

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

mestrado

BC/44584

IB/81637

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

VÂNIA NIETO BRITO



ESTUDO IMUNOPATOLÓGICO SEQUÊNCIAL DOS ÓRGÃOS
LINFÓIDES PRIMÁRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/c
INOCULADOS COM *Paracoccidioides brasiliensis*

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) <i>Vânia Nieto Brito</i>	e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>[Assinatura]</i> 15/2/01
--	---

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. LIANA MARIA CARDOSO VERINAUD

Co-orientadora: LUCILA COSTALLAT RICCI

2001

i



UNIDADE IB/82637
 N.º CHAM. TI UNICAMP
B777e
 V. _____ Ex. _____
 TOMBO BC/ 44584
 PROC. 392/04
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 12-05-04
 N.º CPD _____

CM-00155062-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

B777e Brito, Vânia Nieto
 Estudo imunopatológico seqüencial dos órgãos linfóides primários de camundongos BALB/c inoculados com *Paracoccidioides brasiliensis*/ Vânia Nieto Brito. --Campinas, SP.[s.n.], 2001.
 72f: illus.

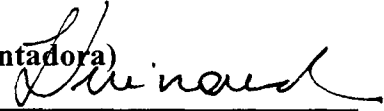
Orientadora: Liana Verinaud
 Co-orientadora: Lucila Costallat Ricci
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Timo. 3. Medula óssea.
 1. Verinaud, Liana. II. Ricci, Lucila Costallat. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

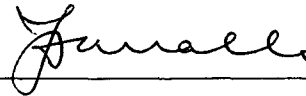
Data da Defesa: 15/02/2001.

Banca Examinadora:

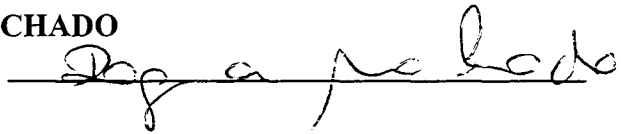
Profa. Dra. LIANA MARIA CARDOSO VERINAUD (Orientadora)



Prof. Dr. JOSÉ VASSALLO



Profa. Dra. DAGMAR RUTH STACH MACHADO



Profa. Dra. MARIA HELOÍSA DE SOUSA LIMA BLOTTA

***“Quanto mais conhecemos as coisas singulares,
tanto mais conhecemos a Deus.”***

Spinoza (1632-1677)

Aos meus queridos pais, Antonia e Juraci,
e a minha irmã, Rose, que sempre acreditaram em mim
e me apoiaram em todos os momentos,
dedico este trabalho.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, em colaboração com o Laboratório de Ultraestrutura Celular do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da Vida e por todas as bênçãos recebidas ao longo dela.

A minha família, pelo amor e carinho oferecidos.

À Prof^ª Dr^ª Liana Verinaud, pelo carinho, amizade, compreensão e confiança dedicados durante a orientação.

A CAPES e a FAEP pelo auxílio financeiro concedido.

Aos meus tios, Maria Aparecida e Alcindo, pelo carinho com que me receberam em sua casa e em sua família.

Ao Alê por todo amor, dedicação e companheirismo confiados a mim.

As minhas amigas de Campinas: Mariangela, Paula, Letícia, Camila e Priscila pelo companheirismo, amizade e imenso carinho que me dedicaram.

A todos os meus amigos de Bauru que sempre acreditaram em mim e me incentivaram, em especial, Ana Cláudia e Elizabeth.

À Prof^ª Dr^ª Lucila Costallat Ricci, pela co-orientação e por todo o apoio para a realização deste trabalho.

À Prof^ª Leonilda M. A. Santos e a Prof^ª Clarice W. Arns, pela participação na qualificação e pelas sugestões oportunas oferecidas a este trabalho.

À Prof^ª Dr^ª Dagmar Stach-Machado, pela participação na banca examinadora, por todas as sugestões, e, em especial, pelo carinho ao longo de toda a nossa convivência.

À Prof^ª Dr^ª Maria Heloísa Lima Blotta, pela participação na qualificação e na banca examinadora e pelas valiosas sugestões a este trabalho.

Ao Prof. Dr. José Vassalo, pelo auxílio na análise da medula óssea, por sua participação na banca examinadora e por todas as sugestões oferecidas.

À Prof^ª Dr^ª Maria Alice da Cruz-Höfling, pela cessão do Laboratório de Ultraestrutura Celular e por todo o auxílio dispensado para a realização deste trabalho.

À Prof^ª Dr^ª Julia K. Sakurada, pelo uso de seu laboratório no decorrer dos experimentos.

Aos funcionários do Depto de Microbiologia e Imunologia, em especial para Rose e Marcos pelo cuidado com os animais, e Dirce e Cristina por todo o auxílio e companheirismo no dia-a-dia.

Aos colegas dos Depto de Microbiologia e Imunologia e Histologia por toda a amizade e auxílio dispensados.

A todos, minha profunda gratidão.

RESUMO

BRITO, V. N. **Estudo Imunopatológico Sequencial de Órgãos Linfóides Primários de Camundongos BALB/c Inoculados com *Paracoccidioides brasiliensis***. Tese de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.

A literatura tem mostrado que a imunossupressão observada em micoses sistêmicas pode estar relacionada ao envolvimento de órgãos linfóides primários. Neste trabalho, avaliamos as alterações imunopatológicas induzidas pelo *P. brasiliensis*, nestes órgãos, correlacionando-as com a disseminação fúngica e a resposta de hipersensibilidade tardia. Para tanto, camundongos BALB/c machos foram inoculados intraperitonealmente com 5×10^6 células fúngicas e histologicamente avaliados quanto a alterações nos órgãos linfóides primários, presença de lesões de disseminação no fígado, baço e pulmões e de resposta de hipersensibilidade tardia específica, através do teste do coxim plantar (TCP). O *P. brasiliensis* invadiu o timo, que sofreu severa atrofia, com degeneração da camada cortical e perda da delimitação entre córtex e medula. A medula óssea, por outro lado, apresentou hiperplasia e retardo na maturação de células, especialmente da linhagem granulocítica, porém, não foram observadas células fúngicas neste tecido. Fígado e baço apresentaram lesões ricas em fungos durante todo o período experimental, sendo estas, inicialmente, neutrofilicas, evoluindo para granulomas epitelióides, por vezes, circundados por halos linfoplasmocitários e eosinófilos. Os pulmões, por outro lado, apresentaram discreto infiltrado inflamatório. O TCP evocou, logo aos 5 dias após a inoculação, um infiltrado inflamatório abundante em neutrófilos e células mononucleares, além de eosinófilos; o volume deste infiltrado aumentou consideravelmente ao longo da infecção, especialmente após o primeiro mês. Não foi observada nenhuma correlação entre a atrofia tímica e a resposta de hipersensibilidade tardia medida pelo TCP, enquanto uma tendência a correlação inversa entre atrofia tímica e o controle da disseminação da infecção, medida pela formação de granulomas compactos, foi observada. Assim, nossos resultados sugerem que o *P. brasiliensis* é capaz de induzir alterações histopatológicas no timo de camundongos BALB/c, que podem facilitar sua persistência no hospedeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Animais	12
3.2. Fungos.....	12
3.3. Preparo do Inóculo.....	13
3.4. Preparo do Antígeno de <i>P. brasiliensis</i> (Cell Free Antigen)	13
3.5. Dosagem de Proteínas	13
3.6. Infecção Experimental.....	14
3.7. Coleta de Sangue, Contagem Total e Diferencial de Leucócitos	14
3.8. Sacrifício e Coleta do Material.....	14
3.9. Obtenção da Medula Óssea.....	15
3.10. Determinação de Alterações do Peso de Órgãos Linfóides.....	15
3.11. Microscopia de Luz.....	15
3.12. Detecção Imuno-histoquímica do <i>P. brasiliensis</i>	15
3.13. Avaliação Imunológica.....	16
3.14. Análise Estatística.....	17
4. RESULTADOS	18
4.1. Alterações no Peso de Órgãos Linfóides.....	19
4.2. Análise Histopatológica de Órgãos Linfóides Primários	
4.2.1. Timo.....	21
4.2.2. Medula Óssea.....	25
4.3. Análise Histopatológica de Lesões de Disseminação.....	27
4.4. Contagem Total e Diferencial de Leucócitos.....	32
4.5. Avaliação Imunológica.....	35
4.6. Correlação entre Peso do Timo e Resposta Imune Celular.....	38
4.7. Correlação entre Peso do Timo e Disseminação da Infecção.....	38
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÕES.....	49
7. ABSTRACT.....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico que causa uma doença granulomatosa crônica denominada paracoccidioidomicose (blastomicose sulamericana). Nos tecidos do hospedeiro e em laboratório, quando encubado a 37°C, o *P. brasiliensis* cresce na forma de levedura, apresentando colônias moles e rugosas, de coloração creme, compostas por células ovais ou alongadas que variam de 4 a 30 µm e possuem múltiplos brotamentos. Se cultivado à temperatura ambiente, o *P. brasiliensis* desenvolve-se sob a forma de colônias brancas, pequenas e irregulares, cobertas por um curto micélio aéreo; esta é, provavelmente, a forma como o fungo ocorre no ambiente. Microscopicamente, a forma miceliar é composta por hifas finas e septadas, enquanto as leveduras apresentam-se como células mães rodeadas por células filhas menores, lembrando uma roda de leme (BRUMMER *et al.*, 1993).

Existem ainda incertezas sobre o habitat natural do *P. brasiliensis*. Tem sido sugerido, que este viva saprofiticamente na natureza, provavelmente no solo (MEDINA & BODZIAT, 1949) ou em restos de vegetais (LACAZ, 1949). O *P. brasiliensis* já foi encontrado no solo do Brasil, Argentina e Venezuela, áreas onde a paracoccidioidomicose é endêmica (revisto por SILVA-VERGARA *et al.*, 1998), e, recentemente, tem sido isolado de tatus que vivem em áreas de alta incidência da doença (BAGAGLI, *et al.*, 1998 e SILVA-VERGARA, *et al.*, 2000). Assim, atualmente, a maioria dos autores acredita que o habitat natural do *P. brasiliensis* é, realmente, o solo das regiões endêmicas.

A forma miceliar do fungo produz conídios e esporos sexuais que podem dispersar-se pelo ar e infectar o homem pela via inalatória (FRANCO *et al.*, 1989 e BRUMMER *et al.*, 1993). Este foco inicial de infecção pode regredir com a destruição do fungo, levando à formação de cicatrizes estéreis; regredir com a persistência de fungos viáveis, formando focos latentes ou progredir para o desenvolvimento da paracoccidioidomicose. O início da doença também pode ocorrer a partir de um foco latente (reinfecção endógena) ou por reinfecção exógena depois de exposição prévia ao fungo (FRANCO *et al.*, 1989).

Uma vez estabelecida, a paracoccidioidomicose pode evoluir de duas maneiras: aguda ou crônica. A forma aguda ou juvenil representa apenas 3 a 5% de todos os casos e, geralmente, acomete crianças e adultos jovens, de ambos os sexos. Caracteriza-se por uma rápida evolução (semanas a meses) e um profundo envolvimento do baço, fígado,

linfonodos e medula óssea (BRUMMER *et al.*, 1993). O quadro clínico revela envolvimento sistêmico de linfonodos, hepatoesplenomegalia e disfunção da medula óssea e, de acordo com o grau de disseminação, a forma aguda da doença pode ser classificada em severa ou moderada (FRANCO *et al.*, 1987).

A forma crônica, por outro lado, ocorre em mais de 90% dos pacientes e atinge principalmente adultos. A progressão é lenta e vários anos podem transcorrer entre a infecção inicial e o estabelecimento completo da doença. As manifestações pulmonares estão presentes em 90% dos casos, podendo representar o único foco da doença. Nos casos onde a paracoccidioidomicose é multifocal ocorrem lesões extrapulmonares, afetando especialmente as mucosas oral e nasal, pele, linfonodos, e glândulas adrenais (BRUMMER *et al.*, 1993).

A paracoccidioidomicose apresenta alta incidência nos países da América Latina, onde constitui a principal micose sistêmica. O Brasil detém 80% dos casos, sendo, a maioria destes, relatada no Estado de São Paulo. Os indivíduos mais atingidos são trabalhadores rurais, com idades entre 30 e 60 anos, e o número de casos é menor entre os jovens e crianças (FRANCO *et al.*, 1989 e BRUMMER, *et al.*, 1993).

Nos indivíduos adultos a incidência da doença em homens é até 13 vezes maior que em mulheres. Entretanto, testes cutâneos frente a antígenos de *P. brasiliensis*, realizados em moradores das regiões endêmicas da doença, demonstram positividade semelhante entre homens e mulheres (RESTREPO, *et al.*, 1984; FRANCO *et al.*, 1989 e BRUMMER, *et al.*, 1993). Isto indica que ambos os sexos estão expostos ao fungo, podendo adquirir uma infecção subclínica, mas a evolução para a doença ocorre com maior frequência nos homens. Durante a infância e puberdade, entretanto, não existe diferença na ocorrência da doença, o que sugere a participação de fatores hormonais na resistência feminina a paracoccidioidomicose. Nesse sentido, estudos realizados por RESTREPO *et al.* (1984) revelaram que o hormônio feminino estradiol é capaz de inibir a conversão do *P. brasiliensis* da forma micelial para a forma de levedura, o primeiro passo para a instalação da infecção, conferindo a resistência contra o fungo observada entre as mulheres.

Com relação ao contágio, a paracoccidioidomicose não é transmitida de pessoa para pessoa (BRUMMER *et al.*, 1993). O estudo de casos familiares demonstra que a ocorrência

de um novo caso da doença pode demorar anos, sendo condicionado por fatores genéticos e pela existência de uma fonte de infecção comum aos indivíduos (FRANCO *et al.*, 1989).

Após sua instalação, a paracoccidiodomicose tende a ser uma doença disseminada; a partir dos pulmões que são a porta de entrada do *P. brasiliensis*, pode ocorrer migração por via hematogênica ou linfática para qualquer parte do corpo. O *P. brasiliensis* apresenta considerável tropismo para o tecido linfático, podendo ocorrer também lesões nas mucosas superiores dos tratos respiratório e digestivo, lesões cutâneas afetando, principalmente, a região da face, além do acometimento das glândulas supra-renais. Mais raramente, ocorrem alterações em ossos e articulações, no trato digestivo, olhos, sistema nervoso central, trato geniturinário e tireóide. Em alguns casos coração, vasos sanguíneos, baço e músculos esqueléticos também podem ser afetados (FRANCO *et al.*, 1987; FRANCO *et al.*, 1989 e BRUMMER, *et al.*, 1993).

As várias formas clínicas da paracoccidiodomicose estão relacionadas aos diferentes níveis de resposta imune do hospedeiro. Pacientes com as formas disseminadas da doença freqüentemente apresentam depressão da resposta imune celular específica e diminuição da reatividade a testes cutâneos, altos níveis de anticorpos contra o *P. brasiliensis* e granulomas frouxos abrigando um grande número de fungos. Por outro lado, em indivíduos com as formas localizadas da doença observam-se respostas positivas para provas de hipersensibilidade, baixos níveis de anticorpos específicos e granulomas epitelióides compactos com poucos fungos (SILVA *et al.*, 1981; FRANCO, 1986 e FRANCO *et al.*, 1987). Fenômeno semelhante tem sido observado na paracoccidiodomicose experimental. ROBLEDO *et al.* (1982), por exemplo, infectando camundongos BALB/c atímicos e eutímicos observaram que a disseminação do *P. brasiliensis* dá-se mais rapidamente nos animais atímicos, que sucumbem, gradualmente, ao longo do período experimental. Animais imunologicamente intactos, entretanto, sobrevivem à infecção indicando a participação da resposta imune timo-dependente na modulação da micose.

A preocupação de se reproduzir experimentalmente a paracoccidiodomicose surgiu desde a sua descrição. O primeiro relato de infecção experimental bem sucedida foi feito por MONTENEGRO em 1927, o qual inoculando cobaios com uma suspensão de tecidos

infectados pelo *P. brasiliensis*, pela via intratesticular verificou a ocorrência da doença em todos os animais inoculados. Desde então, vários modelos experimentais têm sido utilizados, fornecendo informações importantes para o entendimento da doença.

