com ou sem ribossomos aderidos a sua superfície. Mitocôndrias e vacúolos intracitoplasmáticos eletrolúcidos e eletrodensos são melhor observados.

Fungos adultos geralmente são maiores, com vários vacúolos intracitoplasmáticos centrais ou periféricos, eletrolúcidos (fig. 8); fungos jovens são menores e mostram poucos ou nenhum vacúolo intracitoplasmático (fig. 7). A parede celular dos fungos é espessa e possui três camadas: Camada externa mais espessa e eletrodensa, composta por delicada rede de fibrilas entrelaçadas formando uma auréola, camada média eletrolúcida e homogênea e camada interna composta pela membrana plasmática, geralmente regular, podendo mostrar áreas com pequenas invaginações (fig. 9).

O *P. brasiliensis* multiplica-se por brotamento ou gemulação, vistos principalmente em fungos adultos. Estes processo ocorre principalmente no interior dos macrófagos, células gigantes e conjuntivo, mas de forma rara, observamos este processo no interior das células epiteliais (fig. 10).

Os brotamentos são as células filhas, unidas por um pedúnculo a célula mãe que posteriormente se rompe (figs. 11 e 12). Este processo é invasivo, distorcendo estruturas próximas (fig. 12). As células filhas mostram as mesmas estruturas de parede e conteúdo intracelular das células mãe, porém com nenhum ou poucos vacúolos intracitoplasmáticos.

Formas isoladas do fungo foram observadas no interior dos granulomas, células gigantes, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais (figs. 8, 9 e 13).

### **Granulomas, morte e degradação fúngica.**

Os granulomas organizados mostram região central ocupada por células gigantes multinucleadas, com citoplasma extenso, ricamente vesiculoso e raros grânulos azurófilos. Geralmente os fungos mostram estrutura típica com pouca ou nenhuma distorção da parede celular, com ou sem brotamento. Periféricamente e/ou no interior do granuloma organizado podemos observar macrófagos epitelióides, linfócitos e/ou plasmócitos (figs. 14 e 15). Os granulomas desorganizados perdem as características anteriores, são mais celularizados, geralmente com neutrófilos no interior realizando fagocitose, macrófagos, plasmócitos e maior quantidade de fungos jovens com ou sem brotamentos (fig. 16).

Morte ou degradação do *P.brasiliensis* ocorre com o processo de fagocitose realizado por neutrófilos e macrófagos. O fungo é colocada em compartimento fechado limitado por membrana (fagossoma), liberando então o conteúdo de seus grânulos intracitoplasmáticos ricos em enzimas digestivas. Neutrófilos ativados mudam sua morfologia, mostrando núcleo com cromatina difusa e áreas eletrodensas, ocorre a formação do fagossomo que envolve o fungo. Lisossomas unem-se à superfície do fagossoma e fusionam-se, liberando seu conteúdo eletrodenso. O material eletrodenso depositado na interface fagossoma e superfície fúngica torna-se finamente granuloso (figs. 17 e 18).

Há uma interface larga entre fungos viáveis e a membrana do fagossoma das células de defesas (fig. 7b) mostrando ausência ou mínima alteração da superfície com pequenas invaginações da camada média e da membrana plasmática e depósitos finamente granuloso e eletrodensos (figs. 19 e 23). Fungos em destruição mostram interface pequena ou ausente entre sua superfície e o fagossoma, geralmente com fino material granuloso eletrodenso no interior (fig. 18). Ocorre degradação inicial das estruturas da parede do fungo, principalmente das camadas média e interna, com posterior degradação do conteúdo intracelular, permanecendo apenas a camada externa, retraída ou não (figs. 20, 21 e 22). Fungos adultos desenvolvem-se em grandes células, assumindo grandes proporções no interior das células gigantes de granulomas não organizados. (fig. 24).

A disseminação da doença se dá de forma linfohematogênica, pela presença de fungos viáveis não degradados no interior de neutrófilos e macrófagos que acometem a circulação (fig. 25).

### **Outras estruturas**

Além das características descritas anteriormente, observamos presença de estruturas associadas, como vasos sanguíneos (fig. 26) e nervos (fig. 27). Apesar destas estruturas estarem envolvidas pelo processo, não verificamos nenhuma alteração das mesmas.

### **Microscopia eletrônica de Varredura.**

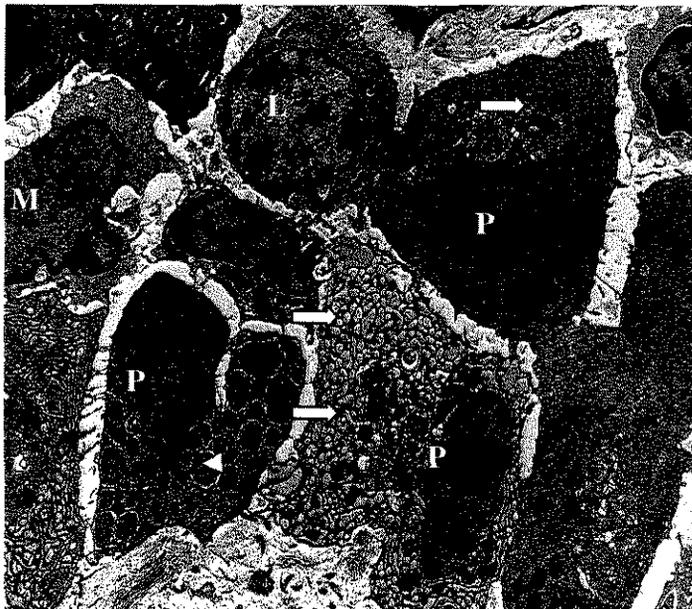
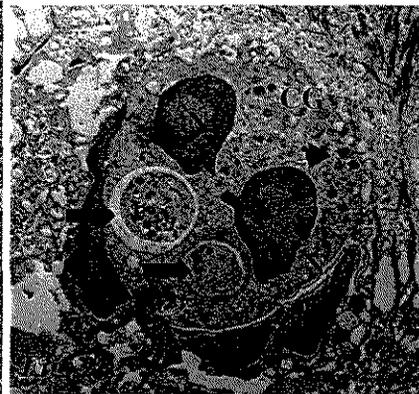
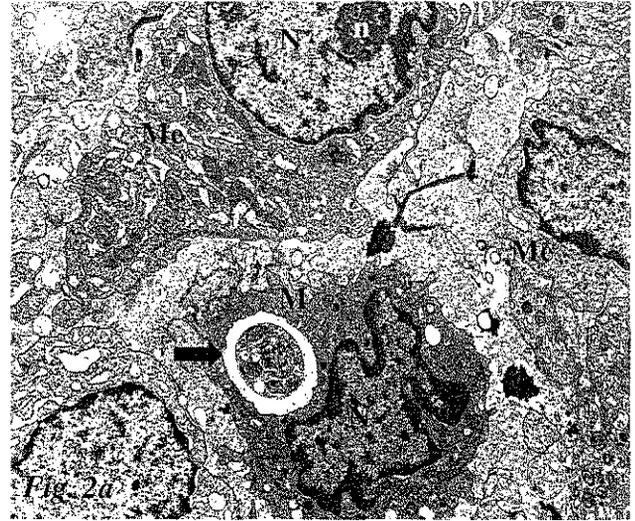
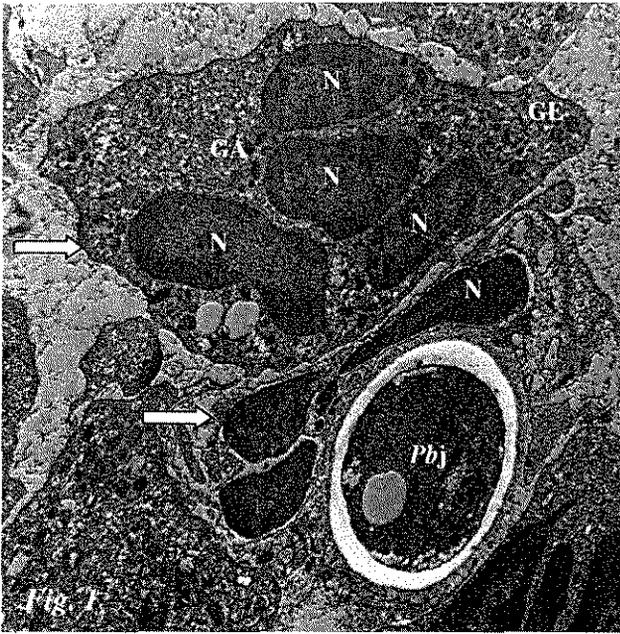
Na varredura podemos observar as alterações geradas pelo *P. brasiliensis* nas superfícies da mucosa. As biópsias mostravam área livre de alteração com superfície epitelial normal e área afetada. Na região de mucosa sadia observamos que as células epiteliais se dispõem lado a lado como “folhas sobre um terreno” porém firmemente unidas. Em algumas regiões podemos observar que algumas destas células estão descamando (fig. 28). A superfície das células epiteliais normais é corrugada (fig. 29).

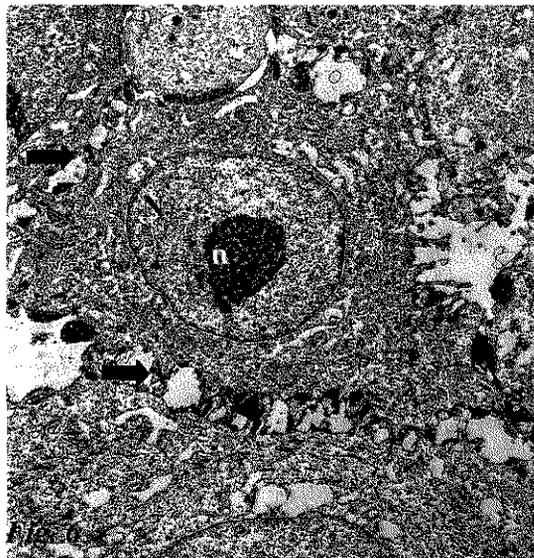
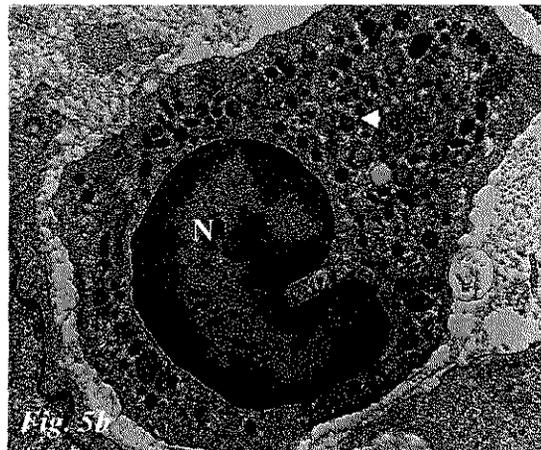
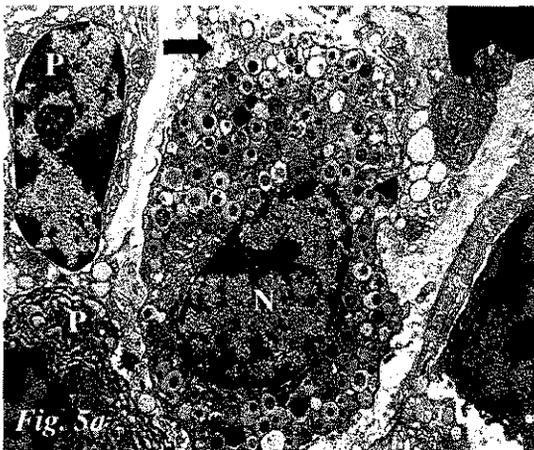
Nas áreas afetadas a principal alteração foi a formação de microabscessos que evoluem para micro-erosões. Estas áreas se caracterizam por pequenas elevações com pontos escurecidos centrais, distribuídos em várias regiões de forma irregular (fig. 30). Os microabscessos afetam primeiramente células epiteliais superficiais isoladas, gerando alterações na superfície. A porção central superficial da célula torna-se elevada, escurecida e recoberta por delgada membrana translúcida. A porção periférica torna-se deprimida e lisa, envolvendo o restante da superfície (fig. 31). O processo evolui envolvendo mais células da superfície e as lesões se coalescem até o início do rompimento do micro-abscesso intraepitelial, caracterizado por esfoliação da superfície central (fig. 32).

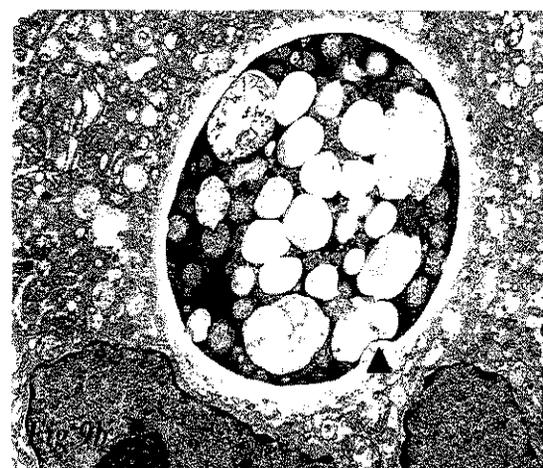
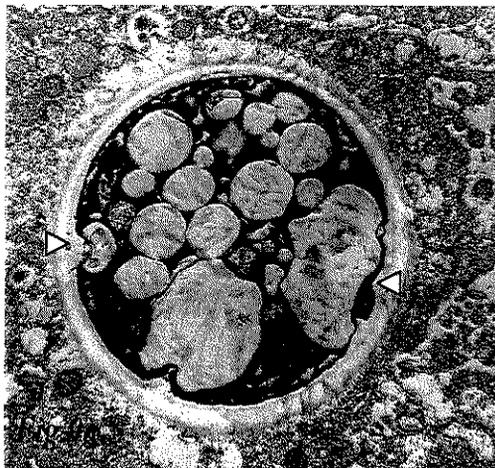
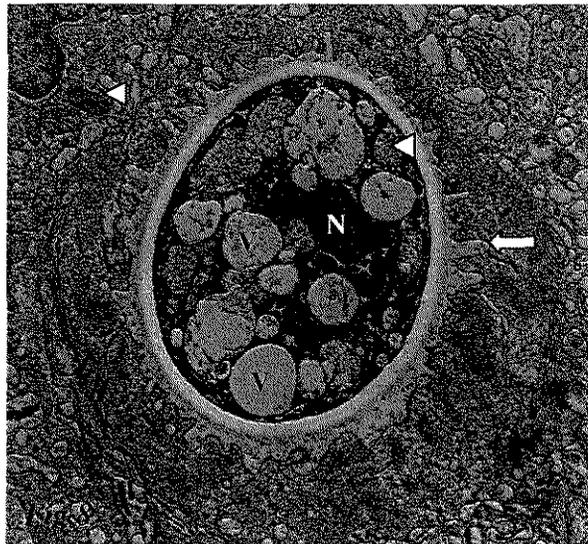
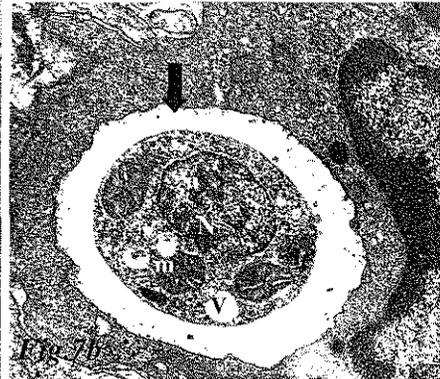
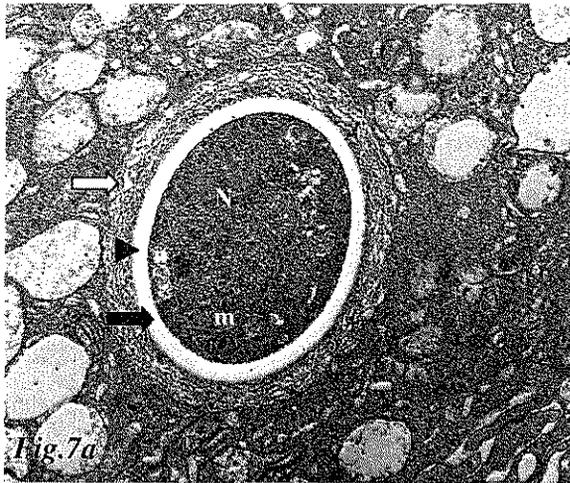
O rompimento do micro-abscesso forma então uma micro-erosão, com inúmeros fragmentos celulares e leito recoberto por célula epitelial com aspecto de normalidade (fig. 33).