Em 1959, MACKINNON, utilizando camundongos suíços, comparou o desenvolvimento da paracoccidioidomicose a partir de 7 diferentes vias de inoculação. Esse estudo revelou que os camundongos infectados pela via broncoalveolar desenvolviam broncoalveolite seguida por disseminação hematogênica do fungo para outros órgãos. Essa observação permitiu ao autor aventar a hipótese, atualmente bastante aceita, de que o início da paracoccidioidomicose dá-se nos pulmões por inalação do fungo e disseminação por via hematogênica. Os achados de MORENO & ESPINOSA (1976), utilizando a forma miceliar do *P. brasiliensis* em camundongos, confirmam a teoria postulada por MACKINNON, indicando que a inalação do fungo pode dar início a doença ativa com disseminação para o baço e o fígado.

Modelos experimentais também foram empregados em vários estudos sobre o papel da resposta imune na paracoccidioidomicose. Neste sentido, PERAÇOLI (1978), empregando a inoculação intratesticular em hamsters, observou que na fase final da infecção, quando as lesões são generalizadas, os níveis de resposta imune celular são muito baixos ou negativos, enquanto que os títulos de anticorpos permanecem elevados, confirmando a forte correlação entre a diminuição da resposta imunológica e a disseminação da doença observada na paracoccidioidomicose humana.

Atualmente, as espécies mais utilizadas na paracoccidioidomicose experimental são o hamster e o camundongo. O hamster tem sido usado devido a sua alta susceptibilidade ao *P. brasiliensis*, que mimetiza a paracoccidioidomicose humana progressiva (COELHO *et al.*, 1982) Enquanto, a utilização do camundongo como modelo experimental fundamenta-se, além de sua facilidade de obtenção e manutenção, na disponibilidade de linhagens isogênicas, que permitem a obtenção de resultados altamente confiáveis e reprodutíveis. No caso da paracoccidioidomicose experimental murina, várias linhagens isogênicas tem sido utilizadas, em especial as linhagens B10.A, A/Sn e BALB/c. As linhagens B10.A e A/Sn comportam-se como pólos de susceptibilidade e resistência à doença (CALICH *et al.*, 1985), apresentando padrões de resposta do tipo Th2 e Th1 (CALICH & KASHINO,

1998), respectivamente. A linhagem BALB/c, por sua vez, apresenta susceptibilidade intermediária à infecção (CALICH *et al.*, 1985). Assim, camundongos BALB/c experimentalmente infectados demonstram focos granulomatosos pequenos, compostos por macrófagos, neutrófilos e plasmócitos, com tendência a estabilização e regressão, de modo semelhante à forma moderada da paracoccidioidomicose humana (BURGER *et al.*, 1996).

A primeira linha de defesa contra o *P. brasiliensis* é feita por macrófagos e polimorfonucleares. O fungo, entretanto, é capaz de sobreviver e replicar-se no interior de fagócitos, o que constitui um importante mecanismo de escape (FRANCO, 1986 e BRUMMER *et al.*, 1993). A ativação dos macrófagos com Interferon Gama (IFN γ), contudo, restringe seu crescimento (FRANCO, 1986), confirmando o importante papel da resposta imune celular no curso da paracoccidioidomicose.

A severidade da doença tem sido associada à depressão da resposta imune celular na infecção humana (SILVA *et al.*, 1981; FRANCO *et al.*, 1989 e BRUMMER *et al.*, 1993) e em modelos experimentais (ROBLEBO *et al.* 1982; SINGER-VERMES *et al.*, 1993 e CANO *et al.*, 1995). Inicialmente, acreditava-se que deficiências inerentes à resposta imune celular poderiam propiciar o desenvolvimento da paracoccidioidomicose. Contudo, atualmente, a idéia mais aceita é que a imunossupressão seja desencadeada pela própria infecção paracoccidioidomictica e contribua para o sucesso do patógeno (BRUMMER *et al.*, 1993 e FRANCO *et al.*, 1989). Esta hipótese é apoiada pela observação de que a depressão da resposta imune celular é revertida após a cura da doença através de terapia antifúngica (MOK & GREER, 1997).

Vários fatores são apontados como possíveis responsáveis pela supressão da resposta imune celular durante a infecção paracoccidioidomictica, entre eles: deficiência na apresentação de antígenos e diminuição da função de células T (TEIXEIRA *et al.*, 1987), presença de células supressoras antígeno-específicas (FINKEL-JIMENEZ & MURPHY, 1988a e FINKEL-JIMENEZ & MURPHY, 1988b) e desvio de resposta para células do tipo Th2 (BERNARD *et al.*, 1997). Apesar disso, os fenômenos desencadeantes da imunossupressão não estão ainda elucidados e o envolvimento de órgãos linfóides primários pode contribuir para este processo, como tem sido observado em outras micoses, como criptococose experimental (SOTOMAIOR *et al.*, 1989), aspergilose experimental

(SUTTON *et al.*, 1994) e infecção natural por *Saprolegnia* em trutas (ALVAREZ *et al.*, 1995), e micotoxicoses, como na intoxicação experimental pela toxina T-2 (ISLAM *et al.*, 1998).

Apesar do sabido tropismo do *P. brasiliensis* por tecidos linfóides (FRANCO *et al.*, 1989 e BRUMMER *et al.*, 1993), não existem relatos conclusivos acerca do acometimento de órgãos linfóides primários pelo fungo e suas conseqüências no curso da infecção. Alguns autores têm descrito o comprometimento da medula óssea, em pacientes portadores das formas aguda e crônica disseminadas da doença (PIMENTA DE MELLO, 1955; CASTRO *et al.*, 1958; TERRA *et al.*, 1991; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1992 e OZAKI *et al.*, 1996), entretanto, estas alterações não têm sido relacionadas ao processo de imunossupressão. Além disso, a avaliação de possíveis alterações da medula óssea não tem sido feita em modelos experimentais o que poderia trazer maiores informações sobre o grau de comprometimento deste tecido e sua possível correlação com o fenômeno de imunossupressão.

Além da medula óssea, o timo pode sofrer alterações capazes de contribuir para a supressão imunológica, uma vez que constitui o órgão-chave do desenvolvimento e maturação de linfócitos T, responsáveis pelo controle da resposta imune. Apesar de nenhum relato literário descrever alterações tímicas na paracoccidiodomicose humana ou experimental, esse fenômeno tem sido relatado no caso de outros fungos causadores de micoses humanas (SOTOMAIOR *et al.*, 1989 e SUTTON *et al.*, 1994) e animais (ALVAREZ *et al.*, 1995). Ademais, assim como a medula óssea, o timo não é um órgão rotineiramente avaliado, mesmo em modelos experimentais.

Assim, dada a ausência de estudos sobre a ação do *P. brasiliensis* em órgãos linfóides primários, neste trabalho avaliamos imunopatologicamente as alterações induzidas por este fungo no timo e na medula óssea de camundongos BALB/c experimentalmente infectados, correlacionando-as com a disseminação do fungo e a resposta de hipersensibilidade tardia frente ao fungo.

Os testes de hipersensibilidade tardia são freqüentemente utilizados para a avaliação da resposta imune celular em pacientes e em animais experimentalmente infectados, tanto na paracoccidiodomicose, quanto em outras doenças infecciosas. A reação de

hipersensibilidade tardia em camundongos foi descrita em 1940, quando PAGEL observou que animais infectados intracutaneamente com o bacilo da tuberculose desenvolviam, entre 4 e 8 dias depois, uma pápula que evoluía para a formação de abcesso e necrose e, em seguida, regredia com o acúmulo de macrófagos que ingeriam os bacilos. Quando submetidos a uma reinfecção, estes camundongos, desenvolviam um padrão de reposta similar logo às 24 horas de infecção, caracterizado como uma reação de hipersensibilidade tardia.

Atualmente, sabe-se que a hipersensibilidade tardia consiste em uma reação inflamatória mediada por linfócitos T $CD4^+$ Th1 sensibilizados por um antígeno solúvel, particulado ou alogênico. Esta reação compreende o aumento da permeabilidade vascular, a migração de linfócitos T antígeno específicos e células efetoras inespecíficas, como neutrófilos e macrófagos, além da síntese de citocinas pró-inflamatórias com atividades quimiotáticas e ativadoras (CHER & MOSMANN, 1987 e BUCHANAN & MURPHY, 1997). O teste do coxim plantar tem sido preferido para a avaliação deste tipo de resposta imune celular. Isto se deve a sua grande sensibilidade, conferida pelo aprisionamento do antígeno no local da inoculação, o que propicia um significativo acúmulo de células mononucleares nos animais sensibilizados (CROWLE, 1959).

Deste modo, este trabalho, buscou agregar novos subsídios para uma melhor compreensão da supressão imunológica observada na paracoccidioidomicose, que constitui uma micose de grande relevância em nosso estado.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- Avaliar seqüencialmente as alterações imunopatológicas induzidas no timo e na medula óssea durante o curso da infecção em camundongos BALB/c inoculados intraperitonalmente com um isolado virulento de *P. brasiliensis*;
- Correlacionar as alterações encontradas nos órgãos linfóides primários com:
 - a disseminação do fungo para baço, fígado e pulmões ao longo da infecção; e
 - a resposta de hipersensibilidade tipo tardia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos machos da linhagem BALB/c, obtidos do CEMIB-UNICAMP a partir de colônias livres de patógenos específicos (S.P.F.), com 8 semanas de idade foram utilizados neste estudo.

Testes realizados a cada 3 meses desde 1989, para detecção de infecções nestas colônias apresentaram resultados negativos para os seguintes patógenos: coronavírus (MHV-3), Sendai vírus, vírus da pneumonia do camundongo (PVM), vírus da coriomeningite linfocítica (CCMV), Adenovírus, Polyoma vírus, K-vírus, Citomegalovírus Murino (MCMV), Rotavírus, Ectromelia, *Mycoplasma pulmonis*, ectoparasitas e endoparasitas.

Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em isoladores tipo Trexler (TREXLER, 1959) com água e ração estéreis oferecidos *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da Unicamp.

3.2. Fungos

O isolado virulento Pb18, obtido em 1929 de uma criança de 3 anos de idade e mantido em cultura desde então, foi utilizado. Este isolado é procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FCM-USP) e tem sido mantido, em nosso laboratório, na fase leveduriforme em meio de cultivo de Fava Netto a 35°C, sendo repicado a cada 15 dias.

A patogenicidade desta cepa fúngica foi confirmada por SINGER-VERMES *et al.* (1989), através da determinação da LD₅₀ e análise histopatológica do local de inoculação e lesões de disseminação durante 24 semanas em camundongos B10.A.

3.3. Preparo do Inóculo

Para o preparo da suspensão fúngica, o *P. brasiliensis* foi subcultivado em meio de cultivo de Fava Netto e coletado em sua fase de crescimento exponencial (7 dias). As células fúngicas foram ressuspensas em Solução Salina Tamponada com Fosfato estéril (PBS) pH 7,2, agitadas em agitador tipo Vortex, em dois ciclos de 15 segundos cada, centrifugadas por 10 minutos a 300g e lavadas por 2 vezes em PBS.

O número total de células presente na suspensão foi determinado por contagem em câmara de Newbauer e a concentração final ajustada para 10^7 *P. brasiliensis*/mL. A viabilidade dos fungos foi determinada pela coloração vital Lactofenol Azul de Algodão, conforme descrito por SANO *et al.* (1993).

3.4. Preparo do Antígeno de *P. brasiliensis* (Cell Free Antigen)

O preparo do antígeno fúngico foi realizado segundo CAMARGO *et al.* (1991), com algumas modificações. Para tanto, células de *P. brasiliensis*, a partir de cultivos de 7 dias (aproximadamente 300 mg) foram ressuspensas em 1 mL de PBS estéril acrescido de fenil-metil-sulfonil fluorido (PMSF) 1 mM, para a inibição da atividade de proteases; agitadas por 10 minutos em Vortex e centrifugadas por 10 minutos a 1300g.

O botão de células foi desprezado, enquanto o sobrenadante, contendo as proteínas (CFA- cell free antigen) que estavam fracamente ligadas à parede celular e portanto liberadas pela agitação, foi recolhido.

3.5. Dosagem de Proteínas

A concentração protéica do antígeno foi determinada pelo micrométodo de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando soro albumina bovina (Sigma) como amostra padrão.

3.6. Infecção Experimental

Camundongos BALB/c foram inoculados intraperitonealmente com 5×10^6 células de *P. brasiliensis* da cepa Pb18 contidos em 0,5 mL de PBS estéril. Animais controle foram inoculados com o mesmo volume de PBS estéril também por via intraperitoneal.

3.7. Coleta de Sangue, Contagem Total e Diferencial de Leucócitos

Os animais foram anestesiados e submetidos à sangria pelo plexo braquial às 0 e 24 horas e aos 3, 5, 7, 14 e 28 dias após a infecção.

Para a contagem total de leucócitos, 10 μ L de sangue foram diluídos em 190 μ L de ácido acético 3% em PBS para a lise de hemácias. A seguir, procedeu-se a determinação do número de total de células através de contagem em Câmara de Newbauer.

Para a contagem diferencial dos leucócitos, o sangue foi colhido com anticoagulante Citrato de Sódio, em seguida, foram feitos esfregaços em lâminas de vidro, num total de 3 esfregaços por animal e estes foram corados com May-Grunwald por 15 minutos. Realizou-se, então, a contagem diferencial de 100 células por lâmina.

3.8. Sacrifício e Coleta do Material

Lotes de 4 animais inoculados foram sacrificados por deslocamento cervical às 0 e 24 horas e aos 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 60 e 120 dias após a inoculação. Após a morte do animal os pulmões, o baço, o fígado e o timo foram fixados por gotejamento com formalina 10% e coletados. Os órgãos permaneceram imersos em solução fixadora de formalina 10% por 24 horas, sendo, em seguida, lavados em água corrente, desidratados em gradiente de álcool e incluídos em Histosec.

3.9. Obtenção da Medula Óssea

Lotes de 3 camundongos inoculados foram sacrificados às 0 e 24 horas e aos 3, 5, 7, 14 e 28 dias após a inoculação. Após a morte, o fêmur direito foi retirado, limpo, descalcificado em solução descalcificadora de Zenker por 24 horas, lavado em água corrente, desidratado em gradiente alcoólico e incluído em Histosec de acordo com a rotina histológica.

3.10. Determinação de Alterações do Peso em Órgãos Linfóides

O baço e o timo dos animais inoculados e controle foram retirados, limpos, lavados em PBS, secos em papel de filtro e, em seguida, pesados em balança analítica após cada sacrifício, para avaliação de possíveis alterações.

3.11. Microscopia de Luz

Após a inclusão, o material emblocado foi submetido à microtomia para obtenção de cortes finos (4 μ m). Estes cortes foram desparafinizados, hidratados em gradiente de álcool e corados por hematoxilina-eosina, para a avaliação histopatológica e por prata metanamina de Gomori-Grocott para detecção dos fungos. Os cortes de medula óssea, após a hidratação, foram tratados com iodeto alcoólico e tiosulfato de sódio 3% para a remoção de resíduos de mercúrio, derivados do tratamento de descalcificação pelo método de Zenker e a seguir foram corados por hematoxilina-eosina de acordo com a rotina histológica.

3.12. Detecção Imuno-histoquímica do *P. brasiliensis*

Os cortes histológicos foram desparafinizados, hidratados em gradiente de álcool, lavados em PBS-Tween 0,1%, incubados com soro normal de camundongo, diluído 1:50

em PBS-BSA 1%, por 30 minutos para o bloqueio de sítios inespecíficos e com H₂O₂ 3% em PBS-Tween 0,1% por 30 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena.

Procedeu-se, a seguir, a incubação dos cortes com soro de paciente portador de paracoccidioidomicose (Título: 1:16 em imunodifusão) diluído 1:100 em PBS-BSA 1% (gentilmente cedido pela Dra. Heloísa Blotta do Depto de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp), a 4°C durante a noite. Após a incubação com o anticorpo primário os cortes foram lavados em PBS-Tween-Leite 5%, PBS-Tween e PBS e incubados, por 1 hora, com anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase (A-8667, Sigma) diluído 1:200 em PBS-BSA 1%.

Findo o período de incubação, os cortes foram submetidos à lavagem, como anteriormente descrito. Realizou-se, a seguir, a revelação da reação com 3-3 Diaminobenzidina (1 mg/mL) em tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6 e H₂O₂ 0,03% por 10 minutos. A reação foi interrompida pela lavagem das lâminas com PBS. Por fim, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, desidratados e montados em Permount.

3.13. Avaliação Imunológica

A resposta de hipersensibilidade tipo tardia para *P. brasiliensis* foi avaliada a partir do 5º dia pós-inoculação através do Teste do Coxim Plantar (TCP), conforme descrito por MOSCARDI & FRANCO (1980). Para tanto, 24 horas antes do sacrifício foram injetados 150 µg/animal do antígeno de *P. brasiliensis* (item 3.4), em um volume de 100 µL, no coxim plantar direito (pata teste). O mesmo volume de PBS estéril foi injetado no coxim plantar esquerdo (pata controle). No momento do sacrifício os volumes das patas, teste e controle, foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, Japão) e a diferença de medida entre ela foi considerada como resposta ao antígeno. A confirmação da positividade do teste foi feita pela análise histológica das patas testadas. Para tanto, estas foram fixadas em formaldeído 10%, descalcificadas, desidratadas em gradiente de álcool, cortadas e coradas por hematoxilina-eosina. Foram consideradas positivas as patas que apresentavam infiltrado inflamatório mononuclear.

3.14. Análise Estatística

Foi utilizado o teste “*t*” de Student para amostras dependentes para a análise da diferença entre o volume das patas testadas e controle no Teste do Coxim Plantar.

Para as correlações entre atrofia tímica e resposta imune celular, e entre atrofia tímica e disseminação da infecção utilizou-se o Teste de Correlação de Pearson.

As variações de peso e número de células foram submetidas à Análise de Variância de 1 Via (ANOVA), seguida pelo Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett.

Todos os testes estatísticos foram realizados através do software GraphPad InStat versão 3.0 (1997). Para a confecção dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism versão 1.03 (1994). As amostras foram consideradas estatisticamente diferentes quando o valor de *p* foi menor ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Alterações no Peso de Órgãos Linfóides:

Os camundongos infectados com *P. brasiliensis* apresentaram sensíveis alterações no peso do timo e do baço ao longo da infecção. A atrofia tímica pôde ser detectada logo às 24 horas após a inoculação (Figura 1) e persistiu de maneira crescente até o 7º dia, onde o peso do timo dos animais infectados representava cerca de um terço do peso observado nos animais controle. Após este período, observou-se uma recuperação, sendo que aos 21 dias pós-inoculação, o peso médio dos timos era de cerca de dois terços do peso encontrado em animais não inoculados. A partir do 28º dia de inoculação, iniciou-se nova queda de peso, que evoluiu até o 42º dia, período após o qual, notou-se uma pequena retomada neste parâmetro. A partir do 60º dia de inoculação, houve a estabilização do peso. Entretanto, os animais infectados não foram capazes de recuperar a massa tímica existente antes da inoculação com o *P. brasiliensis*, e mesmo aos 120 dias de inoculação o timo correspondia à cerca de metade do encontrado em animais não infectados.

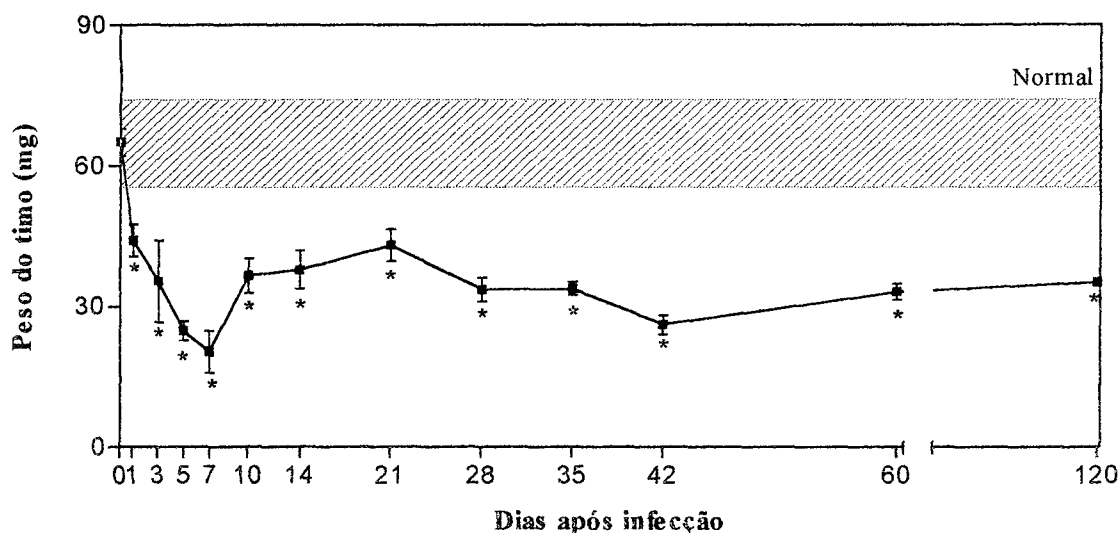


Figura 1: Cinética do peso do timo em camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*. A ANOVA revelou variações extremamente significativas neste grupo ($p < 0,0001$). Durante todo o período avaliado o peso do timo de animais infectados foi diferente do observado em animais controle (* $p < 0,01$). Os valores representam a média do peso encontrado em 4 animais $\pm$ o erro médio padrão.

Em contraste com a atrofia tímica, pode-se observar, ao longo da infecção, um quadro de esplenomegalia (Figura 2). O peso do baço aumentou de modo exponencial a partir do 5º dia de inoculação, atingindo, ao 10º dia, cerca de 3 vezes o encontrado em animais não infectados. A partir deste período a hipertrofia esplênica tornou-se menos pronunciada. Entretanto, mesmo após a estabilização do peso, depois do 42º dia pós-inoculação, o peso do baço manteve-se acima do observado em animais controle.

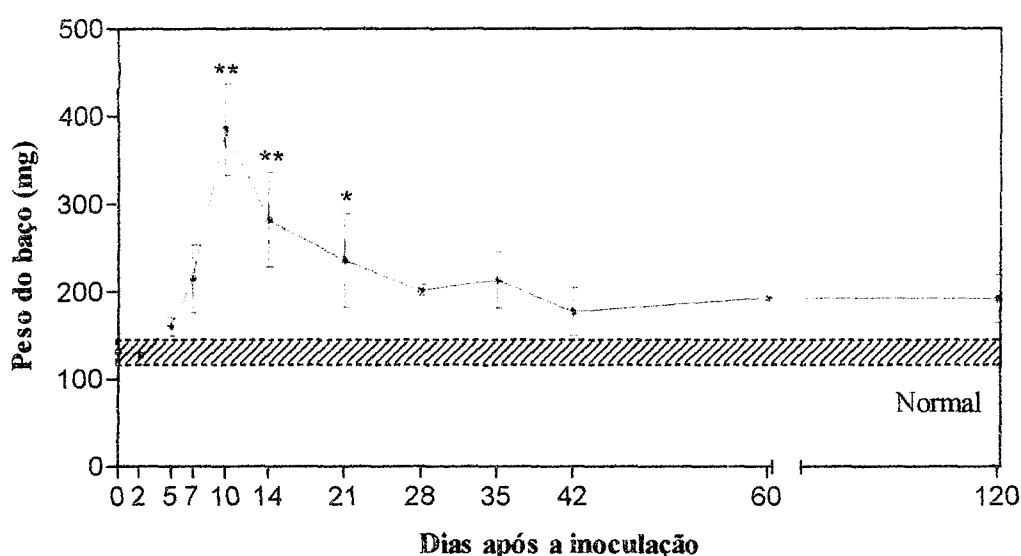


Figura 2: Cinética do peso do baço em camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*. A ANOVA revelou variações extremamente significativas neste grupo ($p < 0,0001$), enquanto o Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett demonstrou diferenças significantes no peso do baço observado aos 10, 14 e 21 dias, quando comparado com os controles (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os valores representam a média do peso encontrado em 4 animais $\pm$ o erro médio padrão.

4.2. Análise Histopatológica de Órgãos Linfóides Primários

4.2.1. Timo

Os animais infectados com *P. brasiliensis* apresentaram alterações tímicas ao longo de toda a infecção experimental. Às 24 horas pós-inoculação, notou-se, na região cortical, a ocorrência de células com núcleos picnóticos e vários histiócitos, constituindo um padrão em “céu estrelado” (Figura 3A). Na região medular, observou-se a presença de estruturas esféricas, refringentes com conteúdo eosinofílico, caracterizadas, através da técnica de imuno-histoquímica, como leveduras de *P. brasiliensis*, algumas, inclusive, com brotamentos. Estas leveduras mostravam-se circundadas por células grandes com núcleos claros e alongados e citoplasma abundante, possivelmente histiócitos (Figura 3B).

O córtex tornou-se menos extenso e denso aos 2 dias de inoculação, enquanto a medula mostrou adensamento celular e a delimitação corticomedular tornou-se menos nítida (Figuras 3C). Notou-se um aumento no número de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos e presença de muitos fungos na medula e a ocorrência de polimorfonucleares na região cortical (Figura 3D).

A delimitação corticomedular desapareceu completamente aos 3 dias pós-inoculação, quando, apenas pequenos aglomerados de timócitos, semelhantes aos observados no córtex normal, se destacavam nas regiões marginais dos lobos tímicos e, algumas vezes, no centro (Figura 3E). Neste período o timo mostrava-se extremamente desorganizado em comparação com o normal (Figura 3F). A região subcapsular apresentava-se infiltrada por neutrófilos, pequenos linfócitos e células mononucleares, e alguns eosinófilos. Mais ao centro dos lobos tímicos, na região supostamente medular, observou-se um tecido mais denso que a medula tímica normal, abrigando vários fungos.

O timo mostrava-se ainda desorganizado, aos 5 dias pós-inoculação, entretanto, as regiões de córtex e medula tornaram-se novamente distintas, embora a delimitação não fosse bem nítida. A infiltração subcapsular mostrou-se mais intensa neste período, por vezes, invadindo o parênquima tímico e ocupando as proximidades de trabéculas e vasos sanguíneos (Figura 3G). A região medular revelou um padrão semelhante ao observado aos 3 dias de inoculação.

Aos 7 pós-inoculação, o timo mostrou uma recuperação do padrão histológico. Contudo, o córtex era, ainda, menos denso que o normal e um infiltrado predominantemente granulocítico persistiu na região subcapsular. Neutrófilos e eosinófilos foram também observados na região medular, que se apresentava menos povoada que aos 5 dias de inoculação e com padrão mais próximo do normal, apesar de vários fungos serem ainda observados.

A partir do 10º dia pós-inoculação, o timo dos animais infectados era semelhante ao dos animais controle, exceto pela presença de infiltrados na região capsular que persistiram até o fim do período experimental (Figura 3H).

O número de *P. brasiliensis* encontrados no timo diminuiu gradativamente ao longo da infecção, sendo que estes se tornaram raros a partir de 35 dias pós-inoculação e ausentes aos 120 dias de inoculação.

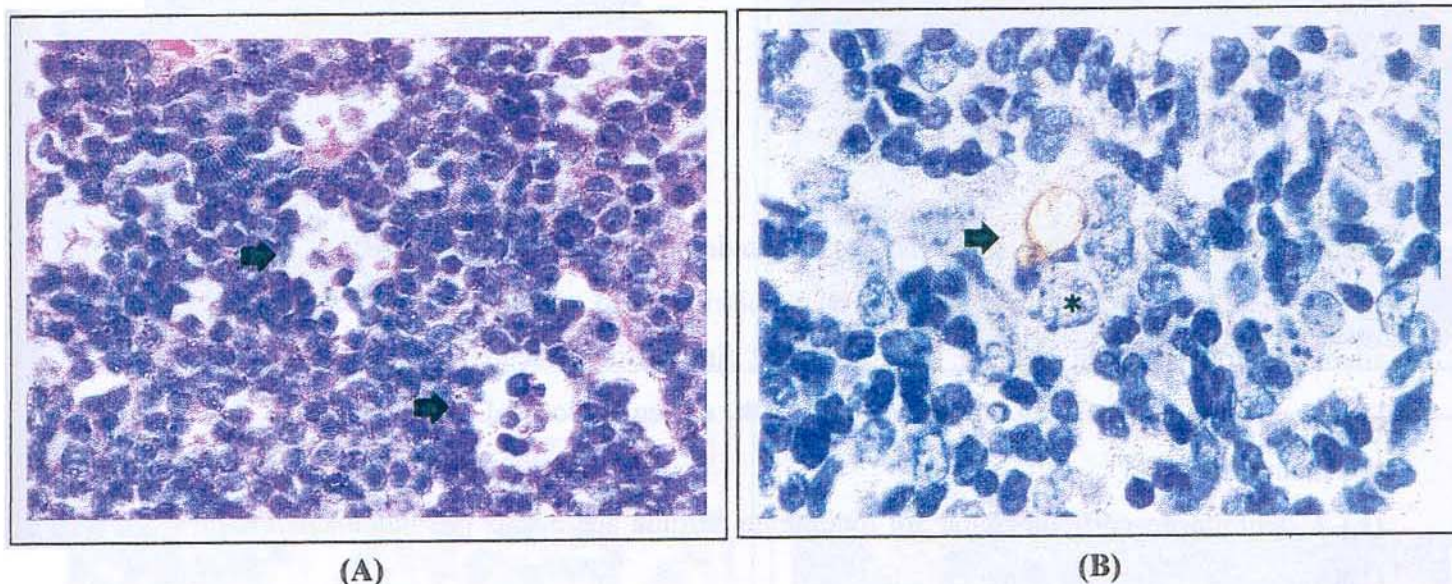


Figura 3: Alterações tímicas observadas ao longo da infecção por *P. brasiliensis*.

- (A) Podem ser observados restos celulares e vários histiócitos, constituindo um padrão em “céu-estrelado” (➡). H.E. (400x). 24 horas pós-inoculação;
- (B) Nota-se a presença de uma levedura de *P. brasiliensis* com um brotamento (➡) circundada por histiócitos (*). Imuno-histoquímica contracorada com hematoxilina (1000x). 24h pós-inoculação.

Figura 3: Alterações tímicas observadas ao longo da infecção por *P. brasiliensis*.

(C) Nota-se a redução da extensão e da celularidade do córtex em contraste com o adensamento da camada medular. H.E. (200x). 2 dias pós-inoculação;

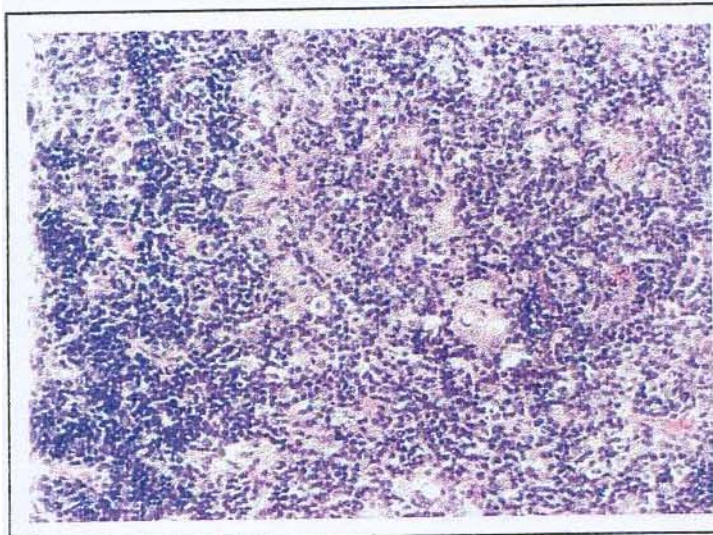
(D) Observa-se a ocorrência de um eosinófilo (➡) na região cortical. H.E. (1000x). 2 dias pós-inoculação;

(E) A delimitação corticomedular foi totalmente perdida aos 3 dias pós-inoculação. H.E. (100x).