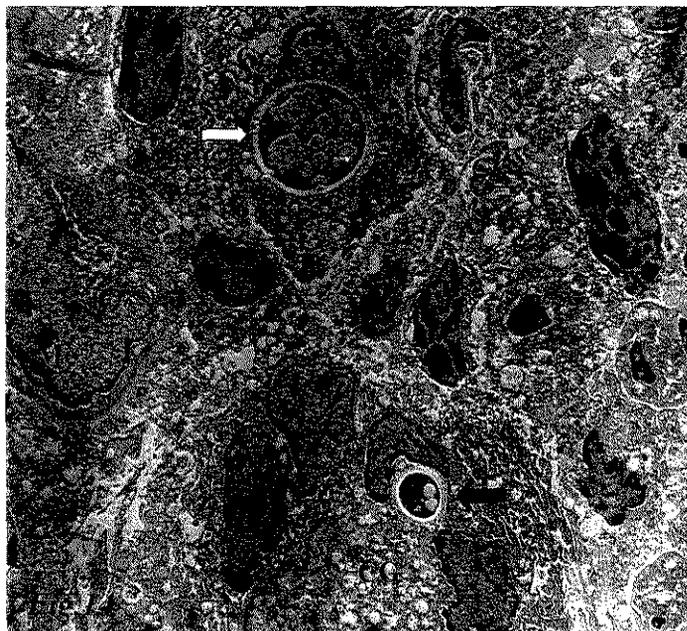
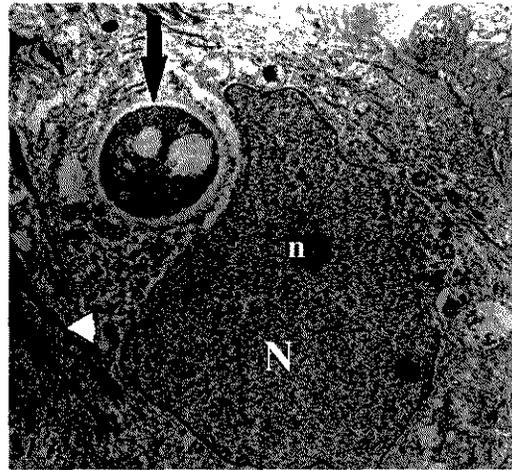
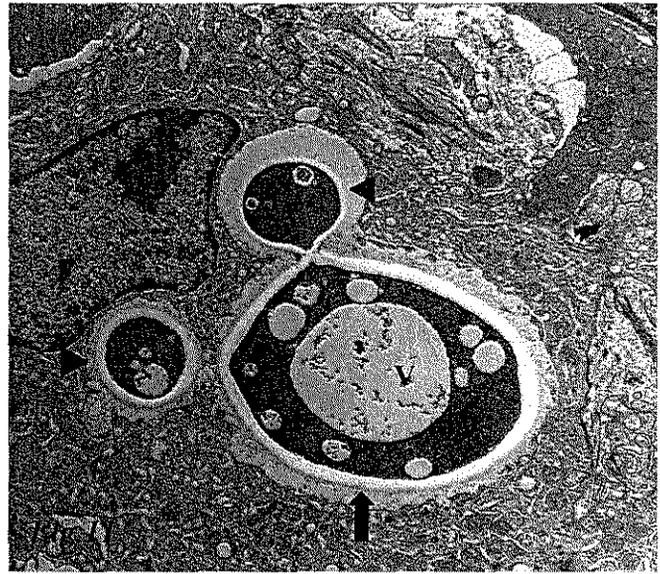
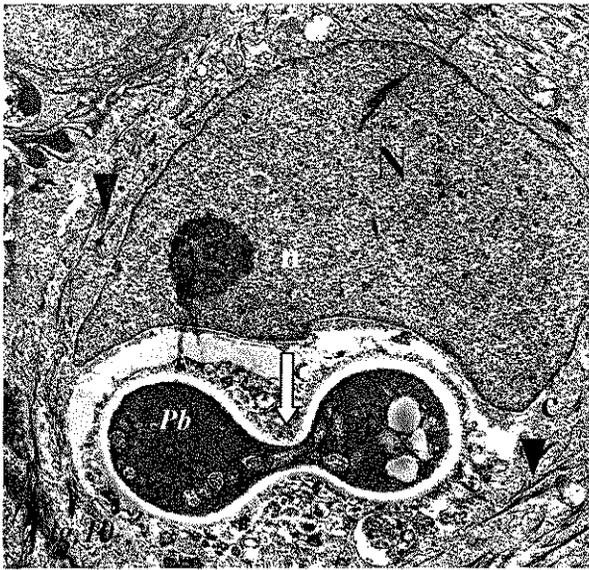
*Obs: Legendas das figuras a partir da página 43.*

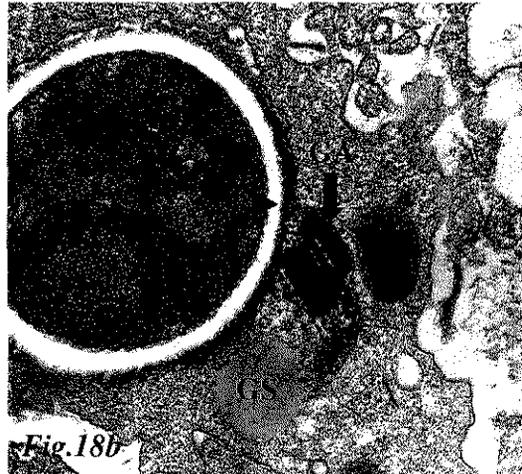
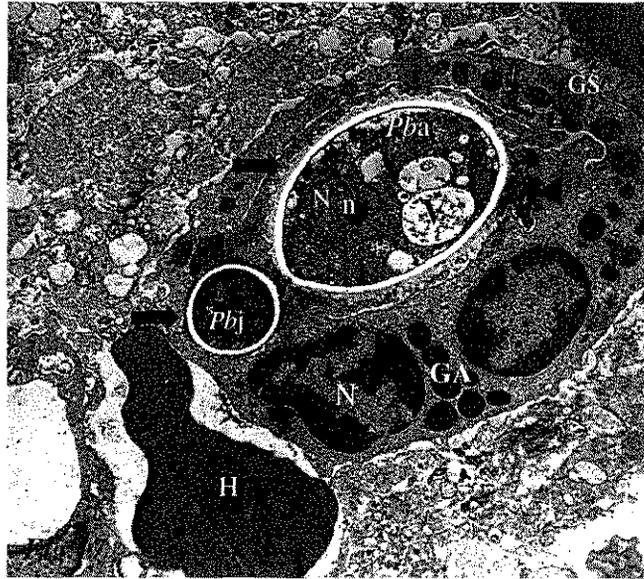
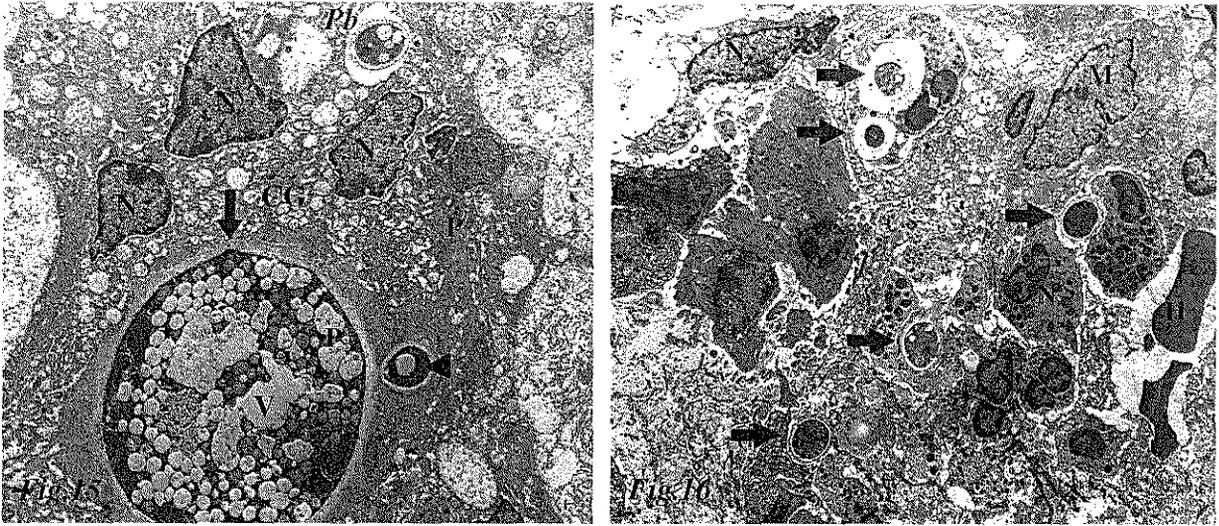
## Microscopia Eletrônica de Transmissão

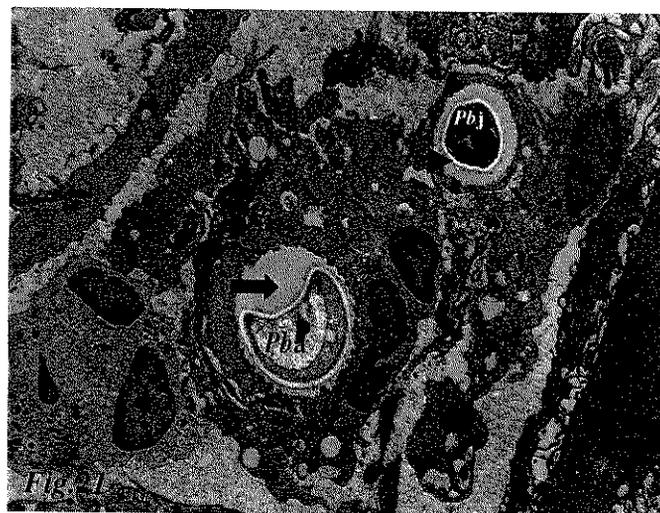
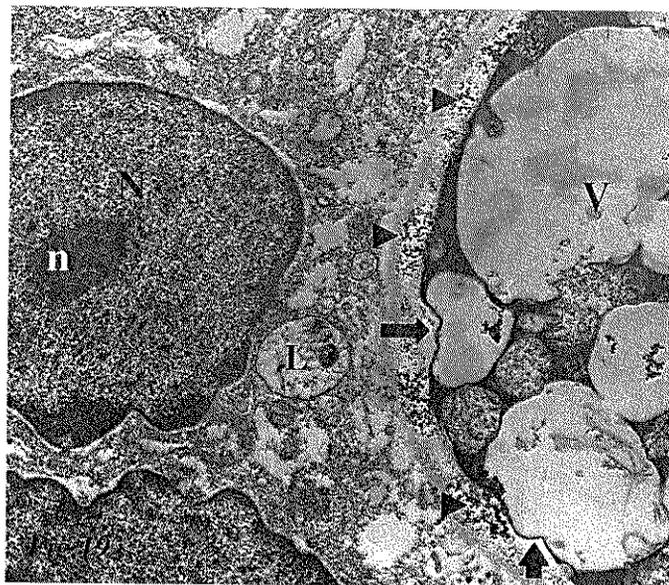


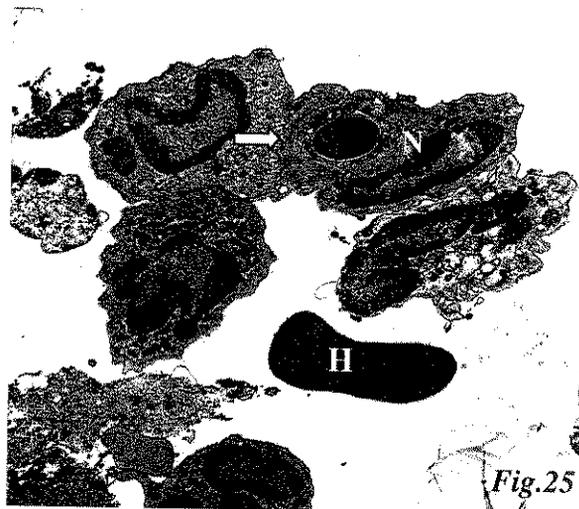
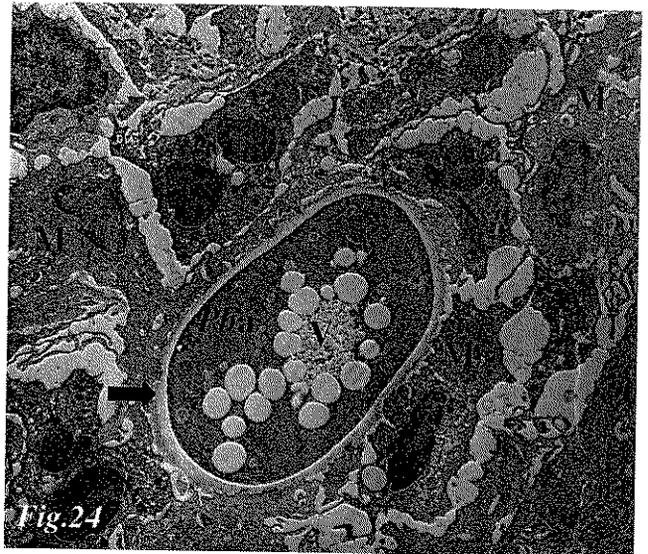
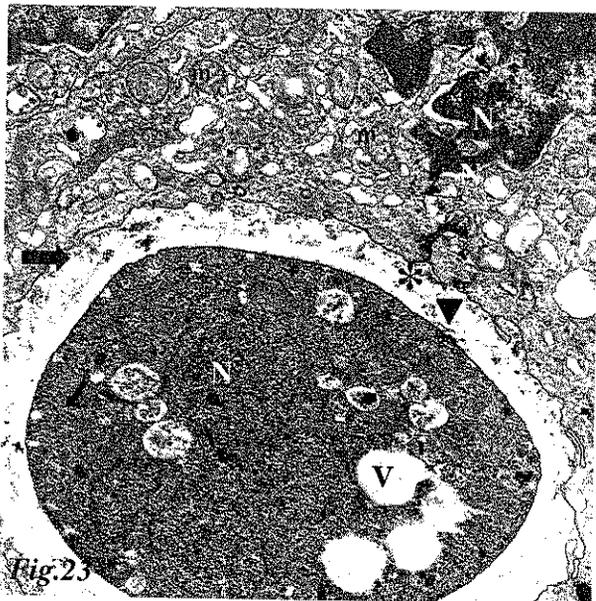
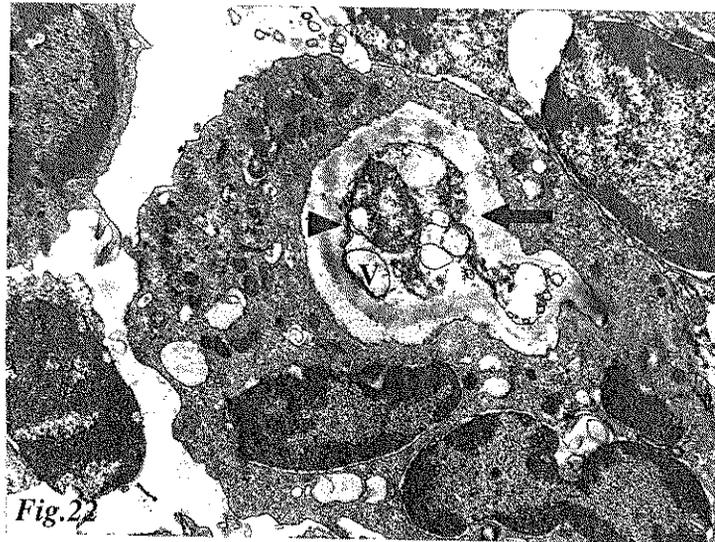