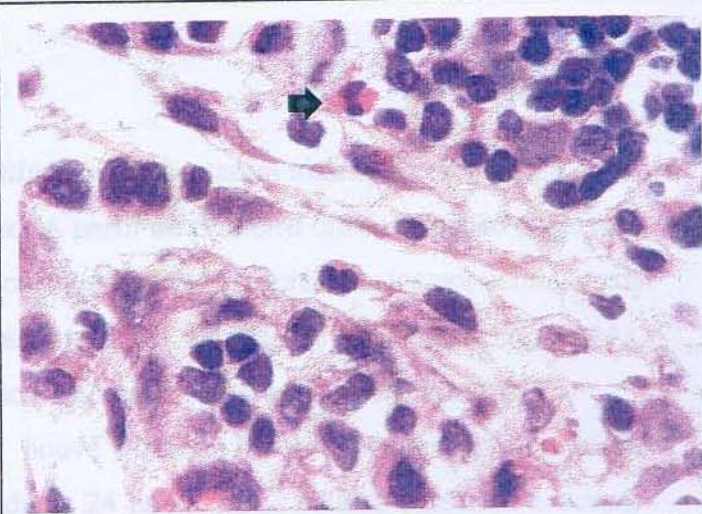
(F) Timo normal. Uma clara delimitação entre córtex e medula pode ser observada. H.E. (100x);

(G) Um grande número de polimorfonucleares (➡) pode ser observado no parênquima tímico. H.E. (1000x). 5 dias pós-inoculação;

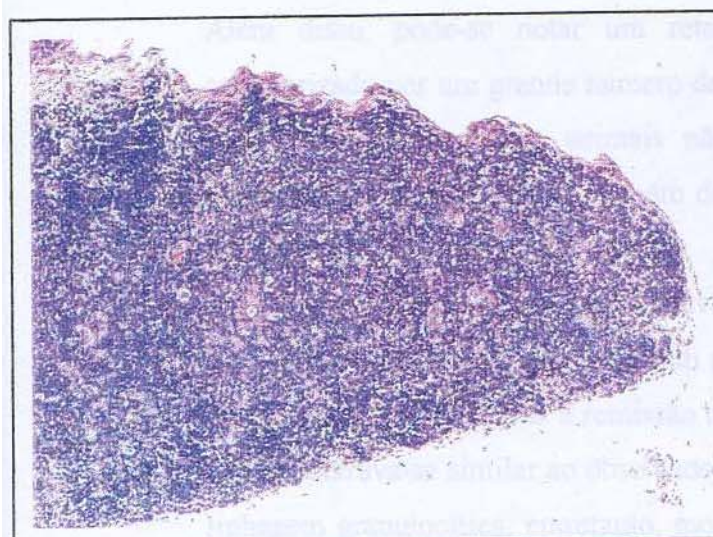
(H) A presença de um infiltrado subcapsular (*) que persistiu até o final do período experimental pode ser notada (*) H.E. (100x). 10 dias pós-inoculação.



(C)



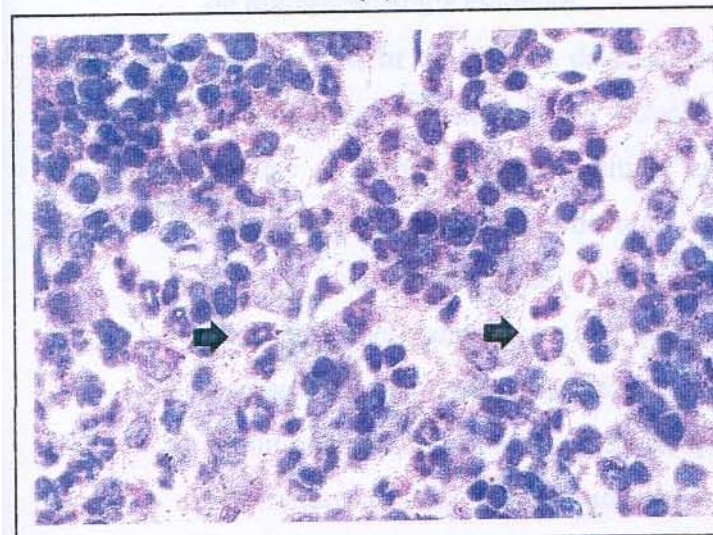
(D)



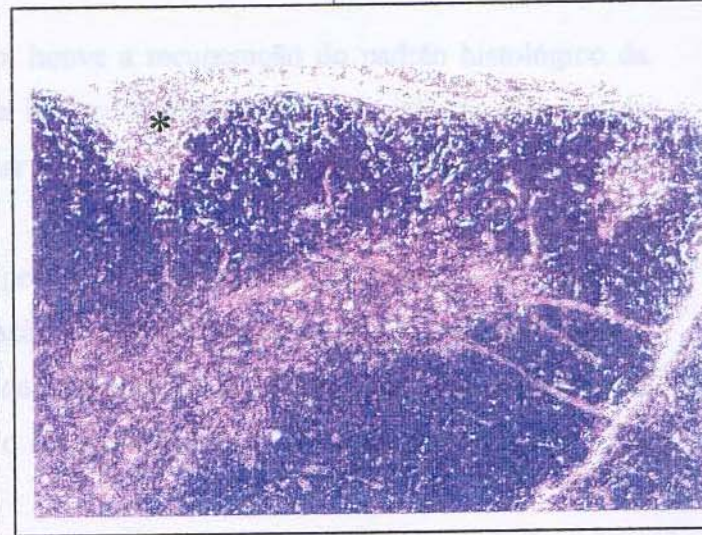
(E)



(F)



(G)



(H)

4.2.2. Medula Óssea

Os animais infectados pelo *P. brasiliensis* apresentaram alterações na medula óssea típicas de um processo infeccioso sistêmico. A partir do primeiro dia de infecção observou-se um discreto aumento no número de precursores imaturos, representados por células mais claras e volumosas que as células maduras, na região próxima às trabéculas (Figura 4A), além de congestão vascular em comparação com a medula óssea normal (figura 4B).

Entre 3 e 5 dias de inoculação, houve aumento de precursores granulocíticos imaturos, em comparação com o observado às 24 horas. Estas células passaram a ocupar toda a região peritrabecular onde, normalmente, nota-se a ocorrência de células adiposas. Além disso, pode-se notar um retardo na maturação das células desta linhagem, caracterizado por um grande número de células grandes com o núcleo circular (Figura 3C), em comparação com os animais não-infectados, nos quais a maturação transcorreu normalmente (Figura 3D). O número de megacariócitos também se mostrou sensivelmente aumentado aos 5 dias de inoculação.

Aos 7 dias pós-inoculação houve uma intensificação do quadro de hiper celularidade e o retardo da maturação da linhagem granulocítica foi bastante expressivo. Já aos 14 dias de inoculação verificou-se a remissão da hiper celularidade e no número de megacariócitos que encontrava-se similar ao observado em animais não infectados. O número de células da linhagem granulocítica, entretanto, mostrou-se ainda bastante aumentado, sendo o retardo de maturação ainda evidente.

A partir de 28 dias de inoculação, houve a recuperação do padrão histológico da medula óssea. Observou-se a redução da hiper celularidade, a diminuição no número de células da linhagem granulocítica, apesar de muitos precursores imaturos serem ainda observados na região peritrabecular.

O acometimento da medula óssea pelo *P. brasiliensis* não foi observado ao longo da infecção experimental, uma vez que a reação imuno-histoquímica para o fungo foi sempre negativa nos animais infectados. Além da ausência do fungo, nenhum tipo de resposta granulomatosa, que pudesse indicar que o fungo foi capaz de invadir a medula óssea, foi observado ao longo de toda a infecção.

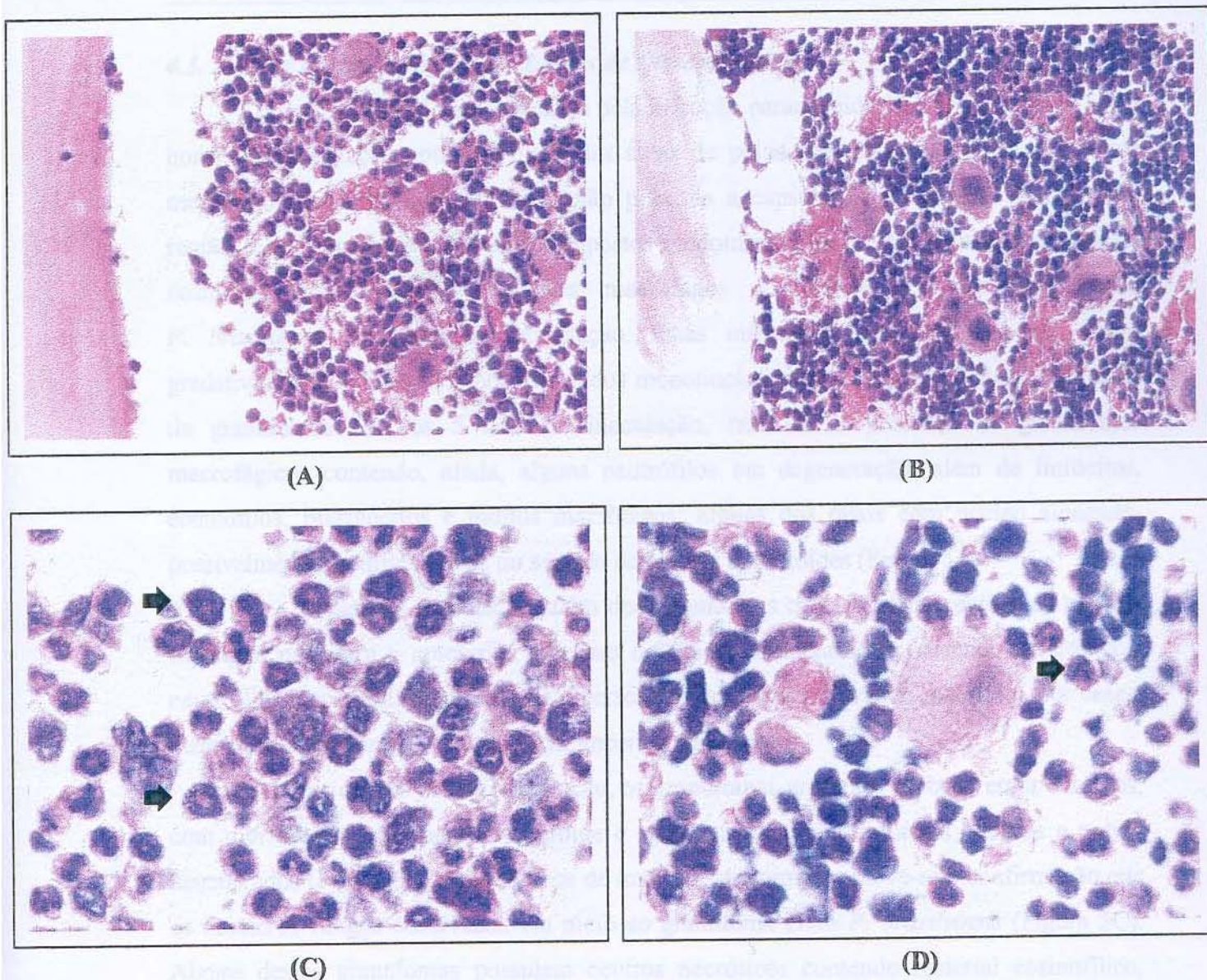


Figura 4: Alterações na medula óssea de camundongos infectados por *P. brasiliensis*.

(A) Observou-se um aumento no número de precursores imaturos e desaparecimento das células adiposas na região próxima a trabécula. H.E. (200x). 24 h pós-inoculação;

(B) Medula normal. Existe um pequeno número de precursores e algumas células adiposas na região peritrabecular. H.E. (200x);

(C) Nota-se o retardo da maturação de células da linhagem granulocítica representado por células volumosas com núcleo circular (➡). H.E. (1000x). 5 dias pós-inoculação;

(D) Na medula de animais não infectados observou-se a maturação normal de células da série granulocítica (➡). H.E. (1000x).

4.3. Análise Histopatológica das Lesões de Disseminação

O baço foi o órgão mais afetado pela infecção paracoccidioidomicótica. Logo às 24 horas pós-inoculação notou-se fusão das áreas de polpa branca e a presença de muitos megacariócitos, especialmente na região próxima à cápsula. Pode-se notar ainda, nesta região, a ocorrência de infiltrados compostos predominantemente por neutrófilos, além de eosinófilos, plasmócitos e alguns macrófagos e linfócitos envolvendo muitos *P. brasiliensis* em fase de reprodução. Estes infiltrados polimorfonucleares foram gradativamente substituídos por infiltrados mononucleares que evoluíram para a formação de granulomas. Já aos 5 dias de inoculação, notou-se a presença de granulomas macrofágicos contendo, ainda, alguns neutrófilos em degeneração, além de linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e muitos macrófagos, alguns dos quais com núcleo alongado, possivelmente modificando-se no sentido de células epitelióides (Figura 5A).

Aos 7 dias pós-inoculação, além dos granulomas típicos, várias regiões da cápsula esplênica passaram a apresentar intensos infiltrados inflamatórios contendo macrófagos, neutrófilos e eosinófilos ao redor de diversos fungos. Estes infiltrados assumiam, por vezes, disposição concêntrica, sem, contudo, encerrar granulomas.

A partir do 10º dia de inoculação, os granulomas presentes no baço eram extensos, com morfologia tipicamente epitelióide e apresentavam muitos fungos íntegros e outros degenerados (Figura 5B). Pela técnica de imuno-histoquímica obteve-se a confirmação que os inúmeros fungos observados em meio ao granuloma eram *P. brasiliensis* (Figura 5C). Alguns destes granulomas possuíam centros necróticos contendo material eosinofílico, fungos e células em degeneração, circundados por macrófagos vacuolados, células epitelióides, neutrófilos, alguns eosinófilos, além de muitos fungos. Linfócitos e plasmócitos ocupavam a região periférica do granuloma, sem, contudo, delimitar um halo linfoplasmocitário. Neste período, a cápsula revelava intensa infiltração mononuclear ao redor de fungos em multiplicação. No parênquima, verificava-se a fusão da polpa branca, que em algumas regiões perdeu completamente sua delimitação, mostrando-se dispersa em meio à polpa vermelha. Notou-se, ainda, a presença de muitos neutrófilos nas regiões circunvizinhas aos granulomas, indicando um possível quadro de neutropoiese sublesional, além intensa proliferação de megacariócitos.

A partir deste período, os granulomas tornaram-se compactos e organizados, mantendo o mesmo padrão celular. Aos 28 dias pós-inoculação, observou-se células gigantes em meio aos granulomas e halos linfoplasmocitários bem definidos ao seu redor. Por vezes, os granulomas eram, ainda, circundados por tecido de granulação (Figura 5D).

O parênquima esplênico passou a apresentar sinais de reorganização da polpa branca a partir dos 35 dias de inoculação, entretanto, mesmo aos 120 dias de inoculação notou-se, fusão da polpa branca, além da presença de muitos megacariócitos. A resposta granulomatosa persistiu até o fim do período experimental, quando se observaram granulomas epitelióides junto à cápsula abrigando inúmeros fungos em reprodução ativa em meio a macrófagos xantomatosos e células epitelióides (Figura 5E). Estes granulomas possuíam pequenos aglomerados linfoplasmocitários na periferia e eram circundados por tecido de granulação ricamente irrigado, mas já não possuíam células gigantes, observadas somente até o 42º dia de inoculação.

Infiltrados inflamatórios ao redor da cápsula esplênica persistiram até 60 dias pós-inoculação, quando mostravam-se difusos ou concêntricos, e eram constituídos por muitos macrófagos, células epitelióides, linfócitos e plasmócitos envolvendo alguns *P. brasiliensis*.

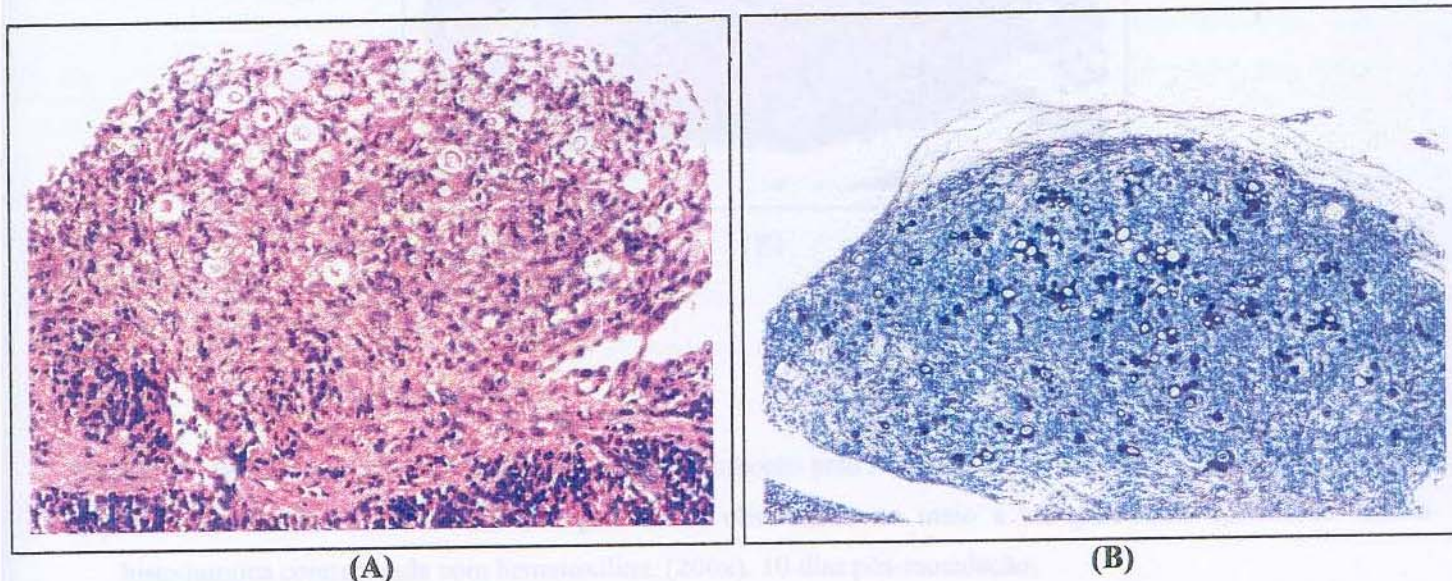
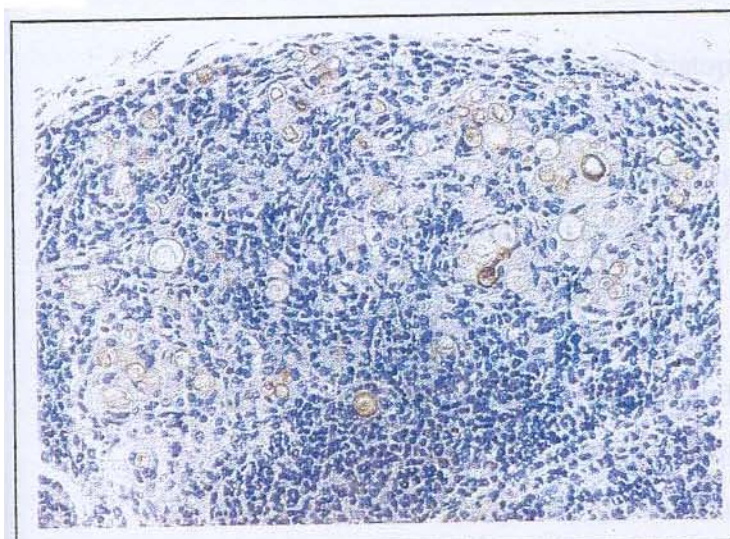
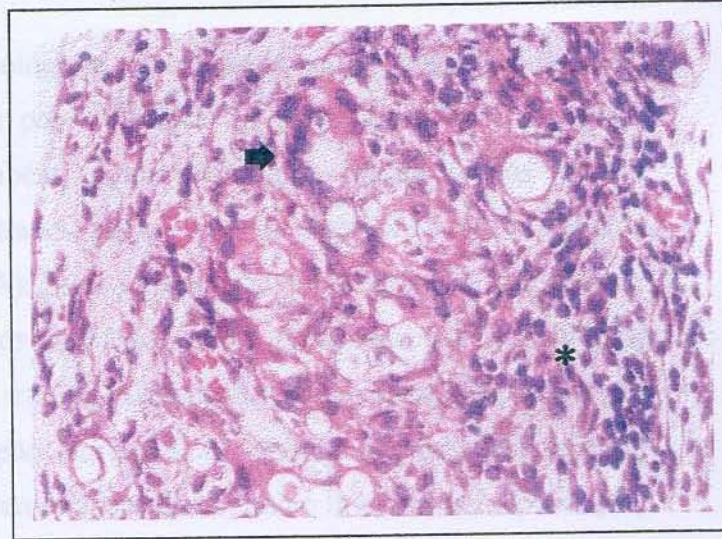


Figura 5: Análise histopatológica do baço durante a infecção pelo *P. brasiliensis*.

- (A) Pode-se notar a presença de granuloma macrófágico na cápsula esplênica. H.E. (200x). 5 dias pós-inoculação;
 (B) Várias leveduras podem ser observadas em meio a um granuloma epitelióide. Prata metanamina de Gomori (100x). 10 dias pós-inoculação;



(C)



(D)



(E)

Figura 5: Análise histopatológica do baço durante a infecção pelo *P. brasiliensis*.

- (B) Inúmeras células de *P. brasiliensis* podem ser observadas em meio a um granuloma epitelióide. Imuno-histoquímica contracorada com hematoxilina. (200x). 10 dias pós-inoculação;
- (D) Nota-se a presença de halo linfoplasmocitário (*) e células gigantes (➡) em meio a granuloma epitelióide. H.E. (400x). 28 dias pós-inoculação;
- (E) Pode-se observar a presença de granuloma epitelióide bem organizado junto à capsula esplênica. H.E. (100x). 120 dias pós-inoculação.

No fígado, as alterações histopatológicas concentraram-se na região subcapsular. Estas foram, inicialmente, representadas por infiltrados inflamatórios difusos, ricos em macrófagos e neutrófilos, contendo, também, alguns eosinófilos. Muitos fungos podiam também ser observados em meio ao infiltrados, alguns deles degenerados e outros íntegros em plena atividade reprodutiva (Figura 6A). Estes infiltrados evoluíram para a formação de granulomas que, ao redor do 10º dia pós-inoculação, eram compostos por macrófagos, alguns vacuolados e outros apresentando transformação para células epitelióides, além de alguns plasmócitos e eosinófilos na região periférica. Os granulomas possuíam centros necróticos evidentes que abrigavam inúmeros *P. brasiliensis* tanto íntegros, em reprodução, quanto já degenerados.

Em torno de 21 dias pós-inoculação os granulomas mostravam-se mais compactos e notava-se na periferia intensa proliferação fibroblástica e neoformação vascular (Figura 6B). Em alguns casos, os granulomas mostravam 3 regiões claramente distintas: um centro necrótico com restos celulares e fungos; uma camada composta por macrófagos vacuolados, restos fúngicos e células epitelióides e alguns neutrófilos; e um halo linfoplasmocitário contendo, também, alguns eosinófilos (Figura 6C). Este padrão manteve-se até o 35º dia de inoculação; a partir daí não foram mais observados granulomas, mas apenas pequenos infiltrados contendo alguns fungos que persistiram até os 60 dias pós-inoculação.

No fígado de alguns dos animais infectados pelo *P. brasiliensis* notou-se, ainda, a presença de megacariócitos em meio ao parênquima entre 10 e 60 dias de inoculação.

A análise dos pulmões de animais infectados com *P. brasiliensis* revelou a presença esporádica de discretos infiltrados inflamatórios, predominantemente mononucleares entre 2 e 35 dias pós-inoculação (Figura 6D). Pela coloração por Prata Metanamina de Gomori evidenciou-se a presença de um pequeno número de fungos em meio a estes infiltrados.

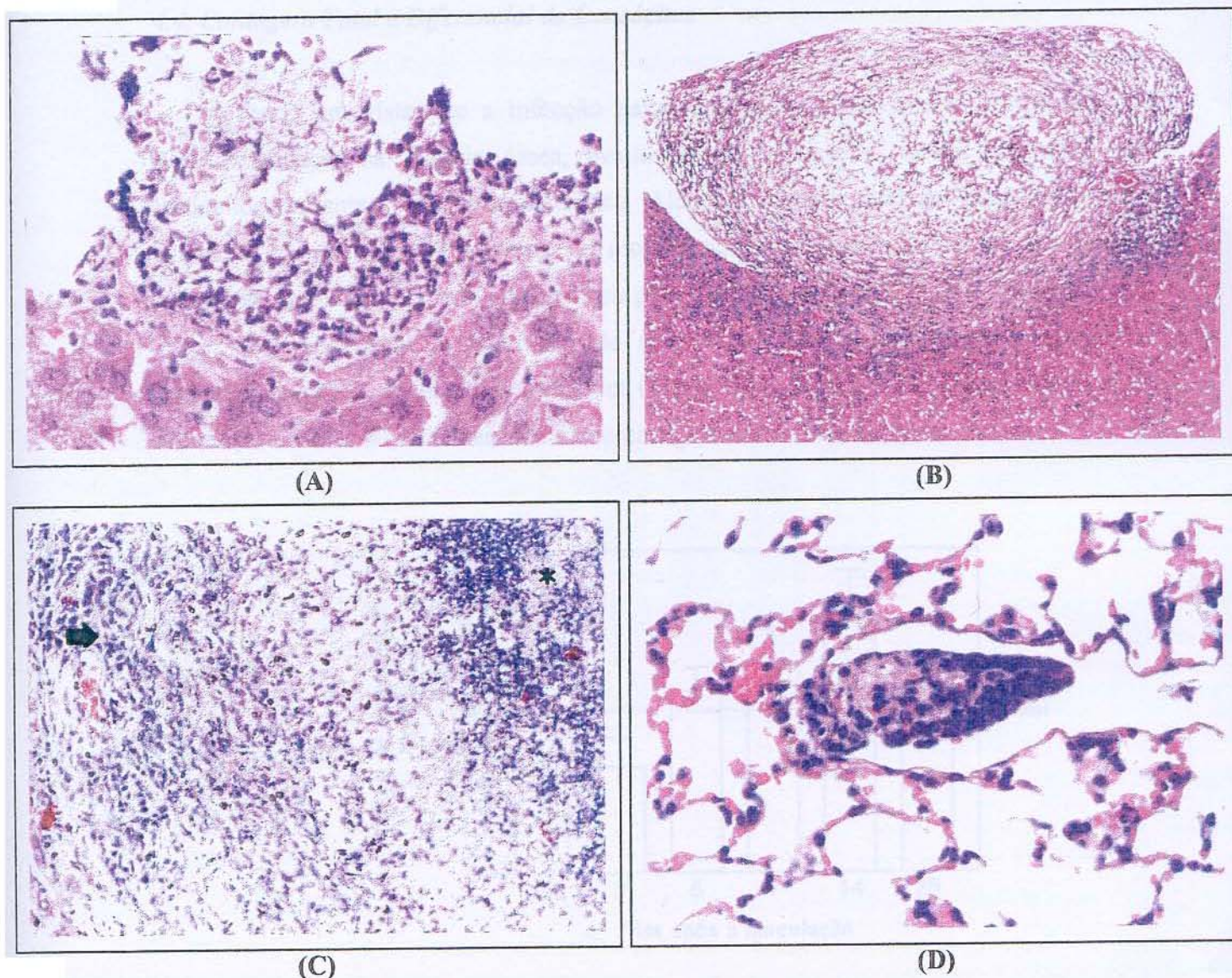


Figura 6: Análise histopatológica das lesões de disseminação observadas durante a infecção pelo *P. brasiliensis*.

- (A) Pode-se notar a ocorrência de infiltrado inflamatório difuso no fígado em meio a um grande número de fungos. H.E. (400x). 24 horas pós-inoculação;
- (B) Observa-se um granuloma epitelióide compacto junto à capsula hepática. H.E. (100x). 21 dias pós-inoculação;
- (C) Três regiões distintas podem ser observadas no granuloma: um centro necrótico (*), uma camada composta por células vacuoladas e um halo linfoplasmocitário (➡). H.E. (400x). 21 dias pós-inoculação;
- (D) Nota-se a ocorrência de infiltrado inflamatório difuso no pulmão. H.E. (400x). 3 dias pós-inoculação.

4.4. Contagem Total e Diferencial de Leucócitos

Tendo em vista que a infecção paracoccidioidomycótica induz atrofia tímica e hiperplasticidade na medula óssea, avaliou-se as implicações destas alterações nos leucócitos presentes no sangue periférico. Além do número total de leucócitos, foram avaliadas as alterações no número de monócitos, neutrófilos e linfócitos, que sofrem maturação nestes órgãos e são responsáveis pela resposta frente ao *P. brasiliensis*.

O número total de leucócitos do sangue periférico sofreu pequenas alterações durante a infecção paracoccidioidomycótica (Figura 7). Entretanto, em nenhum momento as diferenças observadas foram estatisticamente significantes em relação ao controle.

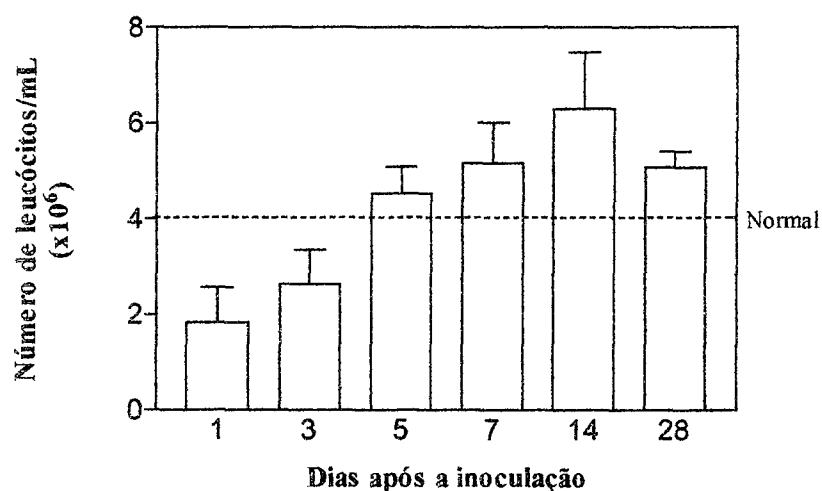


Figura 7: Cinética do número total de leucócitos do sangue periférico de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*. A ANOVA revelou variações significativas neste grupo ($p=0,0085$), entretanto, o Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett não demonstrou diferenças significantes entre o número de leucócitos encontrado nos animais infectados e nos controle em nenhum dos tempos avaliados. Os valores representam a média do número de células encontrado em 3 animais $\pm$ o erro médio padrão.

O número total de linfócitos presentes no sangue periférico apresentou-se significativamente reduzido no início da infecção pelo *P. brasiliensis* (Figura 8), sendo restaurado a partir do 5º dia de infecção. A partir deste período os valores mantiveram-se próximos do encontrado nos animais controle.

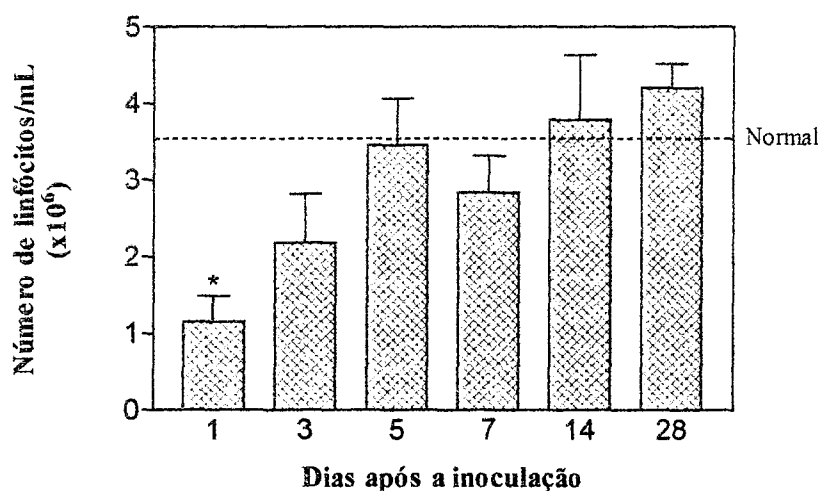


Figura 8: Cinética do número total de linfócitos do sangue periférico de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*. A ANOVA revelou variações significativas neste grupo ($p < 0,0133$), e o Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett demonstrou que o número de linfócitos observado 24 horas pós-inoculação é estatisticamente diferente do encontrado em animais não infectados (* $p < 0,05$). Os valores representam a média do número de células encontrado em 3 animais $\pm$ o erro médio padrão.