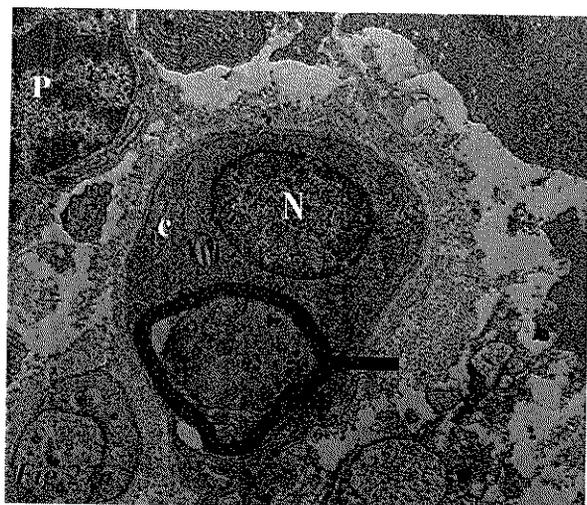
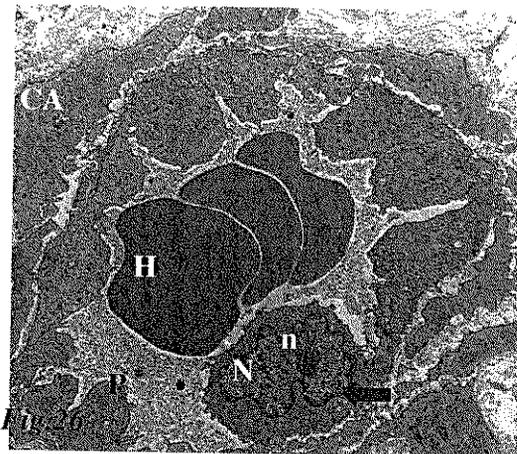




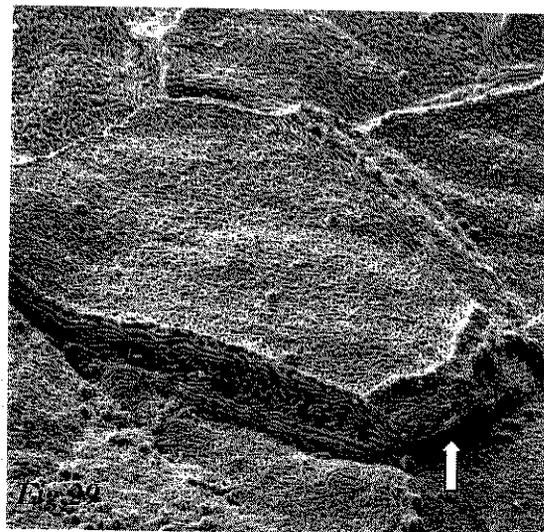
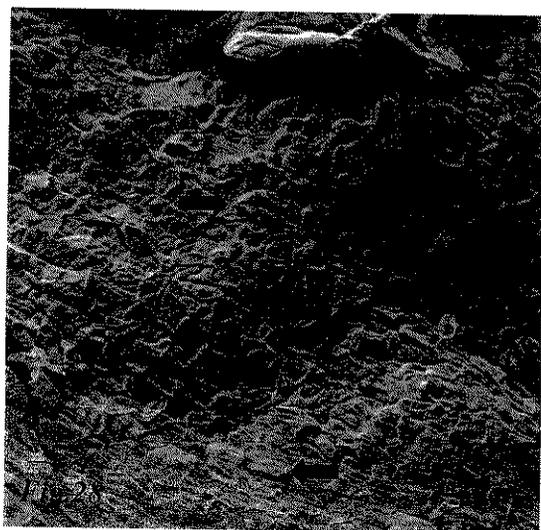


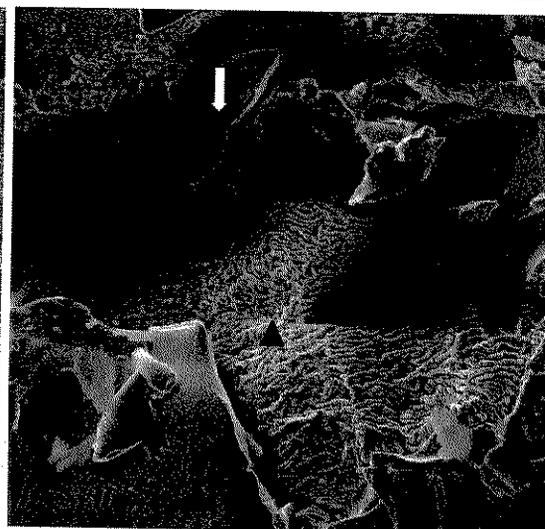
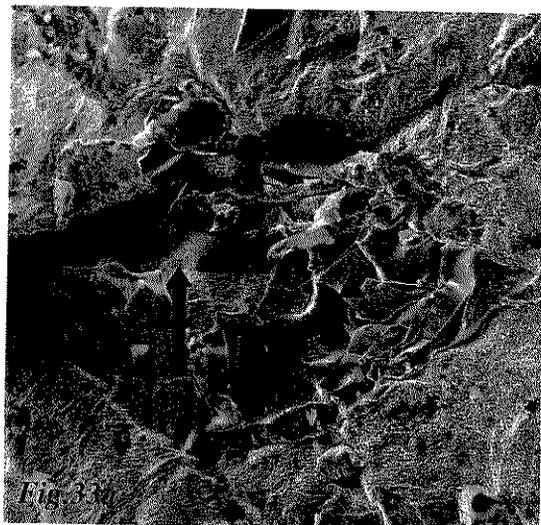
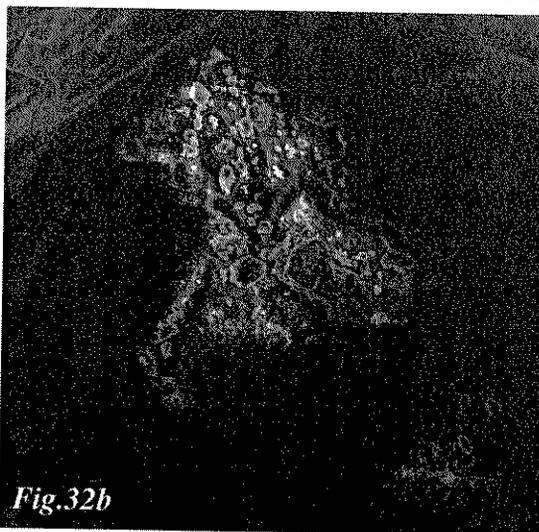
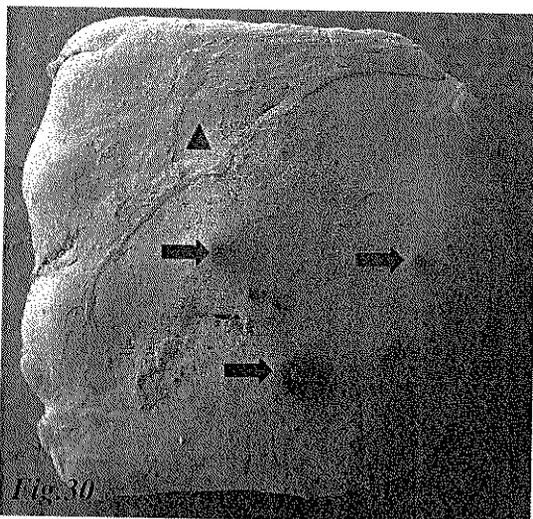






### Microscopia Eletrônica de Varredura





## Legendas

Fig. 1 – Neutrófilos no interior do granuloma não organizado (setas), (N) núcleo, grânulo azurófilo (GA), grânulo específico (GE). *P. brasiliensis* jovem (*Pbj*) com pouco vacúolos, cromatina difusa e parede celular íntegra envolvido por fagossoma no interior do neutrófilo. Aumento de 5.000x.

Fig.2 – a: Macrófago (M) fagocitando o fungo (seta) rodeado por macrófagos epitelióides (Me), aumento de 5.000x; b: Detalhe do Macrófago Epitelióide, aumento de 8.000x; c: Célula Gigante (CG) fagocitando dois fungos (setas), circundada por macrófagos, aumento de 5.000x; (N) núcleo, (n) nucléolo, (m) mitocôndria, grânulo azurófilo (cabeça de seta).

Fig. 3 – (L) linfócito, (P) Plasmócito com grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (seta) e vesículas preenchidas por material homogêneo eletrodense (cabeça de seta), núcleo(N). Acima e à esquerda observamos o macrófago (M). Aumento de 5.000x.

Fig. 4 – Detalhe do eosinófilo em contato com fungo. (N) núcleo, grânulos com conteúdo cristalóide (G). Há uma estreita interface não contínua (seta) entre a superfície do fungo (*Pb*) e o eosinófilo. Aumento de 12.500x.

Fig. 5 – Em a: Processo de degranulação de um mastócito. Os inúmeros grânulos (cabeça de seta) são arredondados, preenchidos por material eletrodense e rompem-se na superfície da célula (seta). O núcleo (N) mostra cromatina eletrodensa com áreas eletrolúcidas. O mastócito ativado está rodeado por plasmócitos (P). Aumento de 5.000x. Em b: mastócito não ativado. Aumento de 6.000x.

Fig. 6 – Célula epitelial do estrato espinhoso, com núcleo central (N), nucléolo eletrodense (n), pontes intercelulares (setas) unidas por desmossomos (cabeça de seta). No citoplasma observamos grande quantidade de filamentos intermediários de queratina. Aumento de 5.000x.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

Fig. 7 – a: *Paracoccidioides brasiliensis* na forma de levedura no interior de uma célula gigante. O fungo mostra camada externa eletrodensa (seta branca), com estruturas fibrilares delicadas e entrelaçadas, camada média clara e homogênea (seta escura), camada interna eletrodensa (cabeça de seta); núcleo (N), nucléolo (n), mitocôndria (m). Aumento de 10.000x. b: Detalhe das estruturas internas do *P.brasiliensis* jovem com poucos vacúolos (V), núcleo (N), mitocôndrias (m). Observe o espaço entre a superfície do fungo e a membrana do fagossoma (seta). Aumento de 10.000x.

Fig. 8 –Ultraestrutura do *P.brasiliensis* adulto no interior da célula gigante. O fungo mostra-se ovalado com vacúolos centrais e periféricos (V), mitocôndrias (cabeça de seta), núcleo (N), camada média clara e camada externa mais eletrodensa, envolta por fina membrana fagossômica com várias projeções digitiformes (seta). Aumento de 8.000x.

Fig. 9 – a e b: Neste caso notamos que a superfície limitada pela membrana plasmática nem sempre mostra regularidade, podendo haver projeções para o interior do fungo (cabeça de seta). Em a: Aumento de 8.000x; em b: Aumento de 6.300x.

Fig. 10 - Processo de gemulação do fungo (*Pb*) no interior da célula epitelial, onde notamos o pedúnculo de ligação (seta), núcleo da célula epitelial (N), nucléolo (n), filamentos intracitoplasmáticos de queratina (cabeça de seta) e citoplasma da célula epitelial (c). Aumento de 7.000x.

Fig. 11 – Processo de gemulação do fungo no interior do granuloma. A célula mãe (seta) mostra estruturas típicas do fungo adulto; nas células filhas (cabeça de seta) há poucos vacúolos (V) e organelas presentes. As estruturas da parede celular são preservadas nas células filhas. Neste caso, a gemulação configura o aspecto de “orelhas de Mickey” típico do *Paracoccidioides brasiliensis*. Aumento de 5.000x.

Fig. 12 – Detalhe da área de gemulação, formação e início do rompimento do pedúnculo de ligação entre a célula mãe e filha (seta). A invasão distorce estruturas fibrilares colágenas

ao seu redor (cabeça de seta). No detalhe da célula filha, podemos observar ainda algumas organelas e a presença do núcleo (N) e um vacúolo (V). Aumento de 20.000x.

Fig. 13 – Presença de fungo jovem no interior de uma célula epitelial (seta), nota-se a presença de filamentos de queratina no citoplasma (cabeça de seta). Núcleo finamente granuloso (N), nucléolo mais eletrodenso (n). Aumento de 5.000x.

Fig. 14 – Área de granuloma em organização com células gigantes (CG). Nota-se presença de fungo adultos (seta branca) e jovens (seta preta) no interior das células gigantes. Há macrófagos epitelioídes (Me) e plasmócitos (P). Aumento de 2.000x.

Fig. 15 – Célula mãe no interior da célula gigante (CG) multinucleada (N) do granuloma organizado, com grande quantidade de vacúolos (V), mostrando região em início de gemulação (seta) e célula filha recém formada (cabeça de seta). Acima há presença de fungo isolado (Pb). Aumento de 2.500x.

Fig. 16 – Granuloma desorganizado, com presença de neutrófilos (N), plasmócitos (P), macrófagos (M), vários fungos jovens (setas) no interior de fagossomas dos neutrófilos e em proximidade algumas hemácias (H). Aumento de 1.600x.

Fig. 17 – Neutrófilo em processo de morte do *P.brasiliensis*. no interior do fagossoma (setas) observamos a presença de fungo jovem (Pbj) e fungo adulto (Pba) com núcleo (N), nucléolo (n) e vacúolo (v). Nota-se a presença Grânulos azurófilos do neutrófilo (GA) e grânulos específicos (GS). Há fusão dos grânulos azurófilos com o fagossoma e liberação de seu conteúdo eletrodenso (cabeça de seta). (H) hemácia. Aumento de 5.000x.

Fig. 18 – Em a e b: Grânulos Azurófilos (GA) em degranulação no interior do fagossoma do neutrófilo (setas). Observe que o conteúdo eletrodenso espalha-se pela interface fagossoma e superfície fúngica (cabeças de seta). Em b: nota-se a presença em proximidade de grânulo específico (GS). Em a: Aumento de 20.000x, em b: Aumento de 25.000x.

Fig. 19 - *P.brasiliensis* adulto no interior da célula gigante. Há pequenas alterações da parede celular (setas) e presença de material finamente granuloso e eletrodense na interface (cabeças de seta). Núcleo da célula gigante (N), nucléolo (n) e vesícula lisossomal com pequeno conteúdo eletrodense (L). Aumento 10.500x.