O número de monócitos circulantes em camundongos infectados pelo *P. brasiliensis* oscilou ao longo da infecção (Figura 9), entre diferentes períodos avaliados e entre os animais infectados no mesmo período. Este número tendeu a ser maior nos animais infectados que nos controles, durante toda a infecção.

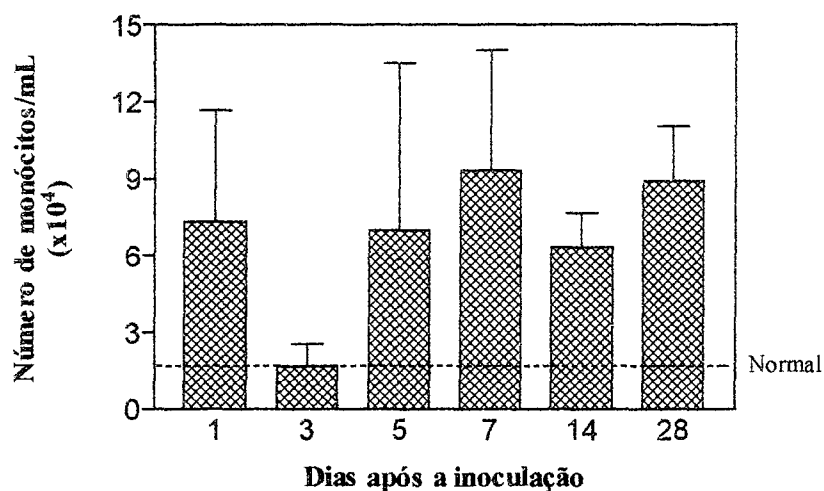


Figura 9: Cinética do número total de monócitos do sangue periférico de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*. A ANOVA não revelou variações significativas neste grupo ($p=0,55330$). Os valores representam a média do número de células encontrado em 3 animais $\pm$ o erro médio padrão.

A contagem diferencial de neutrófilos revelou um aumento no número destas células ao longo da infecção paracoccidiodomicótica (Figura 10), sendo que estes valores tornaram-se significativamente maiores que o observado em animais não infectados entre 7 e 14 dias de infecção. A partir daí houve uma redução no número de neutrófilos encontrados nos animais infectados.

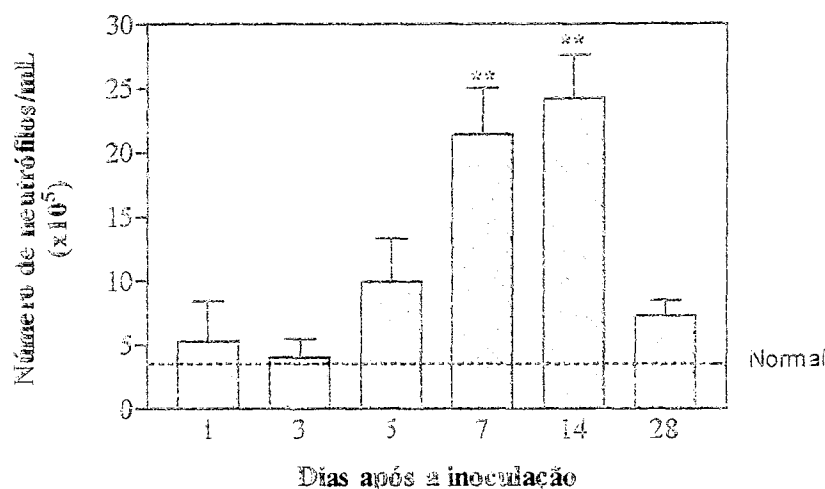


Figura 10: Cinética do número total de neutrófilos circulantes no sangue periférico de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*. A ANOVA revelou variações extremamente significativas neste grupo ($p < 0,0001$), enquanto o Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett demonstrou diferenças significantes entre 7 e 14 dias de infecção em relação ao controle (** $p < 0,01$). Os valores representam a média do número de células encontrado em 3 animais $\pm$ o erro médio padrão.

4.5. Avaliação Imunológica

A avaliação da resposta de hipersensibilidade tardia específica para *P. brasiliensis* foi feita através do TCP, injetando-se 150 μ g de antígeno específico no coxim plantar posterior direito de cada animal, 24 horas antes do sacrifício. Foram considerados como parâmetros para a avaliação imunológica o aumento do volume da pata teste em relação à pata controle, inoculada com PBS estéril, e a presença de infiltrado inflamatório mononuclear.

Ao longo de todo o período estudado observou-se que, 24 horas após o teste, as patas inoculadas com o antígeno de *P. brasiliensis*, eram mais volumosas que as inoculadas

com PBS (Figura 11). A diferença de volume entre as patas teste e controle aumentou do 5º ao 10º dia de infecção. Depois deste período, contudo, houve um pequeno decréscimo nesta diferença que persistiu até o 21º dia. A partir daí, o volume das patas testadas foi progressivamente maior do que o observado nas patas controles, atingindo o pico máximo aos 60 dias de inoculação.

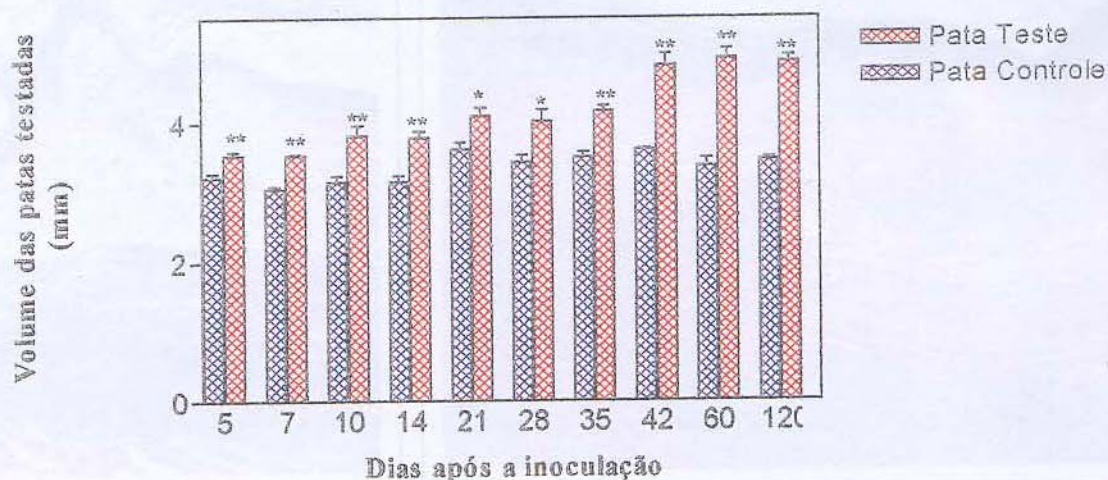
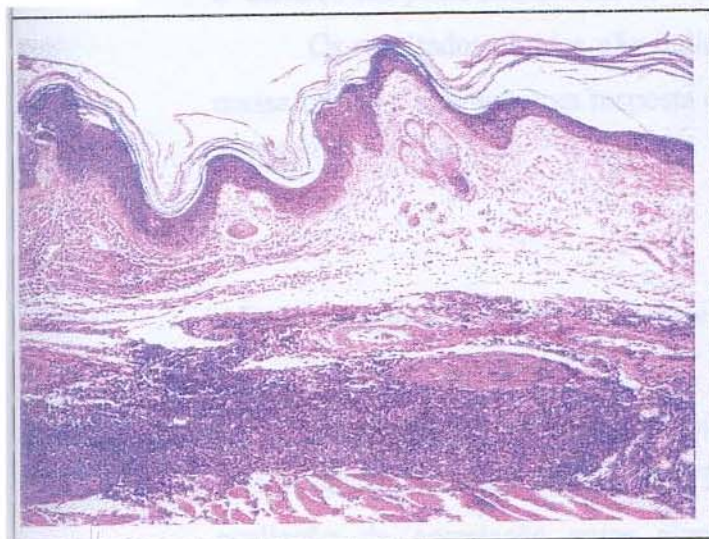


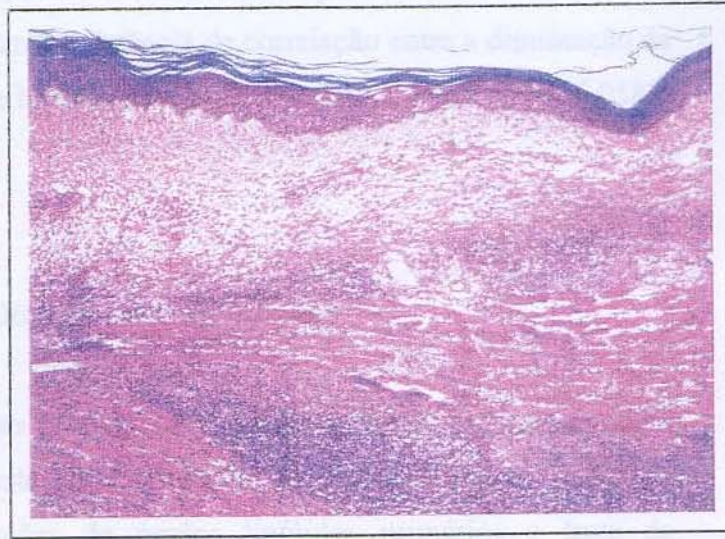
Figura 11: Volume das patas de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* 24 horas após o TCP. O teste "t" revelou diferenças estatisticamente significantes entre o volume das patas testadas e controle ao longo de todo o experimento (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os valores representam a média do volume das patas de 4 animais $\pm$ o erro padrão médio.

Histologicamente, o TCP apresentou-se positivo logo aos 5 dias de inoculação, quando notou-se a presença de um infiltrado inflamatório moderado, composto por neutrófilos íntegros e degenerados, além de células mononucleares como macrófagos, linfócitos e plasmócitos, entre o tecido conjuntivo e a camada muscular (Figura 12A). Notou-se, ainda, intensa congestão vascular com marginalização leucocitária ao redor da área infiltrada. Este padrão histológico foi mantido ao longo de toda a infecção, entretanto, a intensidade do infiltrado aumentou, especialmente a partir do 35º dia, quando as patas teste mostraram-se, também significativamente aumentadas. O infiltrado passou, então, a

invadir a musculatura e acúmulos de células inflamatórias podiam ser observadas entre as camadas musculares do coxim plantar (Figura 12B). A presença de eosinófilos em meio ao infiltrado inflamatório foi observada a partir do 35º dia.



(A)



(B)

Figura 12: Análise histológica das patas de camundongos experimentalmente infectados com *P. brasiliensis* submetidas ao TCP.

(A) Um infiltrado inflamatório difuso é observado entre o tecido conjuntivo e a camada muscular.

H.E. (100x). 5 dias pós-inoculação;

(B) Nota-se a presença de um intenso infiltrado invadindo a camada muscular. H.E. (100x). 60 dias pós-inoculação.

4.6. Correlação entre Peso do Timo e Resposta de Hipersensibilidade Tipo Tardia

Para a avaliação da correlação existente entre as alterações em órgãos linfóides primários e a resposta imune celular optou-se pela utilização do Teste de Correlação de Pearson. Foram utilizados como parâmetros a atrofia tímica, estimada pelo peso do timo, e o inchaço das patas submetidas ao TCP, como estimativa da resposta imune celular.

Os resultados obtidos não indicam a existência de correlação entre a diminuição da massa tímica e alterações na resposta de hipersensibilidade tipo tardia pelo TCP ($r=0,0583$; $p>0,5$).

4.7. Correlação entre Peso do Timo e Disseminação da Infecção

As alterações em órgãos linfóides primários e a disseminação da infecção também foram correlacionadas através do Teste de Correlação de Pearson. Assim como na avaliação da correlação entre alterações de órgãos linfóides primários e teste de hipersensibilidade tipo tardio, utilizou-se o peso do timo como parâmetro do acometimento de órgãos linfóides. Optamos por utilizar o peso do baço como parâmetro da disseminação da infecção, uma vez que inúmeras células inflamatórias são recrutadas na tentativa de reter o fungo através da formação de granulomas compactos neste órgão. Tal reação inflamatória evitaria a disseminação do *P. brasiliensis* e seria refletida como um aumento no peso deste órgão.

De acordo com a tabela de Rugg (SOUNIS, 1971), existe uma correlação inversa apreciável entre os valores do peso de timo e baço (Figura 13). Isto indica que em alguns pontos a atrofia tímica coincidiu com a hipertrofia esplênica, e possivelmente com o controle da disseminação da infecção.

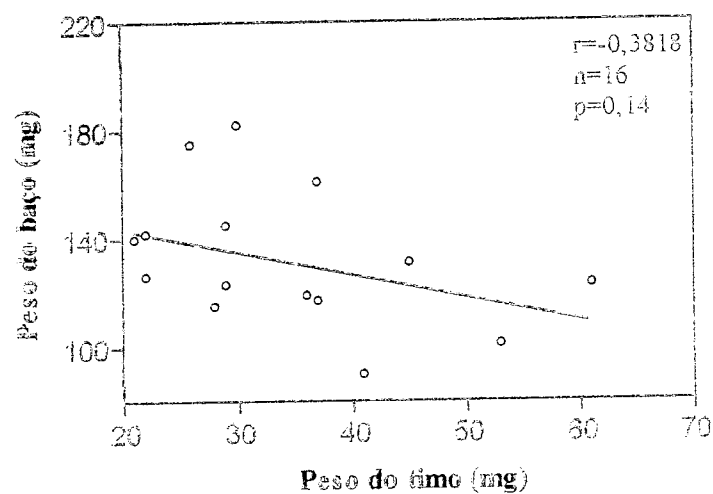


Figura 13: Correlação entre o peso do timo e o peso do baço em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *P. brasiliensis*, entre 1 e 5 dias de infecção.

5. DISCUSSÃO

A paracoccidiodomicose apresenta alta incidência no Brasil, especialmente no Estado de São Paulo, onde a maioria dos casos é registrada. As diferentes formas clínicas da doença estão relacionadas com o nível de resposta imune celular contra o fungo. Os indivíduos com níveis elevados de resposta exibem formas moderadas da doença, enquanto as formas disseminadas cursam com baixos níveis de resposta imune celular. Apesar de haver evidências da indução de imunossupressão pela infecção paracoccidiodomicótica, os mecanismos desencadeadores deste processo não estão ainda elucidados. No presente estudo, observou-se que o *P. brasiliensis* é capaz de invadir o timo, e que a infecção paracoccidiodomicótica induz severa atrofia tímica na fase aguda da infecção. Esta atrofia é caracterizada por redução do peso, depleção da camada cortical e perda da delimitação corticomedular.

Resultados semelhantes têm sido descritos em outros modelos de doenças infecciosas. SAVINO *et al.* (1989), estudando a Doença de Chagas experimental observaram perda de células da camada cortical dos lóbulos tímicos e até mesmo o desaparecimento do córtex em camundongos C57Bl/6. A atrofia tornou-se mais severa após 10 dias de infecção, quando os autores observaram também a presença de ninhos de *Trypanosoma cruzi* em meio ao parênquima. Aliado a isso, em nosso laboratório, foi verificado que animais coinfectados com *T. cruzi* e Vírus da Hepatite Murina (MHV) apresentam atrofia tímica logo aos 3 dias pi, mesmo na ausência de parasitas e partículas virais no timo VERINAUD *et al.* (1999), .

Além do MHV, o citomegalovírus murino também pode causar danos ao timo. PRICE *et al.* (1993), relataram, em camundongos BALB/c infectados intraperitonalmente, danos teciduais muito semelhantes aos observados no presente estudo. Houve perda de 80 a 90% das células tímicas entre 4 e 6 dias pós-inoculação, seguida por recuperação entre 7 e 16 dias; redução da camada cortical; perda da delimitação corticomedular; presença de focos perivasculares de neutrófilos e de infiltrado mononuclear ao redor do timo. Apesar disso, a ocorrência de partículas virais no microambiente tímico não foi demonstrada por imunoperoxidase.

No caso da paracoccidiodomicose experimental, nenhum relato literário atesta comprometimento tímico. Apenas um estudo, realizado por BURGER *et al.* (1996), refere a

análise histopatológica do timo, sem, contudo, relatar alguma alteração. Cabe ressaltar que neste estudo os autores avaliaram o timo somente a partir da primeira semana de infecção, período no qual, de acordo com os achados aqui relatados, este órgão apresenta-se já em fase de recuperação, com um padrão histológico próximo do normal.

Em outras micoses, entretanto, a atrofia tímica tem sido relatada. Fungos do gênero *Saprolegnia* que infectam naturalmente salmonídeos, causando uma micose tegumentar, alteram drasticamente o microambiente tímico. Como consequência, ocorre perda da regionalização tímica e uma marcada redução na densidade celular do parênquima (ALVAREZ *et al.*, 1995). Estas alterações são ainda mais pronunciadas nos casos onde o fungo invade o timo e coincidem com quadros exacerbados da micose.

A infecção de camundongos por *Cryptococcus neoformans* seguida por imunização com soro albumina humana também leva à várias alterações no microambiente tímico (SOTOMAYOR *et al.*, 1989). A presença do parasita foi observada no timo de todos os animais infectados e, em alguns casos, houve envolvimento da camada cortical, acompanhado de reações granulomatosas fracas ou moderadas, perda da arquitetura do órgão, além de hiperplasia e aparecimento de centros germinativos. Tais reações não ocorreram nos animais controle, imunizados apenas com soro albumina humana.

As alterações tímicas relatadas em nosso estudo podem ser decorrentes tanto da invasão do microambiente tímico pelo fungo quanto da resposta inflamatória sistêmica frente a grande carga fúngica inoculada, ou mesmo de ambas. Uma das hipóteses para a ocorrência desta atrofia é o aumento do efluxo de timócitos. Neste sentido, PRICE *et al.* (1993), estudando a atrofia tímica na infecção citomegalovirótica, verificaram que esta ocorre mesmo na ausência de partículas virais no órgão, sugerindo, que a infecção sistêmica poderia induzir a aceleração no trânsito das células para fora do timo, levando-o à atrofia. Os autores sugerem que estas células estariam saindo em maior número e num estado mais ativado do que no timo normal e que este fenômeno poderia ser tanto a causa como a consequência da perda da arquitetura tímica.

Em nosso modelo de estudo, entretanto, este não parece ser o mecanismo de atrofia envolvido, uma vez que não houve aumento de linfócitos circulantes, e sim, uma redução neste número no início da infecção. Além disso, o aumento no trânsito das células tímicas,

poderia levar à liberação de células autorreativas, ocasionando quadros de autoimunidade, o que não tem sido relatado na paracoccidiodomicose humana nem experimental.

Estudos preliminares realizados em nosso laboratório indicam um aumento no nível de morte por apoptose das células tímicas na fase inicial da infecção paracoccidiodomicótica (dados não demonstrados). A ocorrência de apoptose de timócitos também foi observada em nosso laboratório quando da coinfeção experimental de camundongos por *T. cruzi* e MHV (VERINAUD *et al.*, 1998). De fato, o aumento na taxa de apoptose de células tímicas tem sido apontado por vários autores como uma outra hipótese para a involução tímica e, várias citocinas e mediadores da resposta inflamatória têm sido citados como desencadeadores deste processo, entre eles, Interleucina 1 (IL-1), Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF- α), Fator de Necrose Tumoral – beta (TNF- β), Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) e Óxido Nítrico (NO).

No caso do Vírus da Hepatite Murina A59 (MHV-A59), GODFRAIND *et al.* (1995), observaram que a atrofia tímica deve-se a apoptose de timócitos CD4⁺CD8⁺ que morrem, provavelmente, pela ação direta de mediadores ou por causa da infecção de células epiteliais. A infecção das células epiteliais pelo MHV-59 levaria indiretamente à apoptose, uma vez que estas deixariam de produzir citocinas capazes de conferir proteção contra apoptose como Interleucina 3 (IL-3), Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina 6 (IL-6).

OZEKI *et al.* (1997), estudaram a apoptose induzida pelo Fator Corda Micobacteriano, um glicolípido presente na parede de bactérias álcool-ácido resistentes, que atua como fator de virulência. Estes autores verificaram uma importante participação do TNF- α na atrofia tímica. Apesar de não ocorrer aumento nas concentrações séricas do TNF- α , a administração de anticorpos anti-TNF- α inibiu completamente esta atrofia, possivelmente devido ao bloqueio na síntese de outras citocinas ou mediadores. Além disso, a liberação de glicocorticóides, estimulada por elevados níveis de TNF- α e IL-1 circulantes, poderia também contribuir para a ocorrência de apoptose de células tímicas, como ocorre no caso da inoculação de Lipopolissacarídeos (LPS) (NORAMATSU *et al.*, 1995).

No caso da paracoccidiodomicose experimental, FIGUEIREDO *et al.* (1993), utilizando camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa 18 de *P. brasiliensis*, relataram a elevação dos níveis séricos de TNF- α a partir do 4º dia de infecção. Embora neste período

nossos resultados demonstrem um decréscimo no número de células apoptóticas no timo (dados não demonstrados), existe a possibilidade de que o TNF- α produzido precocemente no local da infecção estimule a produção de outras citocinas indutoras da apoptose de timócitos.

Alternativamente, o próprio *P. brasiliensis*, presente no microambiente tímico, poderia liberar substâncias capazes de alterar a fisiologia do timo, levando-o à atrofia. A gliotoxina, por exemplo, produzida por fungos do gênero *Aspergillus*, produz um quadro de imunossupressão induzindo apoptose no timo, além de baço e linfonodos, a partir de 6 horas de inoculação (SUTTON *et al.*, 1994). A toxina T-2, produzida por *Fusarium* sp. e outros gêneros fúngicos, também é responsável pela indução de imunossupressão devido à redução do peso e da celularidade tímicos e a ocorrência de apoptose de células tímicas (ISLAM *et al.*, 1998). Apesar do mecanismo de ação da toxina T-2 não ser compreendido, os autores acreditam que ela possua uma ação direta sobre os órgãos linfóides, uma vez que nem o TNF- α nem glicorticóides estão envolvidos na indução da apoptose.

A ocorrência de infiltrado inflamatório no timo pode ser um indício da liberação de mediadores pelo *P. brasiliensis*. A presença de neutrófilos e principalmente eosinófilos é normal no timo de seres humanos (KATO *et al.*, 1998), e foi também observada, neste estudo, no timo de animais não infectados. Entretanto, em animais infectados pelo *P. brasiliensis* estas células encontravam-se em número bastante elevado e em locais incomuns, como na camada cortical, sugerindo que mediadores quimiotáticos poderiam estar sendo liberados neste local. Assim, é possível que o fungo libere substâncias capazes de induzir tanto a quimiotaxia de granulócitos, responsável pela infiltração, quanto alterações no microambiente tímico, que o levariam à atrofia.

Uma outra possibilidade seria que o *P. brasiliensis* estaria sendo fagocitado por histiócitos no timo, processado e apresentado para timócitos em maturação, levando-os à deleção. Corroboram para esta hipótese a presença de histiócitos ao redor das leveduras, como pode ser visto na Figura 3B, e a redução do número de fungos presentes no timo ao longo da infecção.

MARTIN & BEVAN (1997), estudando a seleção negativa de timócitos em camundongos transgênicos exibindo receptores de célula T (TCR), específicos para

ovoalbumina de galinha (aminoácidos 253-267), verificaram que a inoculação do antígeno específico leva à depleção de grande parte dos timócitos. De acordo com estes autores, esta depleção é mediada diretamente pelo reconhecimento do antígeno por timócitos $CD4^+CD8^+$, uma vez que acontece já 24 horas após a inoculação, mesmo após a depleção de linfócitos periféricos e não é inibida pela neutralização de receptores para $TNF-\alpha$. Um fenômeno semelhante pode ter ocorrido em nosso modelo experimental levando timócitos à depleção pelo reconhecimento específico de antígenos do *P. brasiliensis*. Entretanto, considerando a alta variabilidade dos receptores de células T, o número de timócitos específicos para antígenos do fungo presente no timo é pequeno, indicando que, se a depleção antígeno específica acontece no timo de animais infectados pelo *P. brasiliensis*, ela não é a única responsável pela atrofia observada e outros fatores certamente estariam envolvidos neste processo.

Uma outra hipótese seria que a involução tímica ocorre devido à retenção dos progenitores de linfócitos T na medula óssea. Entretanto, a análise histopatológica da medula óssea não demonstrou alterações na maturação desta linhagem celular. Aliado a isso, a contagem de linfócitos no sangue periférico não revelou alterações significativas ao longo da infecção, apenas no primeiro dia pós-inoculação notou-se diminuição no número destas células, o que pode ser decorrente da morte no próprio timo, como sugerido pela presença de restos celulares e histiócitos no timo.

A literatura tem relatado alguns casos do achado de *P. brasiliensis* na medula óssea de pacientes (CASTRO *et al.*, 1958; TERRA *et al.*, 1991; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1992 e OZAKI *et al.*, 1996), inclusive com a presença de granuloma típicos abrigando células gigantes (PIMENTA DE MELLO, 1955), e em camundongos experimentalmente infectados (V.L. Calich, comunicação pessoal). Apesar disso, neste modelo experimental, a invasão medular não foi observada, mesmo quando da utilização da técnica de imuno-histoquímica com anticorpos específicos para o fungo. Tal discrepância de resultados pode ser decorrente do fato da linhagem BALB/c, utilizada neste estudo, apresentar susceptibilidade intermediária à infecção, mimetizando a forma moderada da paracoccidioidomicose humana (CALICH *et al.*, 1985).

As alterações histopatológicas observadas na medula óssea, como aumento da celularidade e retardo da maturação, especialmente da série granulocítica, são características de uma medula óssea reativa frente a uma infecção sistêmica. Resultados semelhantes foram, anteriormente, observadas em nosso laboratório, no modelo de co-infecção por *T. cruzi* e MHV (VERINAUD *et al.*, 1999). Assim, neste estudo, o *P. brasiliensis* não provocou alterações na medula óssea capazes de induzir imunossupressão, como tem sido observado em algumas viroses onde a infecção direta de células leva a distúrbios na hematopoiese, causando leucopenia, que contribui para a ocorrência de imunossupressão (RE *et al.*, 1994 e MORI *et al.*, 1999). Este resultado pode estar ligado ao fato do fungo não ter invadido a medula óssea, como ocorre no caso do vírus HIV (RE *et al.*, 1994) e citomegalovírus (MORI *et al.*, 1999).

Embora tenhamos observado um comprometimento tímico neste modelo experimental de paracoccidiodomicose, não foi possível correlacioná-lo com alterações da resposta de hipersensibilidade tardia avaliada pelo TCP. No caso da infecção por *C. neoformans*, SOTOMAYOR *et al.* (1989), verificaram que, em animais infectados experimentalmente e, posteriormente imunizados com soro albumina humana, o envolvimento cortical e a formação de granulomas no timo levavam à diminuição da resposta imune celular. Em nosso estudo é possível que a ausência de correlação observada deva-se ao fato de que a resposta imune primária frente ao fungo seja efetuada por linfócitos que já se encontravam na periferia. Apesar da atrofia tímica não apresentar correlação alguma com a resposta de hipersensibilidade tardia, é possível que a ocorrência de danos no timo prejudique a eliminação do *P. brasiliensis*, uma vez que este foi observado, em meio aos granulomas esplênicos, até o final do período de experimentação.

No caso da correlação entre a atrofia tímica e controle da disseminação do fungo, medida pela formação de granulomas, observamos uma tendência à correlação inversa. Resultados semelhantes foram descritos por OZEKI *et al.* (1997). Estes autores estudaram a resposta de camundongos BALB/c frente a inoculação de Fator Corda Micobacteriano, observando uma boa correlação entre a atrofia tímica e a resposta granulomatosa, utilizando índices tímico e pulmonar. O pico de atrofia do timo coincidiu com o pico da resposta granulomatosa do pulmão e, de acordo com os autores, os dois fenômenos eram

dependentes de TNF- α , uma vez que eram inibidos pela administração de anticorpos anti-TNF- α . De fato, o TNF- α tem sido demonstrado ser essencial para a formação dos granulomas através de estudos envolvendo sua neutralização por anticorpos específicos (KLINDER *et al.*, 1989) e através da utilização de camundongos nocaute para o receptor de TNF p55 (TSUJI *et al.*, 1997). Além disso, existem trabalhos que salientam o papel desta citocina como indutora de apoptose, através da ligação com receptores específicos nos timócitos (PATIÑO *et al.*, 2000). Apesar disso, os autores acreditam que o TNF- α não tenha um papel direto nesta atrofia tímica, uma vez que não foram detectadas alterações nos níveis sistêmicos desta citocina. Neste caso, o TNF- α produzido no local das lesões poderia estar desencadeando a produção de outros mediadores que atuariam sobre o timo levando-o a atrofia.

A existência de uma possível correlação entre a formação do granuloma e a atrofia tímica leva-nos a pensar em duas hipóteses, ambas com o efeito de proteger o organismo contra os danos causados por uma resposta imune inadequada. A primeira hipótese seria que mediadores inflamatórios envolvidos na gênese do granuloma induziriam a atrofia tímica diminuindo a quantidade de linfócitos liberados para a periferia. Isto impediria que mais linfócitos migrassem para os focos inflamatórios, onde poderiam ampliar os danos teciduais causados pela resposta granulomatosa. Este fato poderia ser evolutivamente favorável a ambos: para o hospedeiro, evitando os danos de uma reação tecidual exuberantes, mais danosa que o próprio parasita, e para o fungo, permitindo sua sobrevivência na ausência de uma reação tecidual mais intensa.

A segunda possibilidade para a reação granulomatosa induzir a atrofia do timo estaria relacionada com nossa observação de que o fungo é capaz de invadir este órgão, onde células, futuramente comprometidas com a resposta imune, adquirem sua competência. A presença do *P. brasiliensis* no timo, indica a quebra de possíveis barreiras que normalmente impedem a entrada de proteínas não-próprias do organismo. Neste caso, antígenos do *P. brasiliensis* poderiam estar sendo processados e apresentados como proteínas próprias aos timócitos, que então amadureceriam tolerantes a elas. Assim, a eliminação de timócitos, durante a infecção, estaria impedindo que linfócitos tolerantes ao

P. brasiliensis migrassem para a periferia, atrapalhando, ou até mesmo impedindo, uma resposta imune eficaz contra o fungo.

Estas duas possibilidades não são excludentes e poderiam estar ocorrendo em nosso modelo experimental, evitando a ocorrência de respostas prejudiciais ao hospedeiro, uma vez que foi observada uma redução no número de linfócitos circulantes durante a fase inicial da infecção pelo *P. brasiliensis*.

De modo geral, os resultados obtidos neste estudo, utilizando a inoculação intraperitoneal de camundongos BALB/c com o isolado virulento Pb18 do *P. brasiliensis*, indicam que a infecção paracoccidiodomicótica induz profunda atrofia tímica na fase aguda da infecção, caracterizada por depleção cortical, perda da delimitação corticomedular e invasão do microambiente tímico pelo fungo, e que é revertida a partir de 10 dias pi. Na medula óssea, por outro lado, o *P. brasiliensis*, é incapaz de instalar-se e as alterações observadas, como aumento no número de precursores imaturos e retardo da maturação da linhagem granulocítica, são decorrentes da infecção sistêmica. Apesar da atrofia tímica e das alterações observadas na medula óssea, nossas observações sugerem que os animais infectados são capazes de desenvolver uma resposta imune celular específica contra o microorganismo e de contê-lo, ainda que vivo, em granulomas compactos e bem organizados. A persistência de fungos viáveis durante todo o período experimental poderia ser, então, um indicativo que a atrofia tímica favorece a persistência do fungo no hospedeiro.