Fig 20 – Morte do *P.brasiliensis* por vários neutrófilos. O conteúdo do fungo mostra-se amorfo com pequenas áreas eletrodensas evidenciando sua destruição, mantendo apenas a parede externa do fungo retraída (seta). (N) núcleo dos neutrófilos; limite das superfícies entre neutrófilos (cabeças de seta). Aumento de 2.500x.

Fig. 21 – Degradação do fungo no interior dos fagossomas dos neutrófilos (N). Nota-se presença de fungo adulto (*Pba*) com alteração de seu conteúdo e de sua parede celular (seta). O fungo jovem (*Pbj*) mostra apenas pequena distorção de sua parede celular (cabeça de seta). Aumento 3.150x.

Fig. 22 – Destruição do fungo no interior do neutrófilo. O *P.brasiliensis* perde sua forma ovalada e torna-se irregular (seta). Seu conteúdo está degradado com presença de estruturas vacuolares (V). A parede externa mostra-se alterada (cabeça de seta). Aumento de 5.000x.

Fig. 23 – *P.brasiliensis* jovem no interior da célula gigante. Núcleo (N), Vacúolos (V), parede externa íntegra (seta), parede interna e média levemente distorcida (cabeça de seta). Há degranulação com material finamente eletrodense (asterístico) e citoplasma vesiculoso da célula gigante com várias mitocôndrias (m). Aumento de 8.000x.

Fig. 24 – Presença de *P.brasiliensis* adulto (*Pba*) com vacúolos (V) e sem alterações da parede celular (seta). O fungo está envolvido por citoplasma vesiculoso semelhante de célula gigante e rodeado por Neutrófilos (N) e Macrófagos (M). Aumento de 2.000x.

Fig. 25 – Disseminação hematogênica. *P.brasiliensis* (seta) no interior do neutrófilo (N); hemácia (H). Aumento de 3.150x.

Fig. 26 – Em a: Capilar. Camada íntima revestida por célula endotelial (seta), núcleo da célula endotelial (N), nucléolo (n). Camada adventícia de tecido conjuntivo frouxo revestindo o endotélio (CA); hemácias (H) e plasma (P). Aumento de 2.500x.

Fig. 27 – Em a: Fibra nervosa mielínica (seta), envolvida pela célula de Schwann, na qual pode-se observar seu núcleo (N) e citoplasma (c), em proximidade há um plasmócito (P). Aumento de 3.150x. Em b: detalhe da bainha de mielina que reveste a fibra nervosa, mostrando disposição lamelar (cabeça de seta). Aumento de 63.000x.

Fig. 28 – Superfície normal da mucosa bucal. As células epiteliais se dispõem lado a lado como “folhas sobre um terreno” firmemente aderidas. Algumas destas células estão descamando (setas). Aumento de 200x.

Fig. 29 – Superfície da célula epitelial na região de mucosa normal. As células são poliédricas e unidas lado a lado. A superfície é irregular e corrugada. A região anterior sugere início de descamação (seta). Aumento de 2.000x

Fig. 30 – Superfície da lesão de Paracoccidiodomicose Bucal, região de mucosa jugal. As setas mostram as regiões de micro-erosão. Há uma área com superfície normal (cabeça de seta). Aumento de 18x.

Fig. 31 - Região de micro-abscesso. A alteração inicial da superfície celular tem formato ovalado, região central elevada (seta) circundada por depressão (cabeça de seta) de aspecto liso. A área central é escurecida, com fina camada superficial translúcida. Aumento de 500x

Fig. 32 – a: Presença de três áreas afetadas. O região central e escura na superfície da célula epitelial corresponde a área de micro-abscesso com esfoliação parcial da superfícies celulares (cabeças de seta). Aumento de 500x. b: Micro-abscesso evoluído envolvendo várias células epiteliais, formando lesão única com superfície irregular (cabeça de seta). Aumento de 500x.

Fig. 33 – a: região de micro-abscesso recém rompido (seta). Células epiteliais periféricas com superfície alterada de aspecto liso (cabeça de seta). Aumento de 1.000x. b: Detalhe da micro-erosão. Fragmentos celulares aderidos à borda da lesão (setas) e leito mostrando superfície de células epitelial normal (cabeça de seta). Aumento de 3.000x.

## DISCUSSÃO

Há muitos relatos na literatura de trabalhos “*in vitro*” e “*in vivo*” que objetivam esclarecer os vários aspectos da paracoccidiodomicose e muitos visam preferencialmente a cavidade bucal, área de atuação dos cirurgiões-dentistas. **MOTTA & PUPO**, em 1936 já chamavam a atenção dos cirurgiões-dentistas para esta entidade mórbida, principalmente no que diz respeito ao diagnóstico diferencial com outras doenças infecciosas e neoplásicas da boca, sendo de extrema importância o conhecimento adequado desta patologia (**de ALMEIDA et al., 1991; COLOMBO et al., 1992; SCULLY et al., 1992 e SPOSTO et al., 1993**), visto a grande mortalidade ainda presente nas áreas endêmicas no Brasil (**COUTINHO et al., 1998**).

No que diz respeito ao aspecto epidemiológico, **FRANCO (1994)**, relata que a forma crônica da doença ocorre principalmente em homens na faixa etária entre 30 a 49 anos, chegando à proporção de 25 homens para cada mulher afetada. Em 39 pacientes estudados por **SPOSTO et al. (1993)** com lesões bucais, 89% eram homens com média de 46 anos de idade. Em 584 casos atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – UNICAMP, **BLOTTA et al. (1999)** verificou que 84% dos pacientes eram homens com idade entre 41 a 50 anos de idade, afetando preferencialmente trabalhadores rurais totalizando 46%, numa proporção entre homens e mulheres em 5.4:1. Em estudo prévio, observamos que em 64 pacientes analisados, 60 pacientes (93,75%) eram homens, com idade média de 44,51 anos. No presente trabalho, 18 casos eram homens (90%) com idade média de 45,88 anos. Decorrente ao efeito protetor do hormônio feminino a incidência desta micose em mulheres com atividade hormonal é baixa, chegando à proporção de 25 homens para cada mulher afetada (**ARISTIZABAL et al., 1998**).

Os locais freqüentemente biopsiados corresponderam às áreas de maior incidência relatados por **BHASKAR (1989); de ALMEIDA et al. (1991); SPOSTO et al., (1993); GONZAGA et al. (1995) e VILLALBA, H (1998)**. Nossos pacientes mostravam lesões múltiplas, portanto as biópsias visaram regiões menos traumáticas e facilidade de acesso, havendo predominância de biópsias em mucosa jugal, seguida do rebordo alveolar. Apesar de **BHASKAR (1989)** relatar que as lesões no assoalho bucal sejam freqüentes, **SPOSTO et al. (1993)** observou esta lesão em apenas um caso, o mesmo ocorrendo em

nossa análise prévia com 64 pacientes, porém, nenhuma lesão do presente estudo correspondeu a esta região. As biópsias visavam diagnóstico histopatológico e parte do material foi separado e processado para análise ultraestrutural.

Seu agente etiológico, o *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), classificado de forma definitiva por ALMEIDA (1930), é um fungo dimórfico, que cresce a 37°C na forma de levedura, com parede dupla e múltiplos brotamentos em forma de roda de leme e à temperatura ambiente na forma de finos filamentos septados, dando origem ao micélio (SAN BLAS & SAN BLAS, 1985; KASHINO et al., 1987). Nos tecidos foi encontrado na forma de levedura, com aspecto arredondado, esférico ou oval e dupla membrana refringente. Na maioria das vezes exibindo célula mãe com brotamentos múltiplos, ligados por um pedúnculo (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1977; LACAZ, 1994; TOLEDO et al., 1995; VILLALBA H., 1998).

A confirmação do diagnóstico depende da visualização do agente etiológico (de ALMEIDA et al., 1991; SPOSTO et al., 1993; AMADEU FIALHO, 1946; BERTOLINI et al., 1981; URIBE et al., 1987; de ALMEIDA et al., 1991; de LIMA et al., 1995; BURGER et al., 1996), observado em todas biópsias processadas para microscopia óptica convencional através da coloração de rotina H/E (hematoxilina eosina), PAS (ácido periódico de Schiff) e pela prata (Gomori-Grocott), sendo encontrado também no material separado e processado para análise ultraestrutural.

As características ultraestruturais da Paracoccidioidomicose foram descritas inicialmente nos anos 60 por LACAZ em microscopia de transmissão, sendo CARBONELL (1969) o primeiro a descrever as três camadas na parede do fungo, em estudo comparativo entre a fase micelial e leveduriforme, evidenciando a camada interna composta por uma fina membrana plasmática, camada média mais espessa e camada fibrilar externa.

Estes achados foram posteriormente descritos em tecido humano por FURTADO et al. (1967) e KASHINO et al. (1987). Apesar de KASHINO et al. (1987), terem trabalhado com dez isolados diferentes de *P. brasiliensis* obtidos de pacientes que viveram em diferentes áreas endêmicas, os aspectos morfológicos e ultraestruturais foram semelhantes em todos os isolados, mostrando células arredondadas ou ovaladas, parede com espessura de 0,1 a 0,2µm, camada mais externa delgada e eletrodensa, segunda camada larga,

homogênea e pouco eletrodensa e terceira camada interna como unidade de membrana, mostrando estrutura trilaminar. O aspecto da parede celular do *P.brasiliensis* fica evidente nas figs. 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13, o que corresponde aos achados descritos anteriormente. **CARBONELL et al., (1970)** chamava atenção ainda para a camada superficial do fungo, formada por microfilamentos e composta por *alfa* e *beta* 1,6 glucana, importantes na patogenicidade do fungo. Estes microfilamentos são bem observados na figura 7 onde o fungo mostra camada externa eletrodensa (seta branca), com estruturas fibrilares delicadas e entrelaçadas, camada média clara e homogênea (seta escura) e camada interna eletrodensa (cabeça de seta).

No interior do fungo observamos mitocôndrias, algumas próximas a superfície da célula (fig 7) e vacúolos claros de diferentes tamanhos e formas, sendo que alguns deles continham grande quantidade de material eletro-denso (figs. 8, 9, 11, 14, 15 e 24). O Aparelho de Golgi não foi identificado. Nossos achados coincidem com os descritos previamente por **FURTADO et al. (1967)** e **KASHINO et al. (1987)**. O núcleo geralmente é ovalado ou levemente irregular com nucléolo evidente (figs. 7, 8 e 12), sendo em alguns casos difícil de ser identificado. Segundo **BORBA et al. (1999)** ao analisar o crescimento do *P.brasiliensis* em diferentes meios de cultura, mostrou que as leveduras de *P.brasiliensis* são multinucleadas com dois a cinco núcleos envoltos por membrana nuclear porosa e nucléolo evidente. Porém **KASHINO et al. (1987)** não identificou a presença de nucléolo no interior do núcleo das leveduras.

**KASHINO et al. (1987)** descreveram também a presença de múltiplas invaginações para o interior da membrana plasmática do fungo, constituindo vesículas e estruturas tubulares associadas a formação dos septos no processo de brotamento. Estas invaginações foram observadas na fig. 9, ocorrendo em fungo adulto e no interior da célula gigante (fig. 19 e 23), associado a material finamente granuloso e eletrodense na interface fungo e membrana do fagossoma, descrito também por **IABUKI & MONTENEGRO (1971)**.

O início do processo de gemulação mostra formação de pequena saliência na superfície do fungo (fig. 15). A célula mãe é rodeada por células filhas que apresentam estruturas de parede celular semelhante à da célula mãe (figs. 10, 11 e 12) e ligadas por um pedúnculo, característica mais evidente segundo (**SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1977; LACAZ, 1994; TOLEDO et al., 1995, VILLALBA, H. 1998**). **MIGUETTI et al. (1985)**

em microscopia de varredura e **KANETSUNA F. (1981)** em microscopia de transmissão descreveram o fungo com grande número de corpos emergindo de sua superfície em diferentes tamanhos e formas. Esses brotamentos mostravam-se firmemente ou ligeiramente aderidos à célula mãe com superfície coberta com componentes microfibrilares formando uma delicada rede sobre a superfície.

O processo de gemulação foi observado principalmente no interior das células gigantes (figs 11 e 15) e macrófagos, de forma rara no interior da célula epitelial (fig. 10), mostrando ainda invasividade na matriz conjuntiva pela distorção das fibras colágenas (fig. 11). A presença de *P. brasiliensis* em nosso modelo de estudo veio de encontro a literatura, sendo observado principalmente no interior das células gigantes tanto no interior dos granulomas como fora dos granulomas **URIBE et al. (1984)**. A formação de brotamentos ocorreu principalmente no interior das células gigantes o mesmo visto por **BERTOLINI et al. (1981)**. **MOSCARDI-BIACCHI et al., (1994)** utilizando monócitos e macrófagos de indivíduos normais, verificaram que estas células permitem o crescimento e a multiplicação intracelular do *P. brasiliensis*. **BRUMMER et al., (1988b, 1989)** demonstraram ainda que macrófagos peritoneais e pulmonares de camundongos normais são incapazes de limitar a multiplicação de leveduras do *P. brasiliensis* fagocitadas, porém quando ativados por linfocinas, principalmente IFN- $\gamma$ , demonstraram que macrófagos não somente impedem a multiplicação como apresentam atividade fungicida, demonstrando assim um papel essencial na resistência à paracoccidioomicose.

Algumas leveduras estavam como formas livres, não aderidas à célula mãe (fig. 8), presentes no interior dos macrófagos (fig. 2a); neutrófilos (fig. 1 e 25) e/ou das células gigantes (figs. 2c e 9). Esses achados foram descritos previamente por **KANETSUNA F. (1981)** e **CARBONELL (1969)** em microscopia de transmissão e por **VIEIRA E SILVA et al., (1974)** em microscopia de varredura, onde observou presença de formas livres persistentes, espalhadas no meio de cultura, sem brotamentos e de tamanho reduzido, sugerindo formas quiescentes ou recém formadas, que desprendiam-se tanto do micélio quanto da levedura e acometiam o meio externo, correlacionando com a epidemiologia da doença.

De fato, além da epidemiologia da doença, a presença destas formas quiescentes e isoladas participam de forma ainda não esclarecida na patogenia da doença. Este aspecto é

observado no trabalho de **FRANCO (1987a)** o qual descreveu que o foco de infecção pode regredir com a destruição do fungo, permanecer na forma latente com fungos viáveis ou, dependendo das condições do hospedeiro e da virulência do fungo, progredir comprometendo diferentes órgãos ou sistemas, levando ao aparecimento de sintomas. **RESTREPO, A. (2000)** observando casos latentes com fungos viáveis, relata que a micose pode se manifestar clinicamente após muitos anos, fato este observado nos pacientes que desenvolvem a doença fora das áreas endêmicas, muitos anos depois de terem estado nestas áreas (**CHIKAMORI et al., 1984; PADILHA-GONÇALVES, 1985; MANNS et al., 1996; TOMIMORI-YAMASHITA et. al.,1997; BURNS et al., 2000**), os quais mostram fungos viáveis porém com poucos brotamentos e pequenos.

De forma rara, o fungo foi observado no interior da célula epitelial (fig. 13) e mais raramente em gemulação (fig. 10). Estes aspectos não foram descritos na literatura e sugerem que os fungos são capazes de infectar e sobreviver no interior das células epiteliais podendo destruí-las, o que poderia promover a formação dos microabscessos intraepiteliais.