6. CONCLUSÕES

6.1. O isolado virulento Pb18 de *P. brasiliensis* inoculado intraperitonealmente em camundongos BALB/c é capaz de invadir o timo mas não a medula óssea.

6.2. A infecção experimental pelo *P. brasiliensis* leva a uma severa atrofia tímica na fase aguda da infecção, enquanto na medula óssea ocorrem o aumento de precursores imaturos e o retardo da maturação da série granulocítica.

6.3. Utilizando a inoculação intraperitoneal de camundongos BALB/c com o *P. brasiliensis*, não foi possível detectar correlação entre a atrofia tímica e o desenvolvimento de resposta de hipersensibilidade tardia contra o fungo. Enquanto que entre a atrofia tímica e o controle da disseminação do *P. brasiliensis*, representado pela formação de granulomas compactos, foi observada uma correlação inversa.

6.4. Embora contido em granulomas compactos o *P. brasiliensis* permanece viável mesmo após 120 dias de infecção, sugerindo que os danos causados no timo podem facilitar sua persistência no hospedeiro.

7. ABSTRACT

BRITO, V. N. **Immunopathologic Study of Primary Lymphoid Organs of *Paracoccidioides brasiliensis*-Infected Mice.** Tese de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.

Literature has shown that the immunosuppression observed in systemic mycosis can be related with the involvement of primary lymphoid organs. In this study we evaluated the immunopathologic alterations induced experimentally by *P. brasiliensis* in these organs, correlating them with fungal dissemination and delayed-type hypersensitivity (DTH) response. BALB/c male mice were inoculated i.p. with 5×10^6 yeasts and histologically evaluated in relation to alterations in primary lymphoid organs, presence of disseminated lesions in liver, spleen and lungs and specific DTH response. *P. brasiliensis* was able to invade the thymus, that suffered severe atrophy, with degeneration of the cortical layer and loss of corticomedullar delimitation. On the other hand, the bone marrow, presented hyperplasia and retard in the maturation of cells, especially the granulocytic lineage, as observed in systemic infections, although yeasts were not detected in this tissue. Liver and spleen presented lesions with many yeasts during the infection. These neutrophilic lesions developed to epithelioid granulomas, sometimes, surrounded by lymphocytes, plasma cells and eosinophils. The lungs presented discrete inflammatory infiltrate. DTH evoked 5 days p.i., an inflammatory infiltrate with many neutrophils, mononuclear cells and some eosinophils; the volume of this infiltrate increased considerably along the infection, especially after the first month. No correlation was observed between the thymic atrophy and DTH reaction, while an inverse correlation was observed between thymic atrophy and control of the fungal dissemination, evaluated by the compact granuloma formation. Thus, our results indicate that *P. brasiliensis* is able to induce histopathologic alterations in the thymus of BALB/c mice, which facilitates its persistence in the host.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, F.; VELLENA, A.; ZAPATA, A. & RAZQUIM, B. 1995. Histopathology of the thymus in *Saprolegnia*-infected wild brown trout, *Salmo trutta* L. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **47**: 163-172.
- BAGAGLI, E.; SANO, A. & COELHO, K. I. 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **58(4)**: 505-512.
- BERNARD, G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; JUVENALI, M.; MIRANDA, E. T. & DUARTE, A. J. S. 1997. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J. Infect. Dis.**, **175**: 1263-1267.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248-254.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E. & RESTREPO, A. 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, **6(2)**: 89-117.
- BUCHANAN, K. L. & MURPHY, J. W. 1997. Kinetics of cellular infiltration and cytokine production during the effector phase of a delayed-type hypersensitivity reaction. **Immunol.**, **90**: 189-197.
- BURGER, E.; MIYAJI, M.; SANO, A.; CALICH, V. L. G.; NISHIMURA, K. & LENZI, H. L. 1996. Histopathology of paracoccidioidomycotic infection in athymic and euthymic mice: a sequential study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55(2)**: 235-242.

- CALICH, V. L. G. & KASHINO, S. S. 1998. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **31(5)**: 615-623.
- CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, M.; SIQUEIRA, A. M. & BURGER, E. 1985. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Path.**, **66**: 585-594.
- CAMARGO, Z. P.; TABORDA, C. P.; RODRIGUES, E. G. & TRAVASSOS, L. R. 1991. The use of cell free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **J. Med. Vet. Mycol.**, **29**: 31-38.
- 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, activation, response immune cellular, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, **63(5)**: 1777-1783.
- CASTRO, R.M.; BASSOI, O.N.; DEL NEGRO, G. & FARIA, C. V. 1958. Dificuldades diagnósticas na blastomicose sul-americana. **Rev. Paul. Med.**, **53**: 479-496.
- CHER, J. D. & MOMANN, T. R. 1987. Two types of murine helper T cell clone. II Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. **J. Immunol.**, **138(11)**: 3688-3694.
- COELHO, K. I. R.; DeFAVERI, J.; IWASSO, M. T. R.; PERAÇOLI, M. T. & MOTA, N. G. S. Paracoccidioidomycose experimental In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S. & FIORILLO. 1982. **Paracoccidioidomycose**. Savier-Edusp. São Paulo, p. 69-84.
- CROWLE, A. J. 1959. Delayed hypersensitivity in several strains of mice studied with 6 different tests. **J. Allergy**, **30**: 442-459.

- FIGUEIREDO, F.; ALVES, L. M. C. & SILVA, C. L. 1993. Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the wall fractions thereof. **Clin. Exp. Immunol.**, **93**: 189-194.
- FINKEL-JIMENEZ, B. E. & MURPHY, J. W. 1988a. Characterization of efferent T supressor cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis*-specific afferent T supressor cells. **Infec. Immun.**, **56(4)**: 744-750.
- FINKEL-JIMENEZ, B. E. & MURPHY, J. W. 1988b. Induction of antigen-specific T supressor cells by soluble *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. **Infec. Immun.**, **56(4)**: 734-743.
- FRANCO, M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. 1986. **J. Med. Vet. Mycol.**, **25**: 5-18.
- FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L. & MOTA, N. G. S. 1987. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **20**: 129-132.
- FRANCO, M.; MENDES, R.P. & MOSCADI-BACCHI, M. 1989. Paracoccidioidomycosis. **Baillière's Clin. Trop. Med. Comm. Dis.**, **4(1)**: 185-220.
- GODFRAIND, C.; HOLMES, K. V. & COUTELIER, J. P. 1995. Thymus involution induced by mouse hepatitis virus A59 in BALB/c Mice. **J. Virol.**, **69(10)**: 6541-6547.
- ISLAM, Z.; MASAHIRO, N.; YOSHIKAWA, T.; YAMAUCHI, K. & SAKATO, N. 1998. T-2 toxin induces thymic apoptosis *in vivo* in mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **148**: 205-214.

- KATO, M.; KEPHART, G. M.; TALLEY, N. J.; WAGNER, J. M.; SARR, M. G.; BONNO, M.; MCGOVERN, T. W. & GLEICH, G. J. 1998. Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissue. **Anat. Rec.**, **252**: 418-425.
- KINDLER, V.; SAPPINO, A. P.; GRAU, G. E.; PIGUET, P. F. & VASSALI, P. 1989. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**, **56**: 731-740.
- LACAZ, C. S. 1949. Novos dados em relação a blastomicose sul americana e seu agente etiológico. **Rev. Med. Cir. S. Paulo**, **9**: 303-340.
- MACKINNON, J. E. 1959. Pathogenesis of South American blastomycosis in experimental animals. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **53**: 487-494.
- MARTIN, S. & BEVAN, M. J. 1997. Antigen-specific and nonspecific deletion of immature cortical thymocytes caused by antigen injection. **Eur. J. Immunol.**, **27**: 2726-2736.
- MEDINA, H. & BODZIAK-JUNIOR, C. Contribuição ao ciclo extraparasitário do *Paracoccidioides brasiliensis* II. Cultura do *P. brasiliensis* em terra e influência exercida pelo pH. **Arg. Biol. Tecnol.**, **4**: 3-8.
- MOK, P. W. Y. & GREER, D. L. 1997. Cell-mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis. **Clin. Exp. Immunol.**, **28**: 89-98.
- MONTENEGRO, J. 1927. Acerca da inoculabilidade da blastomicose no Brasil. **Brazil-med.**, **41**: 808-812.
- MORENO, A. R. & ESPINOSA, G. G. 1976. Paracoccidioidomycosis experimental del raton inducida por via aerogena. **Sabouraudia**, **14**: 299-311.

- MORI, T.; NAKAMURA, M.; SHIMIZU, K.; IKEDA, Y. & ANDO, K. 1999. *In vivo* disturbance of hematopoiesis in mice persistently infected with murine cytomegalovirus: impairment of stromal cell function. **Virology**, **253**: 145-154.
- MOSCARDI, M. & FRANCO, M. F. 1980. Paracoccidioidomicose experimental do camundongo. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, **22**(6): 286-293.
- NORAMATSU, M; ONO, T.; AOKI, A.; OHISHI, K. & TAMURA, Y. 1995. *In vivo* induction of apoptosis in murine lymphocytes by bacterial lipopolisaccharides. **J. Med. Microbiol.**, **43**: 251-257.
- OZAKI, K. S.; MUNHOZ-JUNIOR, S.; PINHEIRO, E. K.; TADANO, T. & FONTES, C. J. F. 1996. Diagnóstico de paracoccidioidomicose disseminada grave em aspirado de medula óssea: relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **29**(4): 263-366.
- OZEKI, Y.; KANEDA, K.; FUJIWARA, N.; MORINOTO, M.; OKA, S. & YANO, I. 1997. *In vivo* induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor (Trehalose 6,6'-Dimycolate). **Infect. Immun.**, **65**(5): 1793-1799.
- PAGEL, W. 1940 *aput*: CROWLE, A. J. 1975. Delayed hypersensitivity in the mouse. **Adv. Immun.**, **20**: 197-264.
- PATINO, J. A. G.; IVANOV, V. N.; LACY, E.; ELKON, K. B., MARINO, M. W. & NIKOLIC-ZUGIC, J. 2000. TNF- α is the critical mediator of the cyclic AMP-induced apoptosis of CD8⁺4⁺ double-positive thymocytes. **J. Immunol.**, **164**: 1689-1694.

- PERAÇOLI, M. T. S. 1978. Paracoccidioidomicose experimental do hamster. Estudo da imunidade celular e humoral e correlação com a morfologia das lesões. São Paulo [Tese de Mestrado – Escola Paulista de Medicina].
- PIMENTA DE MELLO, R. 1955. Granuloma blastomicótico de medula óssea. **O Hospital**, **48(5)**: 135-138.
- PRICE, P.; OLVER, S. D.; GIBBONS, A. E.; TEO, H. K. & SHELLAM, G. R. 1993. Characterization of thymic involution induced by murine cytomegalovirus infection. **Immunol. Cell Biol.**, **71**: 155-165.
- RE, M. C.; FURLINI, G.; ZAULI, G. & LA PLACA, M. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human hematopoietic progenitor cells. **Arch. Virol.** **137**: 1-23.
- RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, P.; FELDMAN, D. & STEVENS, D. A. 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Inf. Immun.**, **46(2)**: 346-353.
- RESTREPO, A. 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unresolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, **23**: 323-334.
- ROBLEBO, M. A.; GRAYBILL, J. R.; AHRENS, J.; RESTREPO, A.; DRUTZ, D. J. & ROBLEBO, M. 1982. Host defense against experimental paracoccidioidomycosis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **125**: 583-567.

- SANO, A.; NOBUYUKI, K.; IABUKI, K.; COELHO, R.; TAKEO, K.; NISHIMURA, K. & MIYAJI, M. 1993. A comparative study of four different staining methods for estimation of live yeast form cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathol.**, **124**: 157-161.
- SAVINO, W.; LEITE-DE-MORAES, M.C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. & DARDENNE, M. 1989. Studies on thymus in Chagas' disease I. Changes in the thymus microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Immunol.**, **19**: 1727-1733.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; HIGAKI, Y.; UIP, E. D.; MORI, N. S.; DEL NEGRO, G.; MELO, N. T.; HUTZLER, R. U. & AMATO NETO, V. 1992. Comprometimento da medula óssea e eosinofilia na paracoccidioidomicose. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **34**(2): 85-90.
- SILVA, M. R.; MARQUES, A. S.; CAMPOS, D. S. TABOADA, D. C.; SOARES, G. H.; BRASCHER, H. M.; VARGENS-NETO, J. R.; CRUZ, M. Q.; LABARTHE, N. V.; ROCHA, G. L. & LIMA, A. O. 1981. Imunologia na paracoccidioidomicose. **An. Bras. Dermatol.**, **56**(4): 227-234.
- SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R. CHADU,; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G. & MAFFEI, C. M. L. 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol.**, **36**: 37-42.
- SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, CAMARGO, Z. P.; MALTA, M. H.B.; MAFFEI, C. M. L. & CHADU, J. B. 2000. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol.**, **38**(3): 193-199.

- SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; FRANCO, M. F.; MOSCARDI-BACCHI, M.; MENDES-GIANINNI, M. J. S. & CALICH, V. L. G. 1989. Evaluation of the pathogenicity and imunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **J. Med. Vet. Mycol.**, **27**: 71-82.
- SINGER-VERMES, L. M.; CALDEIRA, C. B.; BURGER, E. & CALICH, V. L. G. 1993. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of infection, humoral and cellular responses. **Clin. Exp. Immunol.**, **94**: 75-79.
- SOTOMAYOR, C. E.; RUBISTEIN, H. R.; CERVI, L.; RIERA, C. M. & MASHI, D. T. 1989. Immunosuppression in experimental cryptococcosis in rats: induction of thymic suppressor cells. **Mycopathol.**, **108**: 5-10.
- SOUNIS, E. 1971. **Bioestatística**. C.P.U.F.P. Curitiba, p. 114.
- SUTTON, P.; NEWCOMBE, N. R.; WARING, P. & MÜLLBACHER, A. 1994. *In vivo* immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. **Infect. Immun.**, **62**(4): 1192-1198.
- TEIXEIRA, H. C.; CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; D'IMPERIO-LIMA, M. R. & RUSSO, M. 1987. Experimental paracoccidioidomycosis: early immunosuppression occurs in susceptible mice after infection with patogenic fungi. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **20**: 367-369.
- TERRA, G. M. F.; RIOS-GONÇALVES, A. J.; LONDERO, A. T.; BRAGA, M. P.; OURICURI, A. L.; MESQUITA, C. C.; MARINHO, J. C. A.; ERVILHA, L. M.; VIEIRA, A. R. M.; DEKER-MACHER, S. & DUARTE, D. M. A. 1991. Paracoccidioidomicose em crianças: apresentação de casos. **Sup. Arq. bras. Med.**, **65**(1): 8-15.

- TSUJI, H.; HARADA, A.; MUKAIDA, N.; NAKAMURA, Y.; BLUETHMANN, H.; KANEKO, S.; YAMAKAWA, K.; NAKAMURA, S.; KOBAYASHI, K. & MATSUSHIMA, K. 1997. Tumor necrosis factor p55 is essential for intrahepatic granuloma formation and hepatocellular apoptosis in a murine model of bacterium-induced fulminant hepatitis. **Inf. Immun.**, **65(5)**: 1892-1898.
- TREXLER, P. C. 1959. The use of plastic in the design of an isolator system. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **78**: 29-36.
- VERINAUD, L.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; SAKURADA, J. K.; RANGEL, H. A.; VASSALLO, J.; WAKELIN, D.; SEWELL, H. B. & CAMARGO, I. J. B. 1998. Immunodepression induced by *Trypanosoma cruzi* and Mouse Hepatitis Virus type 3 is associated with thymus apoptosis. **Clin. Diag. Labor. Immunol.**, **5(2)**: 186-191.
- VERINAUD, L.; CAMARGO, I. J. B.; VASSALLO, J.; SAKURADA, J. K. & RANGEL, H. A. 1999. Lymphoid organ alterations enhanced by sublethal doses of coronaviruses in experimentally induced *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Labor. Anim. Science**, **49(1)**: 35-41.