Os microabscessos promovem alterações na superfície da mucosa bucal observadas em microscopia de varredura. Estas alterações foram descritas apenas em microscopia óptica convencional e bem estabelecida por vários autores, que correlacionam o aspecto moriforme das lesões com a superfície granulosa, pontos hemorrágicos e presença de microabscessos intraepiteliais (**de ALMEIDA et al., 1991; SCULLY et al., 1992; SPOSTO et al., 1993; SPOSTO et al., 1994; e GONZAGA et al., 1995; VILLALBA, H. 1998**).

Na varredura, as células epiteliais acometidas pela formação dos microabscessos intraepiteliais mostram superfície elevada na porção central, escurecida e recoberta por delgada membrana translúcida, mostrando conteúdo escuro (hemorrágico). A porção periférica torna-se deprimida e lisa, envolvendo o restante da superfície (fig. 31). Pelo acometimento de várias células epiteliais simultaneamente e pela proximidade das lesões vistas na fig. 32a, a evolução do processo sugere que estas devam se coalescer antes de romper por completo (fig. 32b), onde observamos uma lesão mais extensa e com superfície degenerada. O rompimento do micro-abscesso forma uma micro-erosão, com inúmeros fragmentos celulares e leito recoberto por célula epitelial com aspecto de normalidade (fig. 33). Este aspecto sugere que microabscessos mais superficiais devam formar apenas micro-

erosões e quando há envolvimento de células em profundidade, o rompimento dos microabscessos formem micro-ulcerações, não evidentes em nossos achados.

Sabe-se que lesões bucais mostram áreas de microabscessos principalmente no interior do tecido epitelial, em proximidade com a superfície da lesão e com presença de fungos (de ALMEIDA et al., 1991; SCULLY et al., 1992; SPOSTO et al., 1993; SPOSTO et al., 1994; e GONZAGA et al., 1995; VILLALBA H., 1998). Nestas regiões o infiltrado agudo é geralmente intenso, com predomínio de neutrófilos que circundam o fungo formando estruturas tipo rosetas, o mesmo tendo sido observado por BURGER et al. (1996), que descreveram também uma maior intensidade de *P.brasiliensis* no interior do foco necrótico. URIBE et al. (1987) descreveram a formação de microabscessos intraepiteliais em lesões bucais e de pele, mostrando ainda que a formação dos microabscessos proporciona eliminação do fungo e de vários elementos celulares via epitelial, sendo possível sua visualização em citologias esfoliativas (de BRITO et al., 1973; de ARAÚJO M.S.; 2001). Em nosso estudo, fica evidente que as tênues membranas que recobrem as áreas superficiais dos microabscessos são rompidas mecanicamente durante o procedimento de raspagem, liberando seu conteúdo e propiciando coleta do fungo, visualizado no exame citopatológico.

Neutrófilos (figs. 1, 16, 21 e 22) predominaram no interior dos microabscessos (fig. 20) e nos granulomas não organizados (fig. 15), sendo vistos em todas as biópsias preparadas para microscopia de transmissão, apresentando os mesmos aspectos ultraestruturais descritos previamente por Baidon, D.F. (1999). Estas células chamam atenção pela associação à partículas fúngicas e atividade fagocitária com processo de destruição (figs. 17 e 18). GOIHMAN-YAHR et al. (1992) descreveram que os neutrófilos são células com atividade fagocitária eficiente, porém apresentam uma deficiência na digestão do *P.brasiliensis*, parecendo que esta característica é específica para o fungo. Este fato parece estar relacionado com a disseminação do fungo no organismo, podendo ocorrer disseminação hematogênica (fig. 25) e/ou linfática (GONZÁLEZ-OCHOA, A., 1971; FRANCO et al., 1989; LACAZ C.S., 1994; LONDERO et al., 1996).

BURGER et al. (1996) descreveram presença intensa de neutrófilos principalmente na primeira semana de infecção, caracterizando principalmente o período agudo inicial, porém observou a presença de neutrófilos em todos os períodos analisados, mas em menor

quantidade, presente então em todo curso da doença. O mesmo foi observado por **URIBE et al. (1987)** e **XIDIEH et al. (1999)**. Estudos têm demonstrado que, após a instalação dos fungos nos tecidos, os leucócitos polimorfonucleares são rapidamente atraídos para o local por ação de substâncias quimiotáticas resultantes de ativação do sistema complemento. Além disso, o fungo interagindo com macrófagos alveolares induz à liberação de peptídeos, que atraem neutrófilos ao foco de infecção (**CALICH et al., 1994**). **IABUKI & MONTENEGRO (1979)** descreveram ainda que a proximidade dos neutrófilos com o fungo leva a degeneração citoplasmática e perda das membranas celulares, enquanto que à distância são normais.

No presente estudo verificamos que neutrófilos em fagocitose mudam sua morfologia, mostrando núcleo com cromatina difusa e áreas eletrodensas, formando o fagossomo e envolvendo células fúngicas; lisossomas unem-se à superfície do fagossoma e fusionam-se, liberando seu conteúdo eletrodense. O material eletrodense depositado na interface fagossoma e superfície fúngica mostra-se finamente granuloso (figs. 17 e 18). Não observamos degeneração citoplasmática e perda das membranas celulares. Talvez este fato esteja relacionado a cronicidade das lesões do presente estudo, e que alterações citoplasmáticas e perda das membranas celulares ocorram principalmente na fase aguda da doença como descrito por **IABUKI & MONTENEGRO (1979)**.

Fungos em destruição mostraram interface pequena ou ausente entre sua superfície e o fagossoma, geralmente com fino material granuloso eletrodense no interior (fig. 18). Este material era proveniente dos grânulos intracitoplasmáticos dos neutrófilos observados nas figuras 17 e 18. A degradação fúngica mostra alteração das estruturas da parede do fungo, nas camadas média e interna e perda do conteúdo intracelular, permanecendo apenas a camada externa, retraída ou não (fig. 20, 21 e 22). **BRUMMER et al., (1990)**, em estudos ultraestruturais de leveduras de *P.brasiliensis* no interior de macrófagos ativados foi possível demonstrar que após 4 horas de interação, a destruição das células fúngicas ocorre no interior de fagossomos bem definidos, geralmente rodeados por vários lisossomos preenchidos por estrutura granular e intensamente eletrodensa, na qual há desintegração citoplasmática e esvaziamento das células fúngicas, restando apenas a parede celular.

**IABUKI & MONTENEGRO (1979)** em análise ultraestrutural, mostraram de forma detalhada a presença de uma pequena interface entre o *P.brasiliensis* e as células

inflamatórias quando o fungo está morto ou degenerado, ocorrendo principalmente em fungos maiores e multinucleados com paredes irregulares, porém esta interface é ampla em fungos viáveis, geralmente pequenos, com um único núcleo, mostrando que os diferentes padrões de interação do *P. brasiliensis* com células do hospedeiro podem ser decorrentes do afluxo de células inflamatórias funcionalmente diferentes ao local de inoculação ou à idade dos fungos ou ambos os fatores.

Na ultraestrutura observamos interface larga entre fungos viáveis e a membrana do fagossoma das células de defesas (fig. 7b) com ausência ou mínima alteração da superfície, evidenciada por pequenas invaginações da camada média e da membrana plasmática envolvidas por depósitos finamente granulosos e eletrodensos (fig. 19 e 23). Fungos adultos desenvolvem-se em grandes células, assumindo grandes proporções no interior das células gigantes de granulomas não organizados (fig. 24), geralmente sem alteração de parede celular ou do conteúdo intracitoplasmático. Aspecto predominante encontrado nos granulomas epitelióides descritos por **IABUKI & MONTENEGRO (1979)**, **NABARRA et al. (1979)**, **DEFAVERI et al. (1989)** e **BRUMMER et al. (1990)**.

A presença de infiltrado inflamatório crônico e granulomatoso nas lesões bucais de paracoccidioidomicose são comumente descritas (**FONSECA, 1963**; **LAUAND, 1975**; **URIBE et al., 1987**; de **ALMEIDA et al., 1991**; **SCULLY et al., 1992**; **FRANCO et al., 1993**; **SPOSTO et al., 1993**; **SPOSTO et al., 1994**; **MENDES, 1994**; **GONZAGA et al., 1995**; **BURGER et al., 1996**; **ALVES DOS SANTOS, 1997**; **VILLALBA, H. 1998**). O acometimento mucocutâneo ocorre apenas nos processos crônicos da doença, onde é observado uma resposta inflamatória predominante de células mononucleares (fig. 2 e 3), observado também por de **ALMEIDA et al., 1991**, geralmente de duração prolongada e instalação lenta e gradual de forma uni ou multifocal envolvendo vários órgãos (**PADILHA-GONÇALVES, 1985**; **LONDERO et al., 1986**; **COLOMBO et al., 1994**; **MOURA et al., 1994**).

O padrão de resposta granulomatosa tem sido estudado por vários autores, estando bem estabelecido seus aspectos morfológicos, processo de formação, classificação, componentes celulares e graus de maturação (**ADAMS, 1976**; **WILLIAMS et al., 1983**; **KERR et al., 1988**; de **BRITO & FRANCO, 1994**; **XIDIEH et al., 1999**). A presença de granulomas nas lesões bucais foi descrito por vários autores (**URIBE et al., 1987**; de

ALMEIDA et al., 1991 e SCULLY et al., 1992; VILLALBA, H. 1998), e encontrados em todos os nossos casos.

BRITTO & FRANCO (1994) relataram as duas formas opostas de resposta frente ao agente etiológico descritas previamente por MUSATTI et al. (1976); MENDES (1980) e YARZÁBAL et al. (1980). A resposta anérgica, onde não ocorre a formação de granulomas organizados e existe uma grande intensidade de fungos nas lesões, e a forma hiperérgica, onde os granulomas apresentam-se organizados com discreta presença de fungos em seu interior. Muitos casos porém permaneceram no padrão intermediário de resposta, podendo estar relacionado a virulência do fungo ou pelo tipo de resposta inflamatória do hospedeiro como descrito por FRANCO et al. (1989); SINGER-VERMES (1989) e SINGER-VERMES et al. (1994). No presente estudo predominou padrão intermediário de resposta, com formação de granulomas organizados e desorganizados, variando também a quantidade de fungos nas lesões.

Na análise ultraestrutural, Os granulomas organizados mostram região central ocupada por células gigantes multinucleadas, com citoplasma extenso, ricamente vesiculoso e raros grânulos azurófilos. Geralmente os fungos mostram estrutura típica com pouca ou nenhuma distorção da parede celular, com ou sem brotamento, no interior das células gigantes. Periféricamente e/ou no interior do granuloma organizado podemos observar macrófagos epitelióides, linfócitos e/ou plasmócitos (figs. 14 e 15). Estes achados coincidem com nosso trabalho prévio em microscopia óptica e descrito por vários autores (de ALMEIDA et al., 1991; MOSCARDI-BACCHI, 1983; URIBE et al. (1987); McEWEN, 1987; KERR et al., 1988; RESTREPO et al., 1992; BURGER et al., 1996).

Os granulomas desorganizados perdem as características anteriores, são mais celularizados, geralmente com neutrófilos no interior realizando fagocitose, macrófagos, plasmócitos e maior quantidade de fungos jovens com ou sem brotamentos (fig. 16). Apesar da presença de fungos no interior dos macrófagos (fig. 2a), estes não mostravam alteração ultraestrutural. Em nosso estudo prévio observamos que nos granulomas não organizados os tipos celulares eram os mesmos dos granulomas organizados, porém distribuídos de forma aleatória. O mesmo observado na ultraestrutura, mostrando maior intensidade de células mononucleares (fig. 3), polimorfonucleares (fig. 16) e presença de células gigantes com fungos (fig. 2c), aspectos estes também observados por MOSCARDI-

BACCHI, (1983); McEWEN, (1987); KERR et al., (1988); de ALMEIDA et al. (1991), RESTREPO et al., (1992); FRANCO et al. (1993); MENDES, (1994). O *P. brasiliensis* desenvolve respostas tipo humoral e celular, com ativação linfocítica e macrofágica (FRANCO et al., 1993; CALICH et al., 1994 e PERAÇOLI et al., 1995). A ativação dos macrófagos via linfocinas ou diretamente pelo antígeno, leva a união de células formando as células gigantes tipo corpo estranho ou tipo Langhans. Estas células são comumente observadas na análise ultraestrutural das lesões bucais de paracoccidiodomicose (figs. 2, 14 e 15). Seu aspecto ultraestrutural mostra presença de três ou mais núcleos, citoplasma volumoso e vesiculoso, com presença de poucos grânulos intracitoplasmáticos eletrodensos, geralmente com fungo no interior com ou sem brotamento.

FRANCO et al. (1997) relatam correlação entre a forma clínica da doença e a formação de granulomas “*in vitro*”, nos pacientes com forma aguda da doença houve menor intensidade de formação de granulomas, já em pacientes com a forma crônica da doença, desenvolveram reação granulomatosa persistente “*in vitro*”. Nossa análise evidenciou principalmente áreas com granulomas não organizados, com macrófagos, neutrófilos, plasmócitos e vários fungos jovens no interior dos neutrófilos (fig. 16). Este fato foi observado em estudo prévio onde observamos tendência de formação de granulomas não organizados nas lesões bucais.

A presença de linfócitos CD4, foi descrita por MOSCARDI-BACCHI et al., (1989) e por SHIEFFIELD (1990) nas lesões granulomatosas, principalmente na região central dos granulomas. Linfócitos do tipo CD8 foram vistos principalmente na periferia das lesões formando um anel ao redor das lesões granulomatosas. Na nossa análise das lesões bucais a presença de linfócitos foi evidente nos granulomas, sendo vistos na periferia (fig. 3) e na região central. É difícil avaliar a resposta linfocítica nas lesões bucais, embora linfopenia no sangue tenha sido relatada por DEFAVERI et al. (1979) e BAVA et al. (1991) em pacientes com paracoccidiodomicose. Observamos contudo, casos em que predominavam células mononucleares como linfócitos e plasmócitos, principalmente nos casos onde a formação de granulomas não organizados predominavam. Os mesmos achados foram vistos por URIBE et al. (1987); COELHO et al. (1994) e BURGER et al. (1996). Contudo, não observamos linfócitos em proximidade com o fungo, porém mostrou característica ultraestruturais de células ativadas, como a presença de plasmócito rico em

retículo endoplasmático rugoso extenso, distendido com moléculas de anticorpos (linfócito B ativado) e linfócito T ativado, mostrando citoplasma granuloso com pouco retículo endoplasmático evidente, núcleo arredondado e levemente deslocado para periferia (fig. 3). Características ultraestruturais observadas também por **BOBRY SHEV & WATANABE (1997)**, **ZHANG et al., (1997)** e **FENG et al., (1997)**.

A presença de grande número de eosinófilos em tecidos como nasofaringe, pulmões, pele, intestinos e trato genito-urinário tem sido relatada por vários autores (**FOOT, 1965**; **HUDSON, 1968** e **SPRY, 1971**). Sabe-se que estas células participam como moduladores de reações de hipersensibilidade do tipo I (Tipo anafilática) nas mucosas e aumentam em número em doenças parasitárias e em algumas patologias de origem desconhecida como na úlcera eosinofílica. **COELHO et al. (1994)** descreveram a presença de eosinófilos em lesões de diversos órgãos causadas por *P. brasiliensis* inoculados via intratesticular, circundando células fúngicas viáveis. **BURGER et al. (1996)** descreveram a presença de eosinófilos nos períodos iniciais e tardios, o que correspondeu a primeira e oitava semana após a infecção inicial respectivamente, com quantidade aumentada no período tardio, juntamente com a diminuição dos componentes agudos e aumento de células mononucleares como linfócitos e plasmócitos.

A presença de eosinófilos nas lesões bucais de paracoccidiodomicose é um achado comum tendo sido relatado por vários autores (**URIBE et al., 1987**; **COELHO et al., 1994**; **BURGER et al., 1996**). Em nosso estudo prévio observamos estas células em 92,18% dos casos, sendo que de forma intensa em 13 casos (20,31%), presentes no interior do tecido conjuntivo, tecido epitelial e em áreas de microabscessos, apresentando-se em algumas regiões em associação às células fúngicas, o mesmo observado por **COELHO et al. (1994)**. Contudo **BURGER et al., (1996)**, não demonstraram associação de eosinófilos com fungos em análise por microscopia eletrônica de transmissão, apenas observaram estas células em locais próximos ao fungo., o mesmo observado na figura 4. Os eosinófilos mostraram ultraestruturalmente grânulos intracitoplasmáticos ovalados que mostravam região central eletrodensa e com aspecto cristalóide (*internum*) envolvida por área clara eletrodensa (*externum*), por apresentar núcleo bilobulado verificamos duas partes separadas com cromatina finamente granulosa e eletrodensa. Os grânulos ocupavam quase a totalidade do citoplasma sendo maiores do que os grânulos dos neutrófilos. O mesmo

descrito por **BANTON & FARQUHAR (1970)**. Apesar de estarem comumente presentes, não se sabe a função exata destas células nas lesões de paracoccidiodomicose.

Mastócitos foram vistos nas lesões bucais de paracoccidiodomicose, porém de forma rara (figs. 5a e 5b). A degranulação de um mastócito mostrou inúmeros grânulos arredondados, preenchidos por material eletrodense central em diferentes tamanhos, rompendo-se na superfície da célula. O núcleo é excêntrico, riniforme, com cromatina densa. Achados semelhantes são descritos por **MONTEFORTE et al., (2001)** os quais evidenciam as mudanças ultraestruturais de mastócitos humanos no interior dos fascículos nervosos ao longo dos terminais axônicos, quando os mesmos são eletro-estimulados. A degranulação dos mastócitos nas lesões bucais no entanto deve ser resultado da reação inflamatória local originada pelo fungo. O processo inflamatório inicial leva a ativação e degranulação dos mastócitos perivasculares com liberação das aminas vaso-ativas (histamina e serotonina) (**ROBBINS, 1999**), além disso, pode haver ativação mediada por IgE (**XIANG et al., 2001**). A análise ultraestrutural apenas não nos permite avaliar a via de ativação dos mastócitos nas lesões bucais de paracoccidiodomicose.

Hiperplasia pseudoepiteliomatosa nas lesões bucais de paracoccidiodomicose, com áreas de espongiose, displasias leves, exocitose e áreas de microabscessos são achados comuns. (**FRANCO et al., 1982; HIRSCH et al., 1984; URIBE et al., 1987** e de **ALMEIDA et al., 1991; VILLALBA H., 1998**). No entanto, nossa análise visou principalmente observar algum padrão de alteração celular, não encontrado nas células epiteliais presentes (fig. 6). Notamos apenas que estas células podem ser acometidas pelo fungo (figs. 10 e 13) sendo foco de infecção e possivelmente levando à formação dos microabscessos intra-epiteliais previamente descritos.

Vasos sanguíneos (fig. 26) e nervos (fig. 27) foram comumente observado no interior do tecido conjuntivo das lesões bucais de paracoccidiodomicose. Estas estruturas mostraram aspecto ultraestrutural normal descritas por **ZHANG et al., (1997)**, mesmo àquelas envolvidas por células inflamatórias decorrente infecção fúngica local. Fungos não foram observamos em contato com estas estruturas.

## CONCLUSÕES

1. A análise ultraestrutural mostrou predomínio de processo inflamatório crônico e granulomatoso. Apesar de eosinófilos terem sido encontrado em íntimo contato com *P. brasiliensis*, não observamos alteração ultraestrutural sugestiva de degradação fúngica.
2. *P. brasiliensis* em processo de destruição foram vistos principalmente no interior dos neutrófilos, mostrando pequena ou ausente interface entre sua superfície e o fagossoma da célula de defesa, sendo as camadas média e interna degradadas juntamente com o conteúdo intracelular, permanecendo apenas a camada externa, retraída ou não. *P. brasiliensis* viáveis mostram interface larga, com ou sem brotamento e predominaram no interior dos macrófagos e células gigantes.
3. *P. brasiliensis* foi observado raramente no interior das células epiteliais, com ou sem brotamentos, podendo desempenhar papel fundamental na etiopatogenia dos microabscessos intraepiteliais.
4. Os achados em microscopia eletrônica de varredura revelou a progressão dos microabscessos intraepiteliais e as alterações superficiais causadas nas células epiteliais, reforçando a análise citopatológica como método eficiente no diagnóstico da paracoccidioidomicose.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\***

- Abernathy R. (1973). Treatment of systemic mycoses. *Medicine*, **52**: 385-391.
- Adams, D.O (1976). The granulomatous inflammatory response – a review. *Am. J. Pathol.* **84**: 164-191.
- Albornoz, M.B. (1971). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia*. **9**: 248-53.
- Albornoz, M.B. & Cabral, N.A (1976). Paracoccidioidomycosis. Estudio clínico e inmunológico en 40 pacientes. *Arch. Hosp. Vargas*. **18**: 5-22.
- Almeida, F (1930). Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. *An. Fac. Med. S. Paulo* **5**: 125-141.
- Almeida, S.R. and Lopes, J.D. (2001). The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **34**: 529-537.
- Alves dos Santos, J.W.; Michel, G.T. and Londero, T.A. (1997). Paracoccidioidoma: Case record and review. *Mycopathologia*, **137**: 83-85.
- Arango, M. & Yarzabal, L. (1982). T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* **79**: 115-124.

\* de acordo com as normas da Revista Oral Diseases.

- Araújo, M.S.; Mesquita, R.A.; Corrêa, L.; Souza, S.O.M. (2001) Oral exfoliative cytology in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Acta Cytologica*, **45**: 360-364.
- Aristizabal, B.H.; Clemons, K.V.; Stevens, D.A.; Restrepo, A. (1998). Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia to Yeast Cells: In vivo inhibition in females. *Infection and Immunity*, **66**:5587-5591.
- Bainton, D.F (1999). Distinct granule populations in human neutrophils and lysosomal organelles identified by immuno-electron microscopy. *J. Immunol Methods* **232**: 153-168.
- Bainton, D.F. (1993). Neutrophilic leukocyte granules: from structure to function. *Adv Exp Med Biol*, **336**: 17-33.
- Bainton, D.F. & Farquhar, M.G. (1970). Segregation and packaging of granule enzymes in eosinophilic leukocytes. *J Cell Biol*, **45**: 54-73.
- Bainton, D.F.; Ulliyot, J.L.; Farquhar, M.G. (1971). The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med*. 134: 907-934.
- Barbosa, W. (1991). Paracoccidioidomicose (Blastomicose Sul Americana) In Amato Neto, V. & Baldy, J.L.S., Doenças Transmissíveis. São Paulo, *Sarvier* : **3<sup>a</sup> ed.**: pp 653-662.
- Barbosa, W. (1991). Paracoccidioidomicose – Doença do Sistema Fagocítico Mononuclear. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **24**: 203-207.
- Barbosa, W. (1991). Classificação clínica da Paracoccidioidomicose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **24** (supl.II): 204-207.

- Bava, A.J., Mistchenko, A.S., Palacios, M.F., Estevez, M.E., Tiraboschi, I.N., Sem, L., Negroni, R., and Diez, R. (1991). Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol. Immunol.* **33**: 167-170.
- Bernard, G. and Duarte, A.J.S. (2000). Paracoccidioidomycosis: A model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection on the natural history of endemic tropical diseases. *Clin. Infect. Dis.*, **31**: 1032-1039.
- Bernard, G.; Mendes-Giannini, M.A.; Juvenale, M.; Miranda, E.T. and Duarte, A.J.S. (1997). Immunosuppression in Paracoccidioidomycosis: T cell Hyporesponsiveness to two Paracoccidioides brasiliensis glycoproteins that elicit strong humoral response. *J Infect. Dis.*, **175**: 1263-1267.
- Bertolini, P.; Lauand, F.; Camara, L.P. (1981). Alguns aspectos da multiplicação do *Paracoccidioides brasiliensis* em testículos de cobaie. *Rev. Cien. Farm. São Paulo* **3**: 5-10.
- Beurman, L. & Gougerot, H. (1912). Les sporotrichoses. Paris, *Felix Alcon*.
- Bhaskar, S.N. (1989). *Patologia Bucal Artes Médicas*: 4<sup>a</sup> ed.: pp 581.
- Blotta, M.H.; Mamoni, R.L.; Oliveira, S.J.; Nouer, S.A.; Papaiordanou, P.M.; Goveia, A.; Camargo, Z.P. (1999). Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg* Sep;61(3):390-4.
- Bobryshev YV, Watanabe T. (1997). Ultrastructural evidence for association of vascular dendritic cells with T-lymphocytes and with B-cells in human atherosclerosis. *J Submicrosc Cytol Pathol* , **29**:209-21.
- Bogliolo, L. (1946a). Granuloma apical (dentário) por *Paracoccidioides brasiliensis*. (Splendore) Almeida. *Brasil-Médico*, **60**: 314-342.

- Bogliolo, L. (1946b). terceira contribuição ao conhecimento da morfologia do agente da moléstia de Lutz nos tecidos humanos parasitários. *Revista Brasileira de Biologia*, **6**: 181-197.
- Bogliolo, L. (1950). South American Blastomycosis, (Lutz disease): contribution to knowledge of its pathogenesis. *Arq. Derm. Syphilol.*, **61**: 470-474.
- Bon-Habib, D.C.; Oliveira Neto, M.P.; Cruz, M.F.F.; Castro, O.G. (1989). The possible role of circulatory immune complexes in the deficiency of cell mediated immunity in paracoccidioidomycosis. *Brazilian J. Med Biol. Res*, **22**: 205-212.
- Bopp, C. (1955). Algumas considerações sobre a micose de Lutz no Rio Grande do Sul. *Anais da Faculdade de Medicina de Porto Alegre*, **15**: 97-123.
- Borba, C.M., Meirelles, M.N.S.L., Mendes da Silva, A.M. and de Oliveira, P.C. (1999). Ultrastructural differences observed in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase cells grown on solid and in liquid medium. *Mycoses*, **42**: 281-283.
- Borregaard, N.; Lollike, K.; Kjeldsen, L.; Sengelov, H.; Bastholm, L.; Nielsen, M.H. et al. (1993). Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol*, **51**: 187-198.
- Borrero, J.R.; Restrepo, A.M.; & Robledo, M.V. (1965). Blastomycosis sulamericana de forma pulmonar pura. *Antioquia méd.*, **15**: 503-516.
- Brass, K. (1969). Observaciones sobre la anatomia patológica, patogénesis y evolución de la paracoccidioidomicosis. *Mycopathologia*. **37**: 119-138.
- Bretaña, A.; Goihman-Yahr, M.; Tapia, F.J.; Isturiz, G., Vilorio, N.; Carrasquero, M.; Saavedra, N.; De Albornoz, M.C.; Pereira, J.; De Roman, A.; Et Al. (1995). Comparative ultrastructure and immunolabeling of MHC-II antigens of alveolar

macrophages obtained from patients with paracoccidioidomycosis and other lung diseases. *J. Leukoc. Biol.* **57**: 101-109.

Brummer, E.; Castañeda E.; Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis. An update, *Rev. Clin. Microbiol.*, **6**: 89-92.

Brummer, E.; Hanson, L.H.; Stevens, D.A. (1988a.). Gamma interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int. J. Immunopharmacol.*, **10**, 945-52.

Brummer, E.; Hanson, L.H.; Restrepo, A.; Stevens, D.A. (1988b.). *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. *J. Immunol.* **140**: 2786-89.

Brummer, E.; Hanson, L.H.; Restrepo, A.; Stevens, D.A. (1989). Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: Killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect. Immun.* **57**: 2289-94.

Brummer, E.; Restrepo, A.; Hanson, L.H.; Stevens, D.A. (1990). Virulence of *P. brasiliensis*: the influence of *in vitro* passage and storage. *Mycopathologia* **109**, 13-17.

Brummer, E.; Sun, S.H.; Harrison, J.L.; Perlman, A.M.; Philpott, D.E. and Stevens, D.A. (1990). Ultrastructure of phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages. *Infection and Immunity*, **58**: 2628-2636.

Burger, E.; Miyaji, M.; Sano, A.; Calich, V.L.G.; Nishimura, K. And Lenzi, H.L. (1996). Histopathology of paracoccidioidomycosis infection in athymic and euthymic mice: A sequential study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55** (2), 235-242.

- Burns, R.A.; Roy, J.S.; Woods, C.; Padhye, A.A.; Warnock Dw. (2000). Report of the first human case of lobomycosis in the United States. *J Clin Microbiol*, **38**:1283-1285.
- Calich, V.L.G.; Russo, M.; Vaz C.A.C.; Burger, E., Singer-Vermes, L.M. (1994). Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Ciênc. Cult.* (São Paulo), **46**, 455-61.
- Cano, L.E.; Arango, R.; Salazar, M.E.; Brummer, E.; Stevens, D.A.; Restrepo, A. (1992): Killing of *P.brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J. Med. Vet. Mycol.*, **30**, 161-168.
- Cano, L.E.; Singer-Vermes, L.M.; Vaz, C.A.C.; Russo, M.; Calich, V.L.G. (1995). Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cells activation, cellular immune response, and specific isotype patterns, *Infect. Immun.* **63**, 1777-83.
- Carbonell, L.M. (1969). Ultrastructure of dimorphic transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Bacteriology*, **100**, 1076-1082.
- Carbonell, L.M.; Kanetsuna, F. and Gil, F. (1970). Chemical morphology of glucan and chitin in the cell wall of the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Bacteriology*, **101**: 636-642.
- Carbonell, L.M. & Pollak, L. (1963). Ultraestructura del *Paracoccidioides brasiliensis* en cultivos de la fase leveduriforme. *Mycopathologia (den Haag)*, **19**, 184-204.
- Carbonell, L.M. & Rodriguez, J. (1965). Transformation on mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and in experimental inoculations. *Journal of Bacteriology*, **90**, 504-510.

- Castro, L.G.M., Müller, A.P., Mimura, M.A.M. and Migliari, D.A. (2001). Hard palate perforation: an unusual finding in paracoccidioidomycosis. *International Journal of Dermatology*, **40**, 281-283.
- Castro, R.M.; Cuce, L.C. And Fava Neto, C. (1975). Paracoccidioidomicose. Inoculação accidental "in anima nobile". Relato de um caso. *Med. Cut. Ibero. Lat. Amer.*, **3**: 289-292.
- Chikamori, T.; Saka, S.; Nagano, H.; Saeki, S.; Lacaz, C..S.; Rodrigues, M.C.; Cassaguerra, C.M.; Braccialli, M.L. (1984). Paracoccidioidomycosis in Japan. Report of a case. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **26**, 267-271.
- Coelho, K.I.R.; Takeo, K.; Yamaguchi, M.; Sano, A.; Kurita, N.; Yoshida, S.; Nishimura, K.; Miyaji, M. (1994). Experimental paracoccidioidomycosis in hamster: Transmission electron microscopy of inoculation site lesion. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **36**: 217-223.
- Colombo, A.L.; Camargo, L.F.; Fischman, O.G.; Castelo, A. (1992). The clinical parameters relevant for the differential diagnosis between mucocutaneous leishmaniasis and paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **25**: 171-175.
- Colombo, A.L.; Faiçal, S. & Kater, C.E. (1994). Systematic evaluation of the adrenocortical function in patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* **127**: 89-93. ]
- Coutinho, Z.; Silva, D.; Lázera, M.; Petri, V.; Sabrozo, P.C.; Wanke, B. Mortalidade por paracoccidioidomicose. Brasil 1980-1995. *II Congresso brasileiro de Micologia*, Rio de Janeiro, Brasil, April 1998. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Micologia, 1998: Abstract A 57.

- de Almeida, O.P.; Scully C. Oral Lesions in the systemic mycoses. (1991). *Curr. Opin. Dent.*, **1**: 423-428.
- de Almeida, O.P.; Jorge, J.; Scully, C.; Bozzo, L. (1991). Oral manifestations of paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **72** (4), 430-435.
- de Brito, T.; Franco, M.F. (1994). Granulomatous Inflammation. *Rev. Inst. Med Trop. São Paulo* **36**: 185-192.
- de Brito, T.; Furtado, S.J.; Castro, M. & Manini, M. (1973). Intraepithelial parasitism in human paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis). *Virchows. Acta Path. Anat.*, **351**: 129-138.
- de Lima, M.A.; Silva-Vergara, M.L.; Demachki, S.; dos Santos, J.A.M. (1995). Paracoccidioidomicose em paciente com a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, relato de necrópsia. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **28**: 279-284.
- Defaveri, J. (1979). Paracoccidioidomicose pulmonar experimental do camundongo. Botucatu, (Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Botucatu).
- Defaveri, J., Martin, L.C., And Franco, M. (1989). Histological and ultrastructural study of the inflammation evoked by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in previously immunized mice, *Mycopathologia*, **105**: 53.
- Dorland Wan (1951). *The American Medical Dictionary*. **22nd ed.**: Philadelphia, WB Saunders.
- Drutz, D.J. & Catanzaro, A. (1978). Caoccidioidomycosis. Part II. *Am Rev Respir Dis*, **117**: 727-771.

- Feng, L.; Feng, Y.; Li, S. (1997). Ultrastructural morphological observation on the plasma cells in periodontitis-affected human gingival tissue. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, **32**: 315-317.
- Ferreira, L.C.L.; Silva, M.H.C.R.; Paulo, M.S.; Souza, F.H.C.; Cardoso, M.S.L.; Sálem, J.I. (1995). Diagnóstico das Micoses Pulmonares no Amazonas. *An. XXXI Congresso Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, Resumo n<sup>o</sup> 192, 96.
- Fialho, A.S. (1946). Localizações pulmonares da "micose de Lutz". Anatomia patológica e patogenia. Importância de seu estudo na patologia pulmonar. Tese, Rio de Janeiro.
- Finkelievich, J.L.; Negroni, R.; Iovannitti, C.A. and Elías-Costa, M.R.I. (1993). Estudio comparativo de la patogenicidad y la antigenicidad de 6 cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **35**: 535-541.
- Fonseca, J.B. (1963). Blastomicose sul-americana. Estudo das lesões dentais e paradentais sob o ponto de vista clínico e histopatológico. *Rev. Fac. Odont. São Paulo*, **1**: 1-38.
- Foot, E.C. (1965). Eosinophil turnover in the normal rat. *Br. J. Haematol.*, **11**: 439-445.
- Franco, M. (1987a). Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, **25**: 5-18.
- Franco, M.V.G.; Goes, A.M. and Koury, C.M. (1997). Model of *in vitro* granulomatous hypersensitivity in human paracoccidioidomycosis. *Mycopathol.*, **137**:129-136.
- Franco, M; Lacaz, C.S.; Retrepo-Moreno, A. & Del Negro, G. (1994). Paracoccidioidomycosis: **CRC**: 410-411.

- Franco, M.; Mendes, R.P.; Moscardi-Biacchi, M.; Rezkallah-Iwasso, M. & Montenegro, M.R. (1989). Paracoccidioidomycosis. *Baillière's Clin. Trop. Med. Commun. Dis.*, **4**: 185-220.
- Franco, M.F. & Montenegro, M.R.G. (1982). Anatomia patológica. In: Del Negro, G.; Lacaz, C.S. & Fiorillo, A.M.: Paracoccidioidomycosis (Blastomycose Sulamericana): São Paulo, *Sarvier*: 97-117.
- Franco, M.; Montenegro, M.R.; Mendes, R.P.; Marques, S.A.; Dillon, N.L.; Mota, N.G. (1987b). Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **20**: 129-132.
- Franco, M.; Moscardi-Biacchi, M.; Bacchi, C.E. et al. (1988). Pathogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis* granuloma. In: TORRES-RODRIGUES, J.M., ed. Proceedings of the X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). Barcelona, *J. R. Prous. Science*, 138-142.
- Franco, M.; Peraçoli, M.T.; Soares, A. et al. (1993). Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr. Top. Med. Mycol.*, **5**: 115-149.
- Furtado, S.J.; de Brito, T and Freymuller, E. (1967). The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *Sabouraudia* **5**: 226-229.
- Giraldo, R.; Retrepo, A.; Gutiérrez, F.; Robledo, M.; Londoño, F.; Hernández, H.; Sierra, F. & Calle, F. (1976). Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. *Mycopathologia* **58** (2): 63-70.
- Gonçalves, A.J.R.; Somogy, L.A.; Braga, M.P.; Pedrosa, M.C. Carvalho, F.G.; Vieira, A.R.M.; Silva, M.T.S.P. & Matos, H.J. , (1984). Paracoccidioidomycose. Experiência de um hospital geral. *Arq. Bras. Med.* **58**: 237-243.

- Gonzaga, H.F.S.; Benatti Neto, C.; Oliveira, M.R.B.; Costa, C.A.S.; Spolidório, L.C. & Lia, R.C.C. (1995). Infecções micóticas na cavidade bucal. *J.B.M.* **69**:168-174.
- González-Ochoa, A. (1971). Theories regarding the portal of entry of *Paracoccidioides brasiliensis*: a brief review. In: Proceedings of the Pan American Symposium on Paracoccidioidomycosis. I. Medellin, Washington. *PAHO-Scient*, **254**: 278-280,.
- Goihman-Yahr, M.; Rothenberg, A.; Bretana, A.; Istúriz, G. et al. (1989). Digestion of Killed *Paracoccidioides brasiliensis* by neutrophils. *Mycopathologia*, **106**: 53-58.
- Goihman-Yahr, M.; de Brito, C.; de Albornoz, M.C.B.; de Gomez, M.H.; Pereira, J.; de Román, A.; Martin, B.S.; Molina, T. (1989). Functions of polynrphonuclear leukocytes and infividuality of Jorge Lobo's Disease: Absence of the specific leukocyte digestive defect against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycoses*, **32**: 603-608.
- Goihman-Yahr, M.; Essensfeld-Yahr, E.; Albornoz, M.C.; Yarzabal, L.; Gomez, M.H.; San Martin, B.; Ocanto, A., Convit, J. (1979). New method for estimating digestion of *Paracoccidioides brasiliensis* by phagocytic cells *in vitro*. *J. Clin. Microbiol.*, **10**: 365-370.
- Goihman-Yahr, M.; Essensfeld-Yahr, E.; Albornoz, M.C.; Yarzabal, L.; Gomez, M.H.; San Martin, B.; Ocanto, A., Gil, F. & Convit, J. (1980). Defect of the *in vitro* digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. *Infec. Immun.*, **28**: 557-566.
- Goihman-Yahr, M.; Isturiz, G.; Rothenberg, A. (1990). Los fagocitos y patogenia de la paracoccidioidomycosis. *Interciencia*, **15**: 200-205.
- Goihman-Yahr, M.; Pereira, J.; Istúriz, G.; Viloría, N.; Carrasquero, M.; Saavedra, N.; de Gomez, M.H.; Román, A.; San Martín, B.; de Albornoz, M.C.B.; de Fernández, B.;

- Avila-Millán, E. (1992). Relationship between digestive and killing abilities of neutrophils against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycoses*, **35**: 269-274.
- Harley, W.B. & Blasser, M.J. (1994). Disseminated coccidioidomycosis associated with extreme eosinophilia. *Clin Infect Dis*, **18**: 627-629.
- Hirsh, B.C. and Johnson, W.C. (1984). Pathology of granulomatous diseases - review. *Int. J. Dermatol.*, **23**, 585-97.
- Hirsh, B.C. and Johnson, W.C. (1984). Concepts of granulomatous inflammation - review. *Int. J. Dermatol.*, **23**: 90-100.
- Hudson, G. (1968). Quantitative study of the eosinophil granulocytes. *Semin. Hematol.*, **5**: 166-186.
- Iabuki, K. (1973). Blasomicose Sul-Americana experimental do hamster. Botucatu. (Tese de Doutoramento – Fac. Ciências Méd. Biol. Botucatu).
- Iabuki, K. & Montenegro, M.R. (1979). Experimental paracoccidioidomycosis in the syrian hamster: Morphology, ultrastruture and correlation of lesion with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. *Mycopathologia*, **67**: 131-141.
- Iovannitti, C.A.; Finquelievich, J.L.; Negroni, R.; Elias Costa, M.R. (1999). Histopathological evolution of experimental paracoccidioidomycosis in Wistar rats. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis*, **289**:211-216.
- Jensen, J.; Warner, T.; Balish, E. (1994). The role of phagocytic cells in resistance to disseminated Candidiasis in Grnaulocytopenic Mice. *J. Infec. Dis.*, **170**: 900-905.
- Jensen, H.E.; Schonheyder, H.C., Hotchi, M. & Kaufman, L. (1996). Diagnosis of systemic mycoses by specific immunohistochemical tests. *APMIS*, **104**: 241-258.

- Kanetsuna, F. (1981). Ultrastructure studies on the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomices dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia*, **19**, 275-286.
- Kashino, S.S. (1990). Efeito do bloqueio do sistema mononuclear fagocítico na paracoccidioidomicose experimental em camundongos resistentes e suscetíveis ao fungo. São Paulo. Tese (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- Kashino, S.S.; Calichi, V.L.G.; Singer-Vermes, L.M.; Abrahamsohn, P.A. & Burger, E. (1987). Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycopathologia*, **99**: 119-128.
- Kashino, S.S.; Calich, V.L.G.; Burger, E. & Singer-Vermes, L.M. (1985). In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia*. **92**: 173-178.
- Kashino, S.S.; Fazioli, R.A.; Cafalli-Favati, C.; Meloni-Bruneri, L.H.; Vaz, C.A.; Burger, E.; Singer, L.M.; Calich, V.L. (2000). Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res*, **20**:89-97.
- Kashino, S.S.; Singer-Vermes, L.M.; Calich, V.L.G. and Burger, E. (1990). Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis* isolate do not correlate with its *in vitro* growth. *Mycopathologia (Den Haag)*, **111**: 173-180.
- Kawayama, T.; Sawa, A.; Sueyasu, Y.; Arikawa, K.; Shiraishi, T.; Ichikawa, Y. & Oizumi, K. (1996). Chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in a Japanese Adult. *Nippon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*, **34**: 911-915.

- Kerr, I.B.; Araripe, J.R.; de Oliveira, P.C.; Lenzi, H.L. (1988). Paracoccidioidomycosis. A sequential histopathologic study of lesions in experimental-infected rats. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **30**: 336-350.
- Kerr, I.B.; de Oliveira, P.C. & Lenzi, H.L. (1988). Connective matrix organization in chronic granulomas of experimental paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, **103**: 11-20.
- Kerr, I.B.; Saripe, J.B.; de Oliveira, P.C. and Lenzi, H. (1988). Paracoccidioidomycosis, histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats, *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **30**: 336.
- Lacaz, C.S. (1951) .Lesões pulmonares na blastomicose sulamericana. Inquérito preliminar realizado com a paracoccidioidina. *Hospital* (Rio de Janeiro), **39**: 405-422.
- Lacaz, C.S. (1956). South American Blastomycosis. *An. Fac. Med. São Paulo*, 7-120.
- Lacaz, C.S. (1982). Evolução dos Conhecimentos sobre a Paracoccidioidomicose. Um pouco de sua história. In: Paracoccidioidomicose, Blastomicose Sul-Americana (eds. Del Negro G., Lacaz C.S., Fiorillo A.M.): *Sarvier – EDUSP*: pp 1-9.
- Lacaz, C.S. (1994). Paracoccidioides brasiliensis Morphology; Evolutionary Cycle; Maintenance during saprophytic life; Biology, Virulence, Taxonomy. In. Paracoccidioidomycosis (eds. M. Franco, C.S. Lacaz, a. Restrepo-Moreno & G. Del Negro): *Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press*: pp 109-120.
- Lauande, F.; Lia, R.C.C. and Paino, M.A.S. (1975). Blastomicose Sul-Americana. Estudo clínico das lesões bucais. *Rev. Fac. Fam. Odont. (Araraquara)*, **9**: 243.

- Lewis, M.R. (1925). The formation of macrophages, epithelioid cells and giant cells from leukocytes on inoculated blood. *Am. J. Pathol.*, **1**: 91.
- Londero, A.T. & Del Negro, G. (1986). Paracoccidioidomicose. *J. Pneumol.*, **12**: 41-60.
- Londero A.T. and Ramos C.D. (1978). Paracoccidioidomycosis. *Am J. Med.*, **52**: 771-777.
- Londero, A.T.; Rios-Gonçalves, A.J.; Florim Terra, G.M. & Nogueira, S.A. (1996). Paracoccidioidomycosis in Brazilian children A critical review. *Arq. Bras. Med.*, **70**(4): 197.
- Loose, D.S.; Stover, E.P.; Restrepo, A.; Stevens, D.A. & Feldman, D. (1983). Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**: 7659-7663.
- López, R.C. & Restrepo, A.M. (1983). Spontaneous regression of pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. **83**: 187-189.
- Lutz, A. (1908a). Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Brazil-med.*, **22**: 121-124.
- Lutz, A. (1908b). Uma myose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Impr Med Ris*, **16**: 151-153.
- Mackinnon, J.E. (1959). Pathogenesis of South American blastomycosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **53**: 487-494.
- Manns, B.J.; Baylis, B.W.; Urbanski, S.J.; Gibb, A.P. Rabin, H.R. (1996). Paracoccidioidomycosis: case report and review. *Clin. Infect. Dis.*, **23**: 11026-1032.

- Mariano, M. and Spector, W.G. (1973). The formation and properties of macrophage polykaryons (Inflammatory giant cells). *J. Pathol.*, **113**: 1-19.
- Mariano, M.; Nikitin, T. and Malucelli, B.E. (1975). Immunological and non-immunological phagocytosis by inflammatory macrophages, epithelioid cells and macrophage polykaryons from foreign body granulomata. *J. Pathol.*, **120**: 151-159.
- Mariat, F. (1982). Diagnostic biologique des mycoses tropicales cutanées et sous-cutanées. In: *IX<sup>es</sup> Journées Nationales de Biologie. (Lyon)*. 15-16, 17-31.
- Marques, S.A. Franco M.F.; Mendes R.P., et al. (1983). Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo, Brasil). *Rev.Inst. Med. Trop. São Paulo*, **25**: 87-92.
- McEwen, J.G., Bedoya, V., Pantiño, M.M., Salazar, M. A., and Respepo, A. (1987). Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia, *J. Med. Vet. Mycol.*, **25**: 165.
- McEwen, J.G.; Brummer, E.; Stevens, D.A.; Retrepo, A. (1987). Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **36**: 603-8.
- Medina, H. & Bodziak, C. (1949). Contribuição ao conhecimento do ciclo extra-parasitário do *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Méd. Paraná*. **18**: 145-148.
- Mendes, N.F.; Musatti, C.C.; Leao, R.C.; Mendes, E.; Naspitz, C.K. (1971). Lymphocyte cultures and skin allograft survival in patients with South American blastomycosis. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, **48**: 40-45.

- Mendes, E. (1975). Delayed hypersensitivity reactions in patients with paracoccidioidomycosis. In: Proceedings of the International conference on the Mycoses. III. São Paulo, 1974. *Washington, PAHO, Scient.* **304**: 17-22.
- Mendes, E., (1980). *Imunopatologia: Sarvier*: São Paulo, pp180-182.
- Mendes, R.P., (1994). The gamut of clinical manifestations. In Franco, M.; Lacaz, C.S.; Restrepo-Moreno, A.; Del Negro, G. *Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press: pp 233-258.*
- Meyer, R.D. (1986). Cutaneous and mucosal manifestations of the deep mycotic infections. *Acta Derm. Venereol. (Stockh)*, **121**: 57-72.
- Migliari, D.A., Sugaya N.N., Mimura M.A., Cucé L.C. (1998). Periodontal aspects of the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, **40**: 15-18.
- Minguetti, G.; Telles, F.Q.; Hofmeister, R.M.; Freitas, O.T.; Lameira, R.F. (1985). Scanning electron microscopic studies of *Paracoccidioides brasiliensis* in the yeast phase. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **23**: 443-446.
- Miyaji, M. & Nishimura, K. (1983). Granuloma formation and killing functions of granuloma in congenitally athymic nude mice infected with *Blastomyces dermatites* and *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia (Den Haag)*, **82**: 129-141.
- Mok., P.W.Y. & Greer, D.L. (1977). Cell-mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin. Exp. Immunol.*, **28**: 89-98.
- Molina, H.A., Kierszenbaum, F., Hamann, K. Gleich, G.J. (1989). Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* in vitro causes bystander cardiac cell damage. *Immunology*, **66**: 289-295.

- Monteforte, R.; De Santis, A.; Cheiffi Baccari, G. (2001). Morphological changes in frog mast cells induced by nerve stimulation in vivo. *Neurosci Lett*, **315**: 77-80.
- Montenegro, M.R.; Franco, M. (1994). Pathology. In: Franco, M.; Lacaz, C.S.; Restrepo-Moreno, A.; Del Negro, G. eds, Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: *CRC Press*: pp 131-135.
- Moore, M. (1955). Morfologia variation in tissue of the organisms of the blastomycosis and of histoplasmosis. *Am. J. Pathol.*, **31**: 1049-64.
- Moscardi-Bacchi, M., Soares, A., Mendes, R.P., Marques, S. and Franco, M.F. (1989). "In situ" localization of T lymphocytes subset in human paracoccidioidomycosis, *J. Med. Vet. Mycol.*, **27**: 149.
- Moscardi-Bacchi, M.; Brummer, E. and Stevens, D.A. (1994). Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes por macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J. Med. Microbiol.*, **40**: 159-164.
- Mota, N.G.S.; Peraçoli, M.T.S.; Mendes, R.P.; et al. (1988). Mononuclear subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, **26**: 105-111.
- Motta, L.C. (1935). Granulomatose paracoccidiódica (blastomicose brasileira). *An. Fac. Med. São Paulo*, **11**: 293-309.
- Motta, L.C. & Puppo, J.A. (1936). Granulomatose paracoccidiódica. ("Blastomicose Brasileira") I- Estudo anátomo-clínico das lesões cutâneas. II-Estudo clínico das blastomicoses tegumentares. *An. Fac. Med. S. Paulo*, **12**: 407- 426.

- Moura, L.P.; Raffin, C.N.; Del Negro, G.M. & Ferreira, M.S. (1994). Paracoccidioidomycosis evidencing spinal cord involvement treated with success by fluconazole. *Arq. Neuropsiquiatr.*, **52**: 82-86.
- Musatti, C.C.; Rezkallah, M.T.; Mendes, E. & Mendes, N.F. (1976). In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell. Immunol.*, **24**: 365-378.
- Nabarra, B.; Dy, M.; Andrianarison I. and Dimitriu, A. (1979). Ultrastructural studies of activated mouse macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **25**: 73-83.
- Negróni, R. (1968). Nuevos estudios sobre antígenos para las pruebas serológicas en la blastomicosis sudamericana. *Derm. Ibero latamer.*, **4**: 409-416.
- Nichols, B.A.; Bainton, D.F.; Farquhar, M.G (1971). Differentiation of monocytes. Origin, nature, and fate of their azurophil granules. *J Cell Biol*, **50**: 498-515.
- Padilha-Gonçalves (1985). A. Paracoccidioidomycose. *An. Bras. Dermatol.*, **60**: 271-280.
- Peraçoli, M.T.S. (1978). Paracoccidioidomycose experimental do hamster. Estudo da imunidade celular e humoral, correlação com a morfologia das lesões de inoculação e disseminação. São Paulo, (Tese de mestrado – escola Paulista de Medicina).
- Peraçoli, M.T.S.; Fortes, M.R.P.; Pereira Da Silva, M.F. & Montenegro, M.R. (1995). Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the syrian hamster. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **37**: 129-136.
- Restrepo, A. (2000). Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? *Medical Mycology*, **38**: 317-322.

- Restrepo, A.M. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*, **23**: 323-327.
- Restrepo, A.; Gomez, I.; Cano, L.E.; et al. (1983). Treatment of paracoccidioidomycosis with ketoconazole: a three-year experience. *Am. J. Med.*, **74**: 48-52.
- Restrepo, A.; Moncada, L.J. & Quintero, M. (1969). Effect of hydrogen ion concentration and of temperature on the growth of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil extracts. *Sabouraudia*, **7**: 207-215.
- Restrepo, A.; Robedo, M.; Guitierrez, F.; San Clemente, M.; Castaneda, E.; Calle, G. (1970). Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis): a study of 39 cases observed in Medellin, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **19**: 68-76.
- Restrepo, A.; Salazar, M.E.; Cano, L.E.; Stover, E.P.; Feudman, D.; Stevens, D.A. (1984). Steroids inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Inf. Immun.*, **46**: 346-353.
- Restrepo, M.A. (1978). Paracoccidioidomycosis. *Acta. Med. Colombiana*. **3**: 33-66.
- Restrepo, M.A.; Greer, D.L. & Vasconcelos, M. (1973). Paracoccidioidomycosis: a review. *Rev. Med. Vet. Mycol.*, **8**: 97-123.
- Restrepo, M.A.; Robledo, M.; Gutiérrez, F.; Sanclemente, M.; Castaneda, E. & Calle, G. (1970). Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis). A study of 39 cases observed in Medellin, Colombia. *Amer. J.trop. Med. Hyg.*, **19**: 68-76.
- Restrepo, S., Tobón, A.M., And Restrepo, A. (1992). Interacción celular en la fibrosis pulmonar observada en la paracoccidioidomicosis (P.C.M.) experimental. *Rev. Arg. Micol.*, **15**: 38.

- Restrepo, S., Tobón, A.M., and Restrepo, A. (1992). Interacción celular en la fibrosis pulmonar observada en la paracoccidioidomicosis (P.C.M.) experimental, *Rev. Arg. Micol.*, **15**: 38.
- Rezkallah Iwasso, M.T. (1981). Ação do levamisole na paracoccidioidomicose experimental do hamster. Estudo da imunidade humoral e celular. Correlação entre a resposta imunitária e a morfologia das lesões. São Paulo, (Tese de Doutorado – Escola Paulista de Medicina).
- Robbins, S.L.; Cotran, M.D.; Kumar, V. (1994). Pathologic basis of disease. *Saunders*: 5<sup>th</sup> edition: pp 178-182.
- Robbins, S.L., Cotran, M.D., Kumar, V. (1999). Pathologic bases of disease. *Saunders*: 6<sup>th</sup> edition: pp 73-75.
- Salazar, M.E.; Restrepo, A.; Stevens, D.A. (1988). Inhibition by strogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect. Immun.*, **56**: 711-713.
- San Blas, G. (1985). *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. *Curr. Top. Med. Mycol.*, **1**: 235-257.
- San-Blas, G. & San-Blas, F. (1977). *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. *Mycopathologia* (Den Haag), **62**: 77-86.
- Saran, R. (1975). Observations on the phagocytic activities of Eosinophils. *Indian. J. Med. Res.*, **63**: 10 -1486-88.

- Sassine, W.; Oliveira, M.B.R.; Batista, G.; Delmaestro, D. Campagnolli, V. & Bou-Habib, D.C. (1985). Paracoccidioidomicose. Estudo imunológico de duas formas clínicas. *An. Bras. Dermatol.*, **60**: 3-8.
- Schermoly, M.J. & Hinthorn, D.R. (1988). Eosinophilia in coccidioidomycosis. *Arch Intern Med*, **148**: 895-896.
- Scully, C.; De Almeida, O.P. (1992). Orofacial manifestations of the systemic mycoses. *J. Orol Pathol. Med.* **21**: 289-294.
- Shieffield, E.A. (1990). The granulomatous inflammatory response. *J. Pathol.*, **160**: 1-2.
- Shikanai-Yasuda, M.A.; Higaki, Y.; Uip, D.E., Mori, N.S.; del Negro, G.; Melo, N.T.; Hutzler, R.U.; Amato Neto, V. (1992). Comprometimento da medulla óssea e eosinofilia na paracoccidioidomicose. *Rev Inst Méd Trop S. Paulo*, **34**: 85-90.
- Silva-Vergara, M.L.; Martinez, R.; Chadu, A.; Madeira, M.; Freitas-Silva, G.; Leite Maffei, C.M. (1998). Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol*, **36**:37-42.
- Singer-Vermes, L.M.; Burger, E.; Calich, V.L.; Modesto-Xavier, L.H.; Sakamoto, T.N.; Sugizaki, M.F.; Meira, D.A., Mendes, R.P. (1994). Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in human disease and in na experimental murine model. *Clin. Exp. Immunol.*, **97**: 113-119.
- Singer-Vermes, L.M.; Burger, E.; Franco, M.F.; Di-Biacchi, M.M.; Mendes-Giannini, M.J.; Calich, V.L. (1989). Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J. Med. Vet. Mycol.*, **27**: 71-82.

- Siqueira, A.M. (1982). Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidioidomicose. Caracterização do antígeno E2 do Paracoccidioides brasiliensis. São Paulo (Tese de Doutorado) USP.
- Soares, E.G. & Iabuki, K. (1974). Blastomicose Sul Americana acompanhada desde a lesão até o óbito. *Anais do Congresso Brasileiro de Patologia*, 4º Encontro Luso Brasileiro de Anatomia Patológica, Curitiba, Resumo nº 108.
- Soares, A.M.V.C., Peraçoli, M.T.S. and dos Santos, R.R. (2000). Correlation among immune response, morphogenesis of the granulomatous reaction and spleen lymphoid structure in murine experimental paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology*, **38**: 371-377.
- Sposto, M.R.; Scully, C.; De Almeida, O.P.; Jorge, J.; Graner, E.; Bozzo, L. A. (1993). Study of 36 South American patients. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **75**: 461-465.
- Sposto, M.R.; Mendes-Giannini, M.J.; Moraes, R.A.; Branco, F.C.; Scully, C. (1994). Paracoccidioidomycosis manifesting as oral lesions: clinical, cytological and serological investigation. *J. Oral. Pathol. Med.*, **23**: 85-87.
- Spry, C.J.F. (1971). Mechanism of eosinophilia. VI. Eosinophil mobilization. *Cell tissue kinet.* **4**: 365-374.
- Svidzinski, T.I.E., Miranda Neto, M.H., Santana, R.G., Fischman, O. and Colombo. (1999). Paracoccidioides brasiliensis Isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev. Inst. Med. Tro. S. Paulo*, **41**: 279-283.

- Taborda, V.B.A., Taborda, P.R.O and McGinnis, M.R. (1999). Constitutive melanin in the cell wall of the etiologic agent of Lobo's disease. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **41**: 9-12.
- Teixeira, H.C. (1991). Ativação de macrófagos peritoneais e de linfócitos B esplênicos em camundongos resistentes e suscetíveis durante a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*. São Paulo, Tese (Doutorado)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- Toledo, M.S.; Suzuki, E.; Straus, A.H.; Takahashi, H. (1995). Glycolipids from *Paracoccidioides brasiliensis*. Isolation of a galactofuranose-containing glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, **33**: 247-251.
- Tomimori-Yamashita, J.; Tagliolatto, S.; Porro, A.M.; Ogawa, M.M.; Michalany, N.S.; Camargo, Z.P. (1997). Paracoccidioidomycosis: an uncommon localization in the scrotum. *Mycoses*, **40**:415-418.
- Uribe, F.; Zuluaga, A.I.; Leon, W.; Restrepo, A. (1987). Histopathology of cutaneous and mucosal lesions in human paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **29**: 90-96.
- Vadas, M.A., David, J.R., Butterworth, A., Pisani, N.T., Siongok, T.A. (1979). A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of *Shistosoma mansoni*. *J. Immunol*, **122**: 1228-1236.
- Vargas, J. and Recacoechea, M. (1988). Ketoconazole in the treatment of paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis): experience of 30 cases in Bolivia. *Mycosis*, **31**: 187-197.

- Vieira e Silva, C.R.; Mattos de Iwama, M.C.F and Fujimore, K. (1974). Scanning electron microscopy of paracoccidioides brasiliensis. *Mycopathologia et Mycologia applicata*, **54**: 235-251.
- Villalba, H. (1998). Características Microscópicas da Paracoccidioidomicose Bucal. Tese defendida para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração Patologia Bucal, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.
- Warren, K.S. (1977). A functional classification of granulomatous inflammation. *An. New York Academy of Sciences*: 7-18.
- Wagner, J.M., Franco, M., Kephart, G.M. and Gleich, G.J. (1998). Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **59**: 66-72.
- Williams, G.T.; Williams, W.J. (1983). Granulomatous inflammation – a review. *J.Clin. Pathol.*, **36**: 723-733.
- Xiang, Z.; Block, M.; Lofman, C.; Nilsson, G. (2001). IgE-mediated mast cell degranulation and recovery monitored by time-lapse photography. *J Allergy Clin Immunol*, **108**: 116-121.
- Xidieh, C.F.; Lenzi, H.L.; Calich, V.L.; Burger, E. (1999). Influence of the genetic background on the pattern of lesions developed by resistant and susceptible mice infected with Paracoccidioides brasiliensis. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **188**:41-49.
- Yarzabal, L., Dessaint, J.P., Arango, M., Albornoz, M.C.B., And Campins, H. (1980). Demonstration and quantification of IgE antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in paracoccidioidomycosis, *Int. Arch. Allergy*, **62**: 346.

Zacharias, D.; Ueda, A.; Moscardi-Bacchi, M.; Franco, M.; San-Blas, G. (1986). A comparative histological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by tree *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *J. Med. Vet. Mycol.*, **24**: 445-454.

Zhang, H.F.; Ong, W.Y.; Leong, S.K.; Garey, L.J. (1997). Ultrastructural characteristics of blood vessels in the infant and adult human cerebral cortex. *Histol Histopathol*, **12**:85-97